

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN MUESTRAS RECOLECTADAS EN CUATRO COMUNIDADES DEL CANTÓN GENERAL VILLAMIL PLAYAS, PROVINCIA DEL GUAYAS.**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**SILVIA FERNANDA JIMÉNEZ YÁNEZ**

**SANGOLQUÍ, ENERO DEL 2013**

## **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

### **ELABORADO POR**

---

Silvia Fernanda Jiménez Yánez

### **COORDINADOR DE LA CARRERA**

---

Ing. Tatiana Páez.

### **SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Abg. Carlos Orozco Bravo, MSc

**Lugar y fecha:** Sangolquí, Enero del 2013.

# CERTIFICACIÓN

María Augusta Chávez M.Sc.

Ing.-Mat. Pedro Romero Saker

## **Certifican:**

Que el trabajo titulado “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN MUESTRAS RECOLECTADAS EN CUATRO COMUNIDADES DEL CANTÓN GENERAL VILLAMIL PLAYAS, PROVINCIA DEL GUAYAS**”, realizado por Silvia Fernanda Jiménez Yáñez, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Silvia Fernanda Jiménez Yáñez que lo entregue a la Ingeniera Tatiana Páez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Enero del 2013

---

María Augusta Chávez M.Sc

DIRECTOR

---

Ing.-Mat. Pedro Romero Saker

CODIRECTOR

# DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Silvia Fernanda Jiménez Yáñez

## Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN MUESTRAS RECOLECTADAS EN CUATRO COMUNIDADES DEL CANTÓN GENERAL VILLAMIL PLAYAS, PROVINCIA DEL GUAYAS**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Enero del 2013

---

**Silvia Fernanda Jiménez Yáñez**

# AUTORIZACIÓN

Yo, Silvia Fernanda Jiménez Yánez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN MUESTRAS RECOLECTADAS EN CUATRO COMUNIDADES DEL CANTÓN GENERAL VILLAMIL PLAYAS, PROVINCIA DEL GUAYAS”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Enero del 2013

---

**Silvia Fernanda Jiménez Yánez**

## DEDICATORIA

A mi padre, quien ha sido el impulso diario para seguir con mi carrera y tener un mejor desempeño en mi vida profesional.

A mi madre, la mujer más valiente y dedicada, que con su paciencia ha sido mi pilar fundamental para alcanzar mis metas y se ha entregado cada día de su vida al desarrollo de mi educación la cual he tenido el privilegio de tener.

A mi querida hermana Paulina, quien ha sido mi compañera incondicional ante la adversidad y nunca me ha dejado sola en cada paso que he dado, convirtiendome en su ejemplo a seguir.

A mis amigos y amigas, especialmente a Michelle Yépez Crow, quienes me han ayudado incondicionalmente cada día en el transcurso de toda mi carrera universitaria.

Por ustedes y para ustedes.

***Silvia Fernanda Jiménez Yáñez***

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Politécnica del Ejército, que me acogió en su seno para integrarme a la sociedad ecuatoriana como una brillante profesional. A la Facultad de Ciencias de la Vida y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Al Laboratorio de Enfermedades Tropicales de la Facultad de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador quien me aceptó como un miembro mas de su familia.

Al Doctor Ángel Gustavo Guevara, a la Ingeniera Yosselin Vicuña, a la Master María Augusta Chávez y al Ing.-Mat. Pedro Romero Saker quienes colaboraron con la dirección en el proceso de este proyecto.

Al Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores SNEM y a todas las personas que habitan en las comunidades de estudio los cuales ayudaron de manera eficaz al trabajo realizado en la fase de campo en la recolección de muestras durante el tiempo que permanecí en la zona de estudio.

A mi familia entera que ha estado pendiente de mi carrera y el desenvolvimiento de mi vida haciéndome crecer y aprender a creer en mí.

Muchas gracias.

***Silvia Fernanda Jiménez Yáñez***

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es un problema grave de salud pública en el Ecuador por múltiples razones: Afecta a personas que viven en zonas de bajos recursos económicos, inadecuada política gubernamental para su erradicación, alto índice de prevalencia del parásito en el principal vector endémico de la enfermedad (*Triatoma dimidiata*) que en esta investigación resultó el 72,63%.

La presente investigación se efectuó en cuatro comunidades de la costa ecuatoriana: Barrio Lindo, El Morrón, Altamira y Cruz Roja, que pertenecen al cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas. El trabajo de campo se ejecutó con la ayuda del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores, SNEM.

La prevalencia del parásito en el vector *Triatoma dimidiata* fue de 72.33% analizado en las cuatro comunidades de estudio. Se encontró una diferencia significativa en el barrio Cruz Roja a comparación de las otras comunidades. El análisis de la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en muestras de heces de chinchorros (*Triatoma dimidiata*) se llevó a cabo con los primers específicos S35 y S36, para lo cual obtuvimos el 100% de las muestras analizadas positivas; en la caracterización molecular se emplearon los primers TC, TC1 y TC2 para identificar el tipo de especie del parásito y se encontró 40% de las muestras (10/25) que pertenecían a *Trypanosoma cruzi* Tipo II.

## SUMMARY

Chagas disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* is a major public health problem in Ecuador for many reasons: It affects people living in low-income areas, inadequate government policy to eradicate, high prevalence of the parasite endemic in the main vector of the disease (*Triatoma dimidiata*) in this research was the 72.63%.

This research was conducted in four communities of the Ecuadorian coast: Barrio Lindo, El Morrón, Altamira and Cruz Roja, belonging to General Villamil Playas canton, Guayas Province. The field work was carried out with the help of the National Control of Vector-Borne Diseases, SNEM.

The prevalence of the parasite in the vector *Triatoma dimidiata* was analyzed 72.33% in the four communities. We found a significant difference in the district Cruz Roja in comparison of other communities. Analysis of the parasite *Trypanosoma cruzi* in stool samples of hammocks (*Triatoma dimidiata*) was performed with specific primers S35 and S36, for which we obtained 100% of the analyzed sample positive, in the molecular characterization were used primers TC, TC1 and TC2 for identifying the type of species of parasite and found 40% of the samples (10/25) belonging to *Trypanosoma cruzi* Type II.

## ÍNDICE

CAPITULO 1.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.....	Formulación del problema ¡Error! Marcador no definido.
1.2 Justificación del problema.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3 Objetivos de la investigación.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1. Objetivo general.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2 Objetivos específicos.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Marco teórico.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.1 Epidemiología.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.8 Mecanismos de transmisión del <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.13 Clínica de la enfermedad.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4.14 Métodos de diagnóstico.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5 Hipótesis global de investigación.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 2.....	¡Error! Marcador no definido.
MATERIALES Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Participantes.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Zona de estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Período de tiempo de la investigación.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Análisis estadístico.....	¡Error! Marcador no definido.
2.5.1 Fase de campo.....	¡Error! Marcador no definido.
Recolección y análisis del material fecal de Triatomínos.....	¡Error! Marcador no definido.
Infecciones experimentales.....	¡Error! Marcador no definido.
Aislamiento y cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	¡Error! Marcador no definido.
2.5.3 Técnicas Moleculares.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 3.....	¡Error! Marcador no definido.
RESULTADOS.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 4.....	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 5.....	¡Error! Marcador no definido.
CONCLUSIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 6.....	¡Error! Marcador no definido.
RECOMENDACIONES.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO 7.....	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.

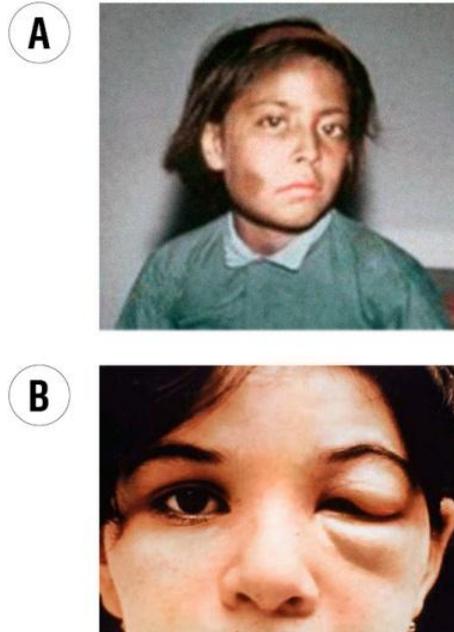
# CAPITULO 1.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*, es transmitida por un vector llamado *Triatoma dimidiata*, insecto endémico de varias zonas en Ecuador, se transmite por la picadura del insecto vector, puede transmitirse de manera vertical de la madre al feto, por mala manipulación de muestras contaminadas, por objetos cortopunsantes contaminados, por transfusión sanguínea y por trasplantes de órganos (Guevara, 1999).

Los parásitos infectantes salen de las deyecciones del vector y pueden introducirse al organismo a través del orificio de la picadura, heridas o excoriaciones de la piel o atravesando directamente la mucosa ocular, nasal o bucal, la enfermedad presenta varias formas clínicas, en las cuales se puede o no presentar las diferentes sintomatologías para detectar la enfermedad, como por ejemplo el signo de Romaña (Figura 1.1), que se puede manifestar en una fase aguda de la enfermedad, este síntoma se presenta en bajos porcentajes siendo los niños los más afectados (Botero & Restrepo, 2003).



**Figura 1.1:** A. Picadura de *Triatoma dimidiata* en la mejilla, nótese que puede ser confundida con la picadura de otro insecto o animal. B. El Signo de Romaña, edema ocular característico cuando el vector libera al parásito en sus heces en un área cercana al ojo (Carabarán *et al.*, 2011).

Según Guhl *et al* (2001), luego de algunas semanas del contagio, se presenta una fase indeterminada la cual puede durar varios años y así mismo presentar o no presentar síntomas típicos, con frecuencia los pacientes no presentan síntomas y llevan una vida normal.

*Trypanosoma cruzi* es un parásito altamente complejo, del cual aún nos queda mucho por investigar, dándonos hasta ahora gran dificultad para crear una vacuna eficaz debido a su variabilidad genética, al ciclo biológico del agente infeccioso y a la autoinmunidad generada por el huésped durante la infección crónica. Es por tanto, que la enfermedad de Chagas constituye una de las enfermedades más importantes del continente americano haciéndola la enfermedad más incomprensible debido a todos los aspectos mencionados anteriormente (Días *et al.*, 2002).

Según la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), en el 2005 registraron en Latinoamérica y Ecuador la prevalencia de contagios de *Trypanosoma cruzi* en pobladores donde resulta ser endémica la enfermedad de Chagas (Cuadro 1.1 y 1.2).

**Cuadro 1.1:** Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en América Latina (OMS/OPS, 2005).

<b>Datos</b>	<b>Año 2005</b>
Población	521432800
Número de infectados	7694500
Casos de transmisión vectorial	41200
Casos Chagas congénito anual	14385
Mujeres (+) entre 15 y 44 años	1809507
Tasas de prevalencia	1448
Tasas de incidencia	0,008
Incidencia de Chagas congénito	0,133
Población expuesta en zonas endémicas	108595000
Nacimientos por año	10832950
Cardiopatías	1772365
Banco de sangre (prevalencia donantes)	1,28

**Cuadro 1.2:** Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en Ecuador (OMS/OPS, 2005).

<b>Datos</b>	<b>Año 2005</b>
Población	13228
Número de infectados	230000
Casos de transmisión vectorial	2350
Casos Chagas congénito anual	800
Mujeres (+) entre 15 y 44 años	58000
Tasas de prevalencia	1739
Tasas de incidencia	0,018
Incidencia de Chagas congénito	0,274
Población expuesta en zonas endémicas	6200000
Nacimientos por año	292000
Cardiopatías	79843
Banco de sangre (prevalencia donantes)	0,36

El Ecuador cuenta con un programa oficial de control de la enfermedad de Chagas, creado por el grupo del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores SNEM, según este grupo, el sistema de control presenta limitaciones económicas de presupuesto anual y de personal capacitado suficiente en el país el cual han hecho que sea de baja eficiencia, siendo este un resultado de suma importancia para mostrar una correlación de la enfermedad y el hombre.

## **1.2 Justificación del problema**

La enfermedad de Chagas se transmite por Triatominos (*Hemíptera: Reduviidae*) que son insectos hematófagos que habitan especialmente en palmeras del género *Phytelephas* (Abad & Franch, 2003) y en lugares donde las condiciones de vivienda y servicios básicos es insuficiente. Según Botero (2003), las hojas de las palmeras se utilizan para la elaboración de los techos de las casas, haciendo favorable la infestación de viviendas con los insectos vectores facilitando la transmisión de la enfermedad (Figura 1.2).

El estudio epidemiológico de *Trypanosoma cruzi* en las poblaciones humanas representa un gran avance en la investigación ya que nos permite desarrollar programas de control contra la transmisión vectorial, a través del programa de eliminación a los insectos infectantes, este método de control está basado en el rozamiento continuo de un insecticida que elimina específicamente al insecto vector (SNEM, 2010).



**Figura 1.2:** Domicilio con desechos y nidos de gallinas, favorables para el desarrollo y reproducción del vector causante de la enfermedad de Chagas.

Los mecanismos de patogenicidad del *Trypanosoma cruzi* no son bien comprendidos hasta la actualidad, pero con la caracterización molecular se pondrá énfasis en distinguir las especies del parásito *Trypanosoma cruzi* encontrado en cada zona endémica del Ecuador y así tomar las medidas precautelarias y casi personalizadas a cada paciente contagiado con la enfermedad (Guevara, 1999).

Según Grijalva (2001), las pruebas moleculares descritas para la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* son muy importantes en el análisis de la enfermedad de Chagas, ya que ayudan a comprender de mejor manera los aspectos relacionados a la infección y/o las patologías asociadas que pueden presentarse como consecuencia de la infección, ya que se sabe que los parásitos o productos asociados a él son los responsables de problemas digestivos y cardiacos en humanos.

Recientes estudios filogenéticos en otros países, han informado de la presencia de múltiples cepas en una población de parásitos multiclonales, los mismos que podrían estar asociados con la virulencia de la enfermedad, las manifestaciones clínicas y demás características biológicas de los parásitos *Trypanosoma cruzi*. Aunque varias publicaciones han tratado la enfermedad de Chagas en el Ecuador, sin embargo, a nuestro entender, muy pocos como Garzón *et al* (2002), se han centrado en la genética del parásito y sus implicaciones epidemiológicas y biológicas.

Es importante analizar también el pleomorfismo natural de *Trypanosoma cruzi*, el cual se ha atribuido a la diferencia de severidad con que se presenta la enfermedad en el hospedero humano y otros mamíferos. Considerando la caracterización molecular de las cepas de *Trypanosoma cruzi* se destacan los aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares para establecer un método de clasificación de las diferentes cepas de dicho parásito, de manera que las cepas que pertenezcan a un mismo grupo compartan estos aspectos y así una cepa pudiera ser representativa de este grupo, simplificando los estudios a realizar (Morel, 1999).

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

#### **1.3.1. Objetivo general**

Caracterizar las cepas de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR, en muestras recolectadas en cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas, en la provincia de Guayas.

### 1.3.2 Objetivos específicos

Colectar y extraer los triatominos infectados con el parásito *Trypanosoma cruzi* en las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Cruz Roja y Altamira dentro del cantón General Villamil Playas.

Realizar un estudio complementario de la prevalencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en el vector Triatomo en las muestras recolectados de las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Cruz Roja y Altamira dentro del cantón General Villamil Playas.

Extraer el ADN de *Trypanosoma cruzi*, mediante la técnica Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico de las muestras analizadas de Triatominos recolectados en las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Cruz Roja y Altamira dentro del cantón General Villamil Playas.

Caracterizar molecularmente a *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR, de las muestras de ADN obtenidas del análisis de los insectos Triatominos recolectados en las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Cruz Roja y Altamira dentro del cantón General Villamil Playas, para obtener resultados más confiables y específicos.

Comparar la técnica microscópica con la técnica de PCR de las muestras analizadas en las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Cruz Roja y Altamira dentro del cantón General Villamil Playas.

## 1.4 Marco teórico

La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida fundamentalmente por insectos de la subfamilia *Triatominae* (chinchas que se alimentan de la sangre). En los años 90, esta enfermedad afectaba, según estimaciones de la OMS, a 18 millones de personas en América Latina, extendiéndose desde México hasta Argentina; con alrededor de 100 millones de latinoamericanos que vivían en condiciones de riesgo de contagio (WHO, 2000).

La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y otros mamíferos, se ha atribuido a la diferencia natural que presenta *Trypanosoma cruzi*, el cual se demuestra al estudiar sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares. Así, se han encontrado gran variabilidad en el comportamiento de las cepas tanto “in vitro” como “in vivo”, y se han descrito posibles implicaciones del vector en la modulación de la virulencia de las cepas (Lehmann *et al.*, 2005).

Esta variabilidad en su comportamiento biológico y la diferencia que presenta en su caracterización bioquímica y molecular, han impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para sus estudios y control (Vallejo, 1999).

Según Mejía (2005), *Trypanosoma cruzi* es considerado como un organismo diploide, aunque su reproducción es básicamente clonal, su interacción sexual se restringe a algunas poblaciones selváticas, para lo cual mediante ensayos con isoenzimas y microsatélites se encontró que las cepas

de este protozoo son frecuentemente multiclonales y posiblemente, los pacientes y los vectores se infectan al menos con dos clones genéticamente diferentes.

Sin embargo, en estudios recientes se ha podido establecer que las poblaciones multiclonales que infectan un individuo, tiene clones con tropismo específicos a diferentes tejidos y es exactamente la distribución de estos clones lo que puede influir o determinar el curso clínico de cada paciente. También se ha observado que los clones predominantes en las cepas pueden ser los responsables del tropismo preferencial hacia órganos y tejidos específicos, y esto podría contribuir a diferentes patrones de manifestaciones clínico-patológica en un área geográfica determinada (Andrade & Magalhaes, 2001).

#### **1.4.1 Epidemiología**

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, la cual puede ser transmitida casi siempre por artrópodos de la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*. A este Triatomo hematófago se le conoce en el Ecuador con el nombre de chinche, vinchuca o chinchorro (Figura 1.3) y se ha calculado que en Latinoamérica alrededor de veinticinco millones de personas son portadoras de la enfermedad de Chagas y más de cien millones están en riesgo de contagio (Montiel & Días, 2002).



**Figura 1.3:** A la izquierda el parásito responsable de la enfermedad de Chagas *Trypanosoma cruzi* y a la derecha el vector *Triatoma dimidiata* causante de la enfermedad de Chagas (Cedillos, 2008).

Cada una de la parasitosis posee un ciclo epidemiológico característico, porque está relacionado directamente con el ciclo de vida del parásito infectante para su supervivencia en el medio de sus especies, así como también podemos tomar en consideración los factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad de Chagas ya que son de tipo geo-ecológico, biológico y social, las cuales influyen mucho en la aparición y la distribución de la parasitosis en las diversas zonas del mundo (Guevara, 2001).

#### **1.4.2 Situación de la *Trypanosomiasis* humana en América Latina**

La prevalencia de la enfermedad de Chagas es aún difícil de determinar con exactitud, debido a la gran variabilidad de las vías de transmisión, características de los parásitos con respecto a los tropismos tisulares, curvas de parasitemia, fases de desarrollo, patologías clínicas,

reservorios silvestres que varían en cada zona endémica (Botero & Restrepo, 2003).

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida desde 42° latitud norte (norte de California) y 43° latitud sur (sur de Argentina y Chile), sin embargo, la transmisión vectorial y silvestre es mucho más amplia (Figura 1.4) que de la enfermedad humana (WHO, 2000).



**Figura 1.4:** Área geográfica correspondiente a la distribución de los diferentes vectores en cada uno de los países que conforman iniciativas para el estudio de la enfermedad de Chagas (Guhl, 2007).

Según la OPS (1996), 18 países de América Latina son endémicos para la enfermedad, desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina (Figura 1.5), encontrándose prevalencias en Bolivia con 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%. Así también señalan que aproximadamente 300000 nuevos casos son reportados por año, 36 a 38 millones de personas están afectadas con la forma crónica de la enfermedad y 30000 a 50000 muertes se registran por año, lo que indica una gran problemática en la salud pública.



**Figura 1.5:** Área endémicas donde se ha encontrado casos de enfermedad de Chagas (WHO, 1996).

### 1.4.3 Enfermedad de Chagas en El Ecuador

En la actualidad se estima que Ecuador tiene una prevalencia de la enfermedad del 1.38% bajo investigaciones realizadas a la población en general que tiene la enfermedad, como Manabí, Portoviejo, El Oro, Guayas y algunas zonas endémicas de la región oriente como Sucumbíos (Grijalva *et al.*, 2003), lo que indica que alrededor de 176400 personas son seropositivas en nuestro país y alrededor de unas 3 a 5 millones de personas viven vulnerables al contagio, en zonas donde la transmisión vectorial se ha demostrado.

Se ha descrito como zonas endémicas a regiones en la provincia del Guayas, Manabí, El Oro y Loja (Chico *et al.*, 2001), así como también se ha descubierto focos de transmisión en el norte de la Amazonia (Sucumbíos, Napo y Orellana); sin embargo, poca información documentada se tiene de la provincia de Pastaza hasta la actualidad.

Como señala Grijalva *et al* (2008) y Grijalva *et al* (2011), se han estudiado varios vectores en el Ecuador los cuales son posibles transmisores de enfermedades causadas por parásitos Trypanosomatidos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1:** Investigaciones realizadas a diferentes vectores en el Ecuador para el análisis del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Autor/año	Lugar	% vectores analizados	Especie vector	Parásito encontrado
Villacis & Grijalva <i>et al</i> (2008) y Grijalva <i>et al</i> (2011)	Manabí	14	<i>Rodnius ecuadoriensis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Abad-Franch <i>et al</i> (2001)	Manabí	5	<i>Panstrongylus howardi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Guevara <i>et al</i> (1999)	Guayas	90	<i>Triatoma dimidiata</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Garzón *et al* (2002), también mostró datos porcentuales de la prevalencia de zonas estudiadas en Ecuador como indica el Cuadro 1.3.

**Cuadro 1.3:** Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en zonas endémicas del Ecuador (Garzón *et al.*, 2002).

<b>Zona estudiada</b>	<b>% de la enfermedad de Chagas</b>
Manabí	0,4
Guayas	1.2
El Oro	16.4
Pichincha	3.9

En cuanto a la incidencia de nuevos casos, se estima que unas 3000 personas adquieren la enfermedad de Chagas cada año si permanece la ausencia de un control epidemiológico adecuado y más de 300 muertos por año (Abad-Franch *et al.*, 2002).

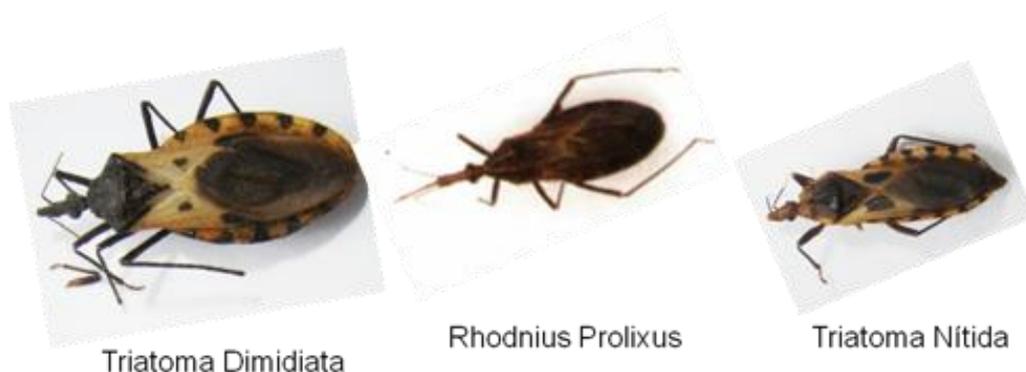
La mayoría de inmigrantes dentro del Ecuador y hacia fuera de él provienen de áreas endémicas para enfermedad de Chagas (Guevara, 2001). En 1999, se informó que la tasa de prevalencia era del 1.1% en el banco de sangre de la Cruz Roja de Guayaquil y del 6.9% en el banco de sangre de Machala (Guevara *et al.*, 1999), dando un estimado al número de contagios causados por vectores.

Según los datos publicados en el Boletín del Ministerio de Salud Pública en el 2007, señalan que por cada 100000 habitantes, las regiones del país que en orden de prevalencia se sitúan: región Oriente: con una tasa de 1.66, la región Costa: con una tasa de 0.31, la región Sierra con tasa de 0.08.

Se destaca la falta de datos correspondientes a la región insular (Naquira *et al.*, 2009).

Se ha estimado que alrededor de 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 cardiaca en la zona del Oro (Guevara, 2001).

Según Botero (2003), en Ecuador, existen más de cien especies de chinchorros, pero no todas estas especies transmiten la enfermedad. En el territorio ecuatoriano se han clasificado 15 especies, pero las más peligrosas por convivencia con el hombre son *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis*, vectores de mayor importancia epidemiológica. Especies que invaden hábitats humanos desde ecótipos silvestres: *Pastrongylus geniculatus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* y *Pastrongylus 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 *Trypanosoma cruzi* (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Imágenes de vectores causantes de la enfermedad de Chagas (Castner, 2000).

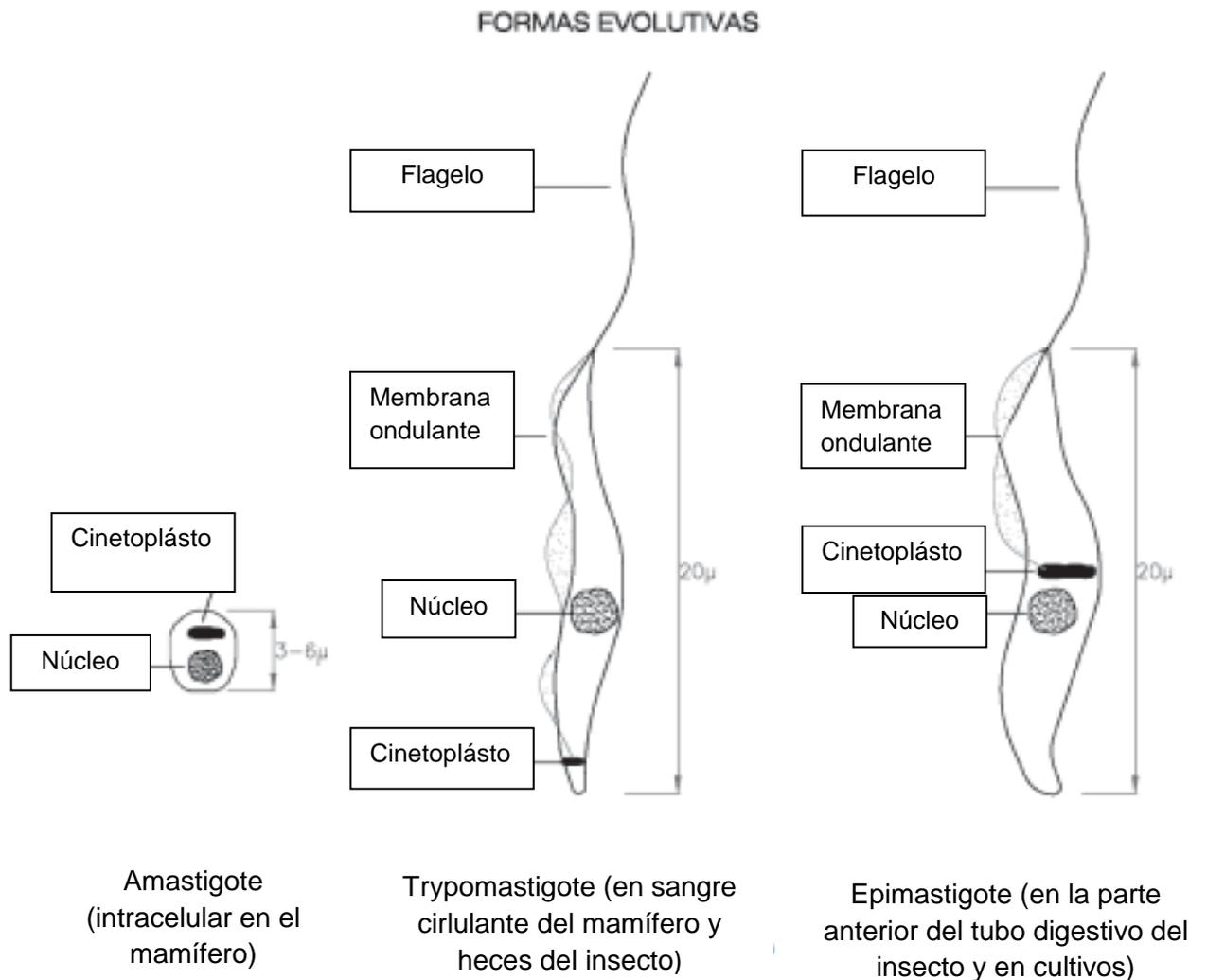
#### 1.4.4 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozooario hemoflagelado, que se caracteriza por presentar un solo flagelo y una sola mitocondria donde se sitúa el quinetoplasto, que es un organelo especializado que contiene el ADN (Kirchhoff, 1998 & Miles, 2000).

Según Guzmán (1999) y Álava (2011), presenta cuatro estadios morfológicos que se pueden diferenciar tanto en los distintos hospederos como en medios de cultivo favorables para su crecimiento:

- El tripomastigote metacíclico es flagelado, alargado con un gran núcleo central, cinetoplasto de gran tamaño y el blefaroblasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento. Este estadio presenta deficiente capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero
- El promastigote o tripomastigote sanguíneo es flagelado, alargado, con el cinetoplasto grande alejado de la pared 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.

- El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto. El cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central. Este estadio presenta división binaria longitudinal
- El amastigote es de forma redondeada llamada leishmanoide, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco. Tiene capacidad de replicación, por división binaria simple (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi* (Guzmán, 1999).

#### 1.4.5 Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*

La clasificación de los *Trypanosomas* está basada en un conjunto de criterios que incluye el ciclo de vida, morfología, el desarrollo dentro del invertebrado y la relación parásito-hospedero. La clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* sugerida por Botero & Restrepo (2003), es:

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

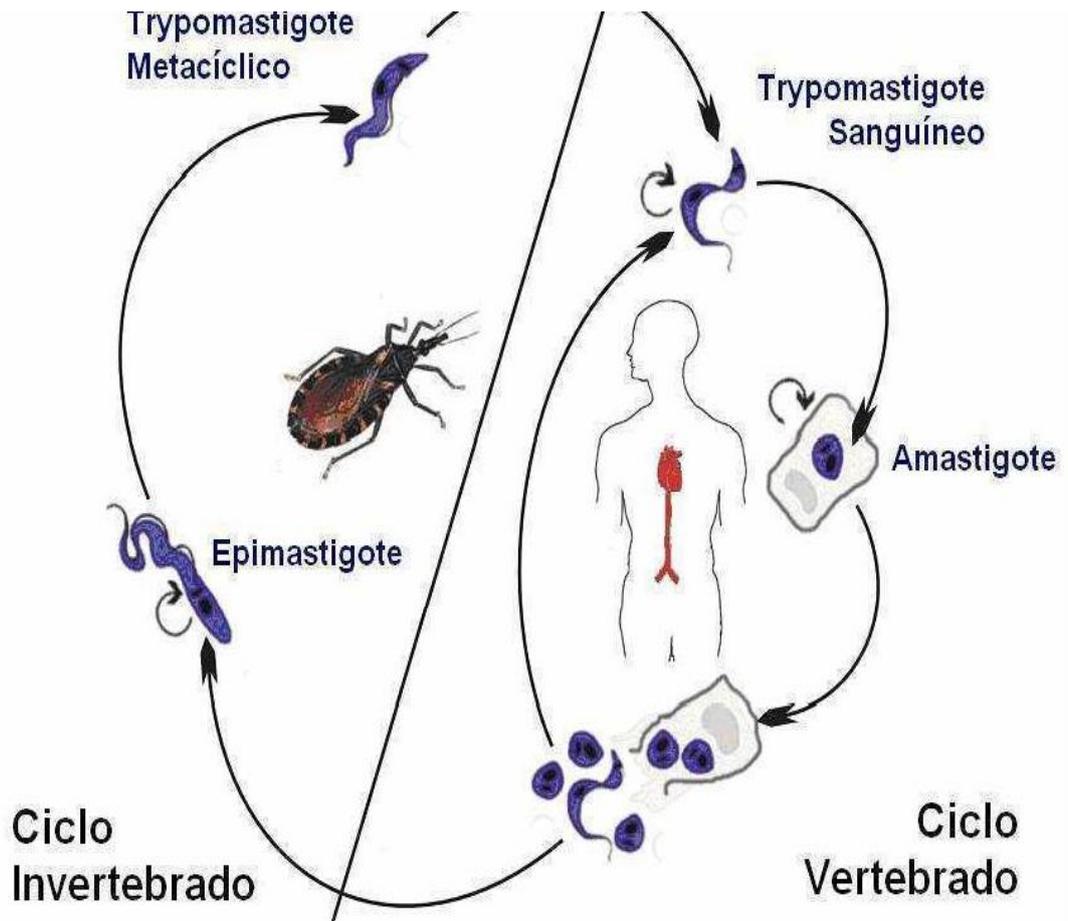
*Trypanosoma cruzi* se encuentra dentro del subgénero *Schizotrypanum* por tener un cinetoplasto voluminoso y multiplicarse intracelularmente dentro de sus huéspedes vertebrados. Pertenece a la Sección Stercoraria porque la forma infectante es transmitida por las heces del insecto vector (Paes & Rayol, 1996).

El cinetoplasto es una red de ADN extracelular localizada en un punto específico de la mitocondria (única en estos casos). Esta red de ADN representa una proporción importante del ADN total celular, ya que dependiendo de la especie, puede constituir de 10 al 20% del ADN total en la célula. El ADN del cinetoplasto está estructurado por la concatenación de dos tipos de moléculas circulares de ADN: los microtúbulos y los maxicírculos (Paes & Rayol, 1996).

#### **1.4.6 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

Según Noireau *et al* (1999), el vector de *Trypanosoma cruzi* es un insecto hematófago de la subfamilia *Triatominae*, este vector se infecta al chupar sangre del hombre o mamíferos con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Esta forma sufre transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector, los parásitos se multiplican muy rápidamente por fisión binaria pasando a epimastigotos y, al cabo de quince a treinta días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectantes no replicativas en el intestino posterior del triatoma.

Cuando el vector infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas (Abad-Franch *et al.*, 2000). 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. El ciclo se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por el insecto vector (Noireau, 1999; Abad-Franch & Aguilar, 2000) (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Freilij *et al.*, 1995).

*Trypanosoma cruzi* presenta una gran diversidad de huéspedes vertebrados. Anfibios y aves no presentan infección; pero ha sido demostrada la susceptibilidad en más de 200 especies y subespecies de mamíferos. Las raposas (*Didelphis* spp.), roedores (*Rattus* spp., *Mus musculus*) y armadillos (*Dasypus* spp.) son los principales reservorios silvestres, esto podría deberse al desequilibrio ecológico en cada zona, así también esta enfermedad se extiende al ambiente domiciliario y peri domiciliario afectando humanos y animales domésticos (Abad-Franch & Aguilar, 2000).

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

Según Grijalva (2001), *Trypanosoma cruzi* tiene una población altamente heterogénea, comprende un conjunto de células que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. Los aislamientos de *Trypanosoma cruzi* 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.

Desde 1950 se han realizado estudios en diferentes cepas del parásito, lo que ha permitido establecer que el *Trypanosoma cruzi* que proviene de diferentes transmisores, reservorios y regiones del mismo país, se comportan diferente al infectar experimentalmente animales de laboratorio, de acuerdo al nivel de parasitemia dentro del organismo y la invasión de ciertos órganos, causando desde daños leves hasta la muerte. Su comportamiento diverso depende de factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos (Bice & Zeledón, 1970).

Para conocer las bases biológicas de su variación génica, se ha aplicado métodos que nos permitan identificar las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* a nivel molecular, entre estos métodos tenemos los basados en lectinas, la caracterización de isoenzimas, propiedades bioquímicas e inmunológicas, la restricción del ADN de los mini círculos del cinetoplasto (Pinto-Días *et al.*, 1997), aun así a nivel molecular el estudio del genoma de *Trypanosoma cruzi* es muy limitado.

A pesar de la variabilidad existente, las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* fueron clasificadas en tres grupos sobre la base de sus perfiles isoenzimáticos (zimodemas Z1, Z2 y Z3) (Miles & Barrett, 1980). Conforme pasó el tiempo, la aplicación extensiva de métodos de electroforesis a diversos aislados de *Trypanosoma cruzi* llevó a la subdivisión de estos zimodemas a un gran número de pequeños subgrupos isoenzimáticos de alrededor de 43 (Tibayrenc, 2000).

Actualmente Miles (2002), reportó que algunos marcadores moleculares (genes del ARN ribosomal, genes mini-exón, microsatélites) y el análisis funcional de genes promotores permitieron la definición de dos grupos principales de *Trypanosoma cruzi* (descritos como linajes filogenéticos 1 y 2, que se corresponden ampliamente con Z2 y Z1, respectivamente); estos descubrimientos ayudaron a poner de manifiesto la complejidad de los ciclos selváticos de este parásito. También actualmente los taxones de *Trypanosoma cruzi* son agrupados en dos linajes principales: *Trypanosoma cruzi* I (zimodema Z1 o linaje 2) y *Trypanosoma cruzi* II (zimodema Z2 o linaje I, que incluye cuatro subgrupos [IIa=Z3, IIb=Z2, IIc=Z3/Z1 ASAT, IId=Z2 Boliviano y IIe=Z2 Paraguayo]).

#### **1.4.8 Mecanismos de transmisión del *Trypanosoma cruzi***

La mayoría de los casos de infección humana es en áreas rurales en donde la transmisión se produce a través del contacto de la piel o las mucosas del huésped con las heces u orina contaminada de los insectos vectores Triatomíneos, por lo general, cuando ocurre la picadura del vector al huésped durante el proceso de alimentación. De esta manera los humanos entran a formar parte del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, en calidad de huésped accidental (Botero, 2003).

Los reservorios de *Trypanosoma cruzi* son de tipo animal (armadillos, ratones de campo, perros, gatos, cerdos, gallinas, etc.) y humano. La transmisión casi siempre es producida por artrópodos de la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatomidae*, que incluye varios géneros que pueden transmitir la enfermedad. 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 (Guevara, 1999).

En zonas urbanas, sin presencia del vector, la principal vía de transmisión de *Trypanosoma cruzi* puede ser la transfusión sanguínea tanto de sangre total como de hemoderivados, este modo de transmisión es un problema potencial inclusive en zonas no endémicas debido a la migración de la población desde zonas rurales hacia zonas urbanas, se incrementa la posibilidad de infección a través de la sangre infectada (Guevara *et al*, 2000).

*Trypanosoma cruzi* también puede ser transmitido por otras rutas: la vía congénita, trasplante de órganos, 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 & Aguilar, 2000).

#### **1.4.9 Transmisión vectorial**

La infección por transmisión vectorial ocupa el mayor porcentaje en el contagio (80%) producida por hematófagos obligatorios de la subfamilia *Triatominae* (Álava, 2011).

Según Ayala (2009), los Triatominos (chinches hematófagas) comparten algunas características fundamentales, como su alimentación que es a base de sangre y por lo tanto se utiliza para agruparlos en la subfamilia *Triatominae* (dentro de la familia *Reduviidae*). Prácticamente todo el resto de los insectos de la familia *Reduviidae* son predadoras o sea se alimentan de otros insectos.

Los *Triatominae* se dividen en cinco tribus, siendo las más importantes *Triatomini* y *Rodniin*. Todos los triatominos con importancia epidemiológica (*Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*) pertenecen a estas dos tribus (Figura 1.9). Las otras (*Cavernicolini*, *Bolboderini* y *Alberproseniini*) nunca han sido involucradas en la transmisión de la enfermedad en humanos (Ayala, 2009).



**Figura 1.9:** Principales vectores de la Enfermedad de Chagas (Ayala, 2009).

El vector más importante de la enfermedad de Chagas en el Ecuador es *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 peri doméstico, 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 (Grijalva *et al.*, 2000).

La amplia distribución del parásito está íntimamente relacionada 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 2650msnm (Abad-Franch *et al.*, 2001).

Según Schofield (1994), *Triatoma dimidiata* tienen el aspecto similar al de los 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, posee manchas características de gran importancia taxonómica.

Así también, *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 (Villacís *et al.*, 1999).

Generalmente los jóvenes y niños son los más afectados de la transmisión vectorial, estos *Reduviidos* 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 Romaña. En diferentes especies de Triatominos, la susceptibilidad a diferentes cepas del parásito varía así como la capacidad del parásito en diferenciarse en formas infectantes meta cíclicas (Pinto-Días *et al.*, 1997).

*Triatoma dimidiata*, se encuentra distribuido desde el norte de América del Sur (Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú) pasando por todos los países de América Central hasta llegar a México. Habita diversos ambientes incluyendo rocas apiladas, cuevas de murciélagos y agujeros en los árboles ocupados por mamíferos y aves. En las zonas ecuatorianas, especialmente la costa, estos insectos habitan especialmente aéreas de mucha maleza herbácea, así como también dentro de los domicilios que presentan imperfecciones en su construcción, siendo este un ambiente favorable para su reproducción y alimentación (Botero & Restrepo, 2003).

Según Guevara (1999), *Triatoma dimidiata* es generalmente introducido al domicilio humano accidentalmente, como por ejemplo, a través de la leña que las personas requieren para su supervivencia diaria. Se ha demostrado que esta clase de insectos migra eficientemente desde hábitat selvática a domicilios, ya que es un insecto que tiene la capacidad de caminar en todos sus estadios y posteriormente llegado a la adultez cuentan con la capacidad de vuelo.

Este Triatomino, si bien es común en zonas rurales, también se lo puede conseguir en zonas urbanas, esta tendencia a invadir zonas urbanas es

acentuada tanto por la pérdida de su hábitat natural como por la presencia de animales domésticos tales como perros y gallinas, animales salvajes como las ratas y las raposas, en la cercanía de los domicilios (Guevara, 1999).

*Triatoma dimidiata* surgió como especie en algún lugar de Centroamérica y luego se expandió por toda esta región hasta llegar al norte, a la parte central de México, y al sur al Oeste de Ecuador. Actualmente esta especie incluye poblaciones distinguibles morfológica y genéticamente. De hecho, la variación cromosómica entre diferentes poblaciones indican que *Triatoma dimidiata* representa un complejo de especies (Abad- Franch, 2001).

En 1997 se da inicio a la “Iniciativa para América Central”, un proyecto promovido por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud, que tiene como uno de sus objetivos primordiales la disminución de los índices de *Triatoma dimidiata* en hogares infectados. Se ha evaluado diferentes métodos para cumplir con este objetivo, y el más utilizado ha sido la fumigación de las viviendas infectadas con insecticidas. Sin embargo, las sustancias químicas utilizadas para exterminar a los Triatomos constituyen un riesgo para la salud humana (OMS, 1997).

Además son frecuentes las reinfecciones, propiciadas por el hecho de que esta especie también puede vivir en el medio extradomiciliar desde donde recoloniza la vivienda pasado el efecto tóxico de la fumigación. Por ello hay quienes consideran más adecuados aquellos métodos de control alternativos que incluyen una mejora de ciertas condiciones de la vivienda humana, diseñadas para desfavorecer la recolonización (Zeledón, 2006).

#### **1.4.10 Transmisión por transfusión sanguínea**

Se tiene conocimiento de otros mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas como la transfusión de sangre o hemoderivados que son provenientes de individuos infectados por *Trypanosoma cruzi* como causa de casos fatales de la enfermedad de Chagas aguda (Villalba et al., 1992). Esta es la segunda forma de transmisión más importante de la enfermedad de Chagas, actualmente la enfermedad no solo se encuentra en Latinoamérica, pero por las altas tasas de inmigración se ha visto que se pueden encontrar casos de infección en países desarrollados donde la enfermedad no es endémica (WHO, 2000).

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

En América Latina existe un 2-10% de riesgo de contraer la infección por transmisión transplacentaria, es decir aproximadamente entre el 10-20% de las mujeres embarazadas con la enfermedad corren el riesgo de transmitir la enfermedad a sus hijos (Pinto-Días *et al.*, 1997). En humanos se ha podido determinar que el contagio puede ocurrir entre el tercero y quinto mes de gestación, dependiendo de la infección o colonización y daño del parásito a la placenta, desde donde la enfermedad es capaz de causar la infección al feto (Wendel, 1992).

El feto puede presentar varias manifestaciones clínicas que pueden ir desde síndromes agudos, que pueden ser fatales para el feto, hasta cuadros asintomáticos. Según Wendel (1992), otro factor importante en la transmisión congénita, es que la madre puede transmitir IgG al feto, las pruebas

serológicas convencionales no detectan la enfermedad en el hijo, particularmente durante los primeros 4 a 5 meses de vida del nacido.

El método congénito de la enfermedad de Chagas se lo realiza por métodos parasitológicos y detección de anticuerpos IgM específicos de la enfermedad. 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 bebe y su posterior tratamiento (Wendel, 1992).

#### **1.4.12 Formas excepcionales de transmisión**

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

Esta transmisión es muy común en hospitales o laboratorios por el manejo inadecuado de agentes biológicos contaminados como: manejo del vector, cultivos, animales de experimentación infectados, muestras de sangre por parte de los investigadores o del equipo de colaboradores que no cumplen con las medidas de bioseguridad de los laboratorios. Aproximadamente 60 casos han sido reportados por accidentes de laboratorio (Pinto-Días *et al.*, 1997).

##### **1.4.13 Clínica de la enfermedad**

La enfermedad de Chagas, desde el punto de vista clínico, es una afección compleja. Luego de la infección, el periodo de incubación puede variar

de 7 a 10 días en los casos de transmisión vectorial y hasta 4 meses en el contagio por transfusiones sanguíneas (Guevara *et al.*, 1999).

Según Botero & Restrepo (2003), la enfermedad de Chagas que sufre el huésped vertebrado puede clasificarse en tres etapas: Una fase aguda de corta duración, que se define como una infección en la que existe parasitemia latente (detectable por métodos parasitológicos directos), usualmente los síntomas de esta infección no son característicos y por lo general no se asocian con *Trypanosoma cruzi*.

Sin embargo, la mayoría de individuos se recuperan de la fase aguda de la enfermedad inclusive sin tratamiento específico, también puede presentarse síntomas como 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 (Abad-Franch & Aguilar, 2000).

Otra etapa bastante duradera es la fase crónica y la 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 (Botero, 2003).

Según Botero (2003), 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 periodo puede de todos modos variar ampliamente; así, en contaminaciones con grandes volúmenes de inóculo (como accidentes de laboratorio con material altamente infectado) el periodo puede ser menor; además, el tiempo de incubación es imposible establecer con precisión en los pacientes asintomáticos.

La fase de latencia 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 la enfermedad de Chagas, ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad, electrocardiograma convencional y corazón, colon y esófago radiológicamente normales (Botero & Restrepo, 2003).

Los estudios de Pumarola *et al* (1978), han demostrado que los 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 cardíacas y/o digestivas (30-50%); la muerte súbita acontece en un porcentaje mal definido de pacientes, lo que obliga a imponer algunas restricciones laborales. 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 cardíacos y digestivos crónicos después de 10 a 25 años.

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 (Botero & Restrepo, 2003). Durante esta fase 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).

La forma cardiaca, es la más estudiada, más común y fácil de diagnosticar, las manifestaciones clínicas dependen del grado del daño al miocardio, arritmias, y el grado de falla cardiaca (Wendel, 1992).

Según Wendel (1992), las formas neurológicas, están involucradas con sistema nervioso central, autónomo o periférico, estas son formas clínicas más desconocidas, 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.

#### **1.4.14 Métodos de diagnóstico**

La Organización Mundial de la Salud (2000), recomienda utilizar al menos tres pruebas diagnósticas para confirmar los resultados positivos. De acuerdo a la fase de la enfermedad en la que se encuentren los individuos, se han desarrollado diferentes pruebas que presentan diferente grado de sensibilidad y especificidad para la detección del parásito (Franch *et al.*, 2000).

Los diferentes métodos actualmente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en las diferentes etapas clínicas de la enfermedad, se 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 (Botero, 2003).

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 que otros métodos parasitológicos directos usados, examen directo de sangre periférica, gota gruesa y extendido de sangre periférica, método de strout y hemocultivos, y como métodos indirectos usados como el xenodiagnóstico en donde los cultivos en células diploides humanas o en el medio Novy, McNeal, Nicolle (NNN) constituyen el procedimiento de elección, especialmente cuando se trata de detectar parásitos. En los cultivos aparecen en forma de epimastigotes (Abad-Franch, 2001).

El xenodiagnóstico es un método no empleado en la actualidad, aunque de indudable utilidad. Para el diagnóstico 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 (Pumarola et al, 1978), en la fase crónica, en donde existe alta cantidad de anticuerpos anti-*T.cruzi* los métodos indirectos son los más 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 diagnóstico de Chagas en las tres etapas clínicas de la enfermedad.

#### **1.4.14.1 Métodos directos**

Por lo general, la observación directa del parásito 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 & Nicholls, 2001).

##### **Examen directo de sangre fresca.**

Consiste en la observación mediante microscopio óptico de tripomastigotes meta cíclicos moviéndose vigorosamente, para ello se toma una gota de sangre de sangre periférica por punción digital con lanceta y se coloca en un porta objetos. Es un método que presenta una sensibilidad del 90% en una fase aguda de la enfermedad, mientras que en la fase crónica su sensibilidad es menor al 10% (Botero & Restrepo, 2003).

##### **Gota gruesa y extendida de sangre periférica.**

Para esta técnica se cuentan leucocitos y parásitos simultáneamente. El conteo se detiene cuando se llega a 100 leucocitos y se han identificado dos o más parásitos. Se buscan los tripomastigotes metacíclicos fijados, con sus estructuras características: formas alargadas, en C o en S, con núcleo,

cinetoplasto, flagelo y membrana ondulante. Este método tiene una sensibilidad menor al 60% en la fase aguda (Botero, 2003).

### **Método de strout**

Se toma una muestra de sangre en tubo seco, se deja que se retraiga el coágulo, centrifugamos (600g) 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 & Nicholls, 2001). Este método cuenta con una sensibilidad del 90 y 100% en la fase aguda pero no llega al 10% en la fase crónica (Botero & Restrepo, 2003).

### **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 & Nicholls, 2001).

### **Técnicas moleculares**

Con la llegada 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 (Junqueira *et al*, 1996).

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 de PCR son la detección de parásitos en la transmisión congénita y en individuos crónicos infectados (Guhl & Nicholls, 2001).

Diversas investigaciones han estudiado la variabilidad genética del parásito y su posible relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En *Trypanosoma cruzi* se han utilizado diferentes marcadores bioquímicos y moleculares para tratar de correlacionar la diversidad genética del parásito con sus características biológicas. El uso del espaciador intergénico de los genes mini-exón genera dos claras divisiones filogenéticas conocidas como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, las cuales permiten establecer algunas asociaciones importantes entre la taxonomía y la biología del parásito, el desarrollo de la enfermedad y diferentes parámetros epidemiológicos, entre otros (Moser, 1989).

#### **1.4.14.2 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 está el xenodiagnóstico, que son métodos de laboratorios más especializados (Guhl & Nicholls, 2001).

#### **Xenodiagnóstico.**

Es preciso contar con Triatominos libres de infección criados en el laboratorio, y se realiza examinando las heces de *Reduviidos* bajo microscopio 40X, que han picado al paciente, a los 10- 30 días de la picadura, para detectar formas de *Trypanosoma cruzi*. Este método presenta una sensibilidad de 100% en casos agudos y de 36% en la fase crónica (Botero & Restrepo, 2003).

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 & Nicholls, 2001).

#### **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 *Trypanosoma cruzi* son de la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por anticuerpos de tipo IgG a medida que progresa la enfermedad (Botero & Restrepo, 2003).

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

La prueba de ELISA se basa en la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma spp*, consiste en fijar el antígeno sobre una fase sólida, a la cual posteriormente se adicionan las muestras que pueden o no contener los anticuerpos específicos, la unión antígeno-anticuerpo puede ser evidenciado con una reacción de un conjugado en el cual actúa la enzima y sustrato dando origen a un cambio de color que puede leerse 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, presenta una sensibilidad y especificidad de 98% en suero, y de eluidos de sangre (separación de los anticuerpos unidos a las membranas de los hematíes), recolectados en papel filtro presenta una concordancia de 96% (Botero & Restrepo, 2003).

### **Inmuno-fluorescencia indirecta (IFI)**

Se basa en el uso de láminas portaobjeto con áreas circulares que contienen epimastigotes de *Trypanosoma 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 & Nicholls, 2001).

Este tipo de prueba tiene una especificidad y una sensibilidad de hasta el 100%, así reemplazando a la prueba clásica de reacción de fijación del complemento (Botero & Restrepo, 2003).

### **Hemaglutinación indirecta (HAI)**

Se basa en la aglutinación de glóbulos rojos de humanos, sensibilización con antígenos de *Trypanosoma 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 contra luz o utilizando un fondo de contraste. La sensibilidad es mayor en las formas crónicas que en las agudas y la especificidad se considera buena (Botero & Restrepo, 2003).

#### **1.4.15 Control del vector**

Este método consiste en romper el ciclo biológico del vector y así evitar la transmisión de la enfermedad, aplicando una aspersion con insecticidas específicos para la eliminación del insecto causante de la enfermedad y mejorando las condiciones de las viviendas ya que la chinche puede dispersarse al interior de la viviendas en donde se alimenta de sangre de humanos y de la sangre de animales domésticos a los que eventualmente

puede transmitir el parásito (Salazar-Schettino *et al.*, 1997; Cruz-Reyes & Pickering-López, 2006).

Es necesario disponer de adecuados materiales de construcción, introduciendo cambios para reemplazar las hojas de palma de los techos por otros materiales como zinc, tejas de barro o similares que no sean aptos para la colonización de los vectores, usar cemento en lugar de tierra en los pisos (Botero & Restrepo, 2003).

Así, también Botero (2003), comenta que el control de los vectores debe realizarse con medios químicos, mediante el rociamiento convencional con insecticidas, como hidrocarburos clorados y otros insecticidas diferentes al DDT utilizados hace 40 años atrás que no resultaron adecuando para la eliminación de los insectos vectores.

Actualmente se utiliza con buenos resultados los piretroides sintéticos como el deltametrín, permetrín o cipermetrín. El deltametrín en agua se aplica de 25 a 50 mg por metro cuadrado y, así se mantienen las viviendas libres de vectores durante uno o dos años. En general estos últimos insecticidas son productos de muy baja toxicidad (Botero & Restrepo, 2003).

### **1.5 Hipótesis global de investigación**

El parásito *Trypanosoma cruzi* Tipo II está presente, de manera significativa y distinta, en todas las muestras de vectores de *Triatoma dimidiata*

recolectadas en las cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas.

## **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.

Directora del Proyecto MSc. María Augusta Chávez, Docente-investigadora, del Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología.

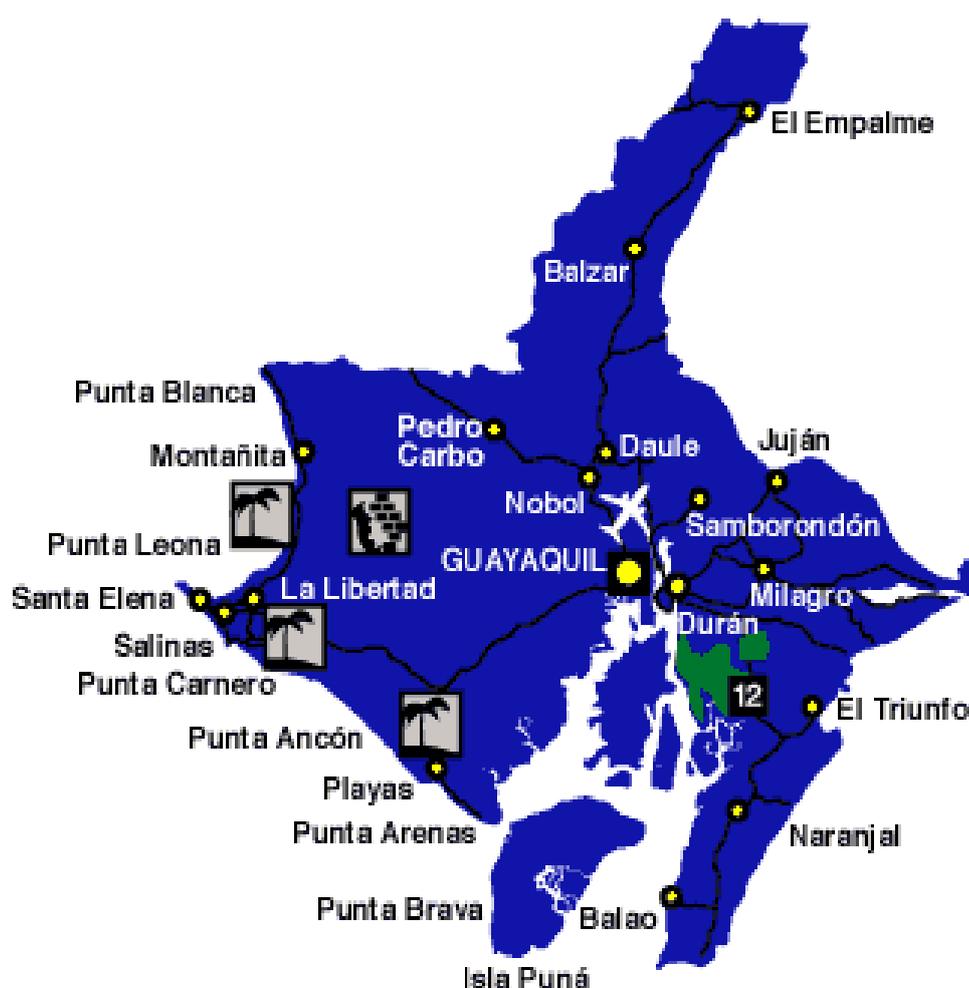
Codirector del Proyecto Ing-Mat Pedro Romero Saker, Docente, del Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología.

#### **2.2 Zona de estudio**

La zona en la cual se ejecutó este proyecto se encuentra ubicada en la provincia de Guayas, en el cantón General Villamil Playas que está localizado a 96 kilómetros de Guayaquil. Limita al norte y este con los cantones Guayaquil y Santa Elena; al sur y oeste con el Océano Pacífico. La comunidad de Playas es una pequeña aldea con zona rural que consiste en aproximadamente de 279,90 km<sup>2</sup>, con 14 km de playa, una de las mayores en el sur del Océano

Pacífico; ecológica, la zona corresponde a un bosque seco tropical, con temperaturas que oscilan de 23°C de Mayo a Diciembre, temporada de Verano, a 30°C enero hasta abril, durante la temporada de invierno, con estaciones lluviosas definidas. La población del cantón es básicamente urbana de aproximadamente 31.000 habitantes (Consejo Provincial del Guayas) (Figura 2.1).

El estudio fue realizado en las comunidades de Altamira, Barrio Lindo, El Morrón y Cruz Roja y el procesamiento de las muestras fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Parasitología Molecular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.



**FIGURA 2.1:** Ubicación del cantón Playas, provincia de Guayas (SNEM, 2010).

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

El inicio del proyecto fue a principios del mes de agosto del 2010, y su finalización fue en septiembre del 2011.

## **2.4 Análisis estadístico**

En primer lugar se emplean técnicas estadísticas descriptivas, que constituyen el análisis exploratorio inicial de los datos obtenidos. Seguidamente se procede a la aplicación de técnicas inferenciales con el propósito de deducir aspectos relacionados con las poblaciones muestreadas.

Las muestras obtenidas de *Triatomas dimidiatas* fueron tomadas en cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas provincia del Guayas. Se realizó un muestreo en cada casa designada para el análisis, para cada una de las comunidades; se efectuó un muestreo de cinco días laborables conjuntamente con miembros del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores.

### **2.4.1 Prueba de hipótesis**

Para la prueba de hipótesis se utilizó la estimación de la diferencia entre dos proporciones, en el contexto de un muestreo aleatorio simple a partir de muestras de igual tamaño. Con el programa InfoStat® se calculó el tamaño

de la muestra desde cada población y los valores asociados de potencia para la prueba de hipótesis de no diferencias de proporciones.

Para realizar las pruebas estadísticas se tomó en cuenta la cantidad de la concentración de ADN en las muestras analizadas, el número total de vectores muestreados en las cuatro comunidades y 25 muestras tomadas al azar para realizar las pruebas de PCR (tabla 2.1, 2.2 y 2.3).

**Tabla 2.1:** Número de Triatomino recolectados en las cuatro comunidades de estudio.

<b>Comunidades</b>	<b>Numero de triatomas analizados</b>
Barrio Lindo	112
El Morrón	11
Altamira	9
Cruz Roja	74
<b>TOTAL</b>	<b>206</b>

**Tabla 2.2:** Muestras tomadas al azar analizadas con primers S35 y S36 para PCR.

<b>Barrio</b>	<b>Número de muestras de los vectores positivos</b>
Barrio Lindo	6
El Morrón	6
Altamira	6
Cruz Roja	7
<b>Total</b>	<b>25</b>

**Tabla 2.3:** Concentración de ADN de 25 muestras tomadas al azar para el análisis de caracterización molecular.

<b>Muestra</b>	<b>Barrio</b>	<b>Concentración de ADN (ng/uL)</b>
Heces	Barrio Lindo	30.9
Heces	Barrio Lindo	36.1
Heces	Barrio Lindo	191.1
Heces	Barrio Lindo	257.3
Heces	Barrio Lindo	165.8
Heces	Barrio Lindo	65.9
Heces	El Morrón	30.8
Heces	El Morrón	97.8
Heces	El Morrón	83.9
Heces	El Morrón	80.2
Heces	El Morrón	125.2
Heces	El Morrón	155
Heces	Altamira	134.2
Heces	Altamira	179.9
Heces	Altamira	178.4
Heces	Altamira	223.1
Heces	Altamira	63.9
Heces	Altamira	122.1
Heces	Cruz Roja	750.4
Heces	Cruz Roja	529
Heces	Cruz Roja	516.8
Heces	Cruz Roja	46.9
Heces	Cruz Roja	54.8
Heces	Cruz Roja	37.6
Heces	Cruz Roja	94.9

#### 2.4.2 Hipótesis de investigación

- El parásito *Trypanosoma cruzi* Tipo II está presente, de manera significativa, en las muestras de vectores de *Triatoma dimidiata* recolectadas en la comunidad Barrio Lindo del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas.

- El parásito *Trypanosoma cruzi* Tipo II está presente, de manera significativa, en las muestras de vectores de *Triatoma dimidiata* recolectadas en la comunidad El Morrón del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas.
- El parásito *Trypanosoma cruzi* Tipo II está presente, de manera significativa, en las muestras de vectores de *Triatoma dimidiata* recolectadas en la comunidad Altamira del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas.
- El parásito *Trypanosoma cruzi* Tipo II está presente, de manera significativa, en las muestras de vectores de *Triatoma dimidiata* recolectadas en la comunidad Cruz Roja del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas.
- La prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en los vectores *Triatoma dimidiata* no es igual en las cuatro comunidades muestreadas.

Para demostrar las hipótesis de investigación se realizó un análisis de varianza no paramétrico (Prueba de Kruskal-Wallis), el cual permitió la clasificación para comparar las esperanzas de dos o más distribuciones sin necesidad de realizar el supuesto de los términos de error que se distribuyen normalmente.

También se probó nuestro sistema de hipótesis de investigación con la prueba de DCA, la cual permitió probar la hipótesis de independencia. La distribución exacta del análisis estadístico bajo la hipótesis nula se basa en la distribución de los recuentos condicionados sobre las frecuencias marginales (Rosner, 2010).

Para dar un criterio de rechazo o de aprobación a nuestros sistemas de hipótesis, en InfoStat® se realizó la prueba de Duncan que es mucho más sensible que ANOVA.

### **2.4.3 Unidad primaria de información**

La unidad primaria de información fue la microscopía realizada a los *Triatomas dimidiata* y posteriormente la caracterización de las cepas de las muestras positivas encontradas con *Trypanosoma cruzi* recolectados en las cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas en la provincia del Guayas.

### **2.4.4 Variables de respuesta**

Presencia de *Trypanosoma cruzi* en las muestras recolectadas del vector *Triatoma dimidiata* en las cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas.

### **2.4.5 Factores controlables**

Sitios de muestreo, tiempo de muestreo.

#### **2.4.5 Factores no controlables o de ruido**

Temperatura ambiental, humedad ambiental, número de personas en el área de trabajo, actividades del personal en el área de trabajo.

#### **2.4.7 Análisis**

El análisis de los resultados se realizó con ayuda del programa estadístico InfoStat®, donde se generaron los análisis de complementación para probar cada uno de los sistemas de hipótesis planteadas en este estudio.

#### **2.4.8 Interpretación**

La información obtenida se interpretó con el fin de determinar la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en los vectores recolectados en las cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas, provincia del Guayas. Así como también se analizó las PCR obtenidas para su caracterización.

## **2.5 Procedimiento**

### **2.5.1 Fase de campo**

#### **Recolección y análisis del material fecal de Triatominos**

La recolección de los Triatominos se realizó en cuatro comunidades del cantón General Villamil Playas en la provincia de Guayas, con la ayuda del equipo técnico del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Trasmitidas por Vectores (SNEM), los vectores fueron colectados por medio de búsquedas domiciliars y peri domiciliars, para su establecimiento se utilizó el plan de seguimiento que el SNEM contaba hasta la presente fecha de recolección de muestras.

Para identificar los triatomas recolectados en la zona de estudio se utilizaron 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).

Los especímenes se recolectaron en frascos de plástico, previamente etiquetados y con un apropiado sistema de ventilación (mediante huecos en sus alrededores), para facilitar el transporte y la supervivencia de los mismos (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Recolección del vector *Triatoma dimidiata*.

Posteriormente se trasladó las muestras de Triatominos recolectados a las instalaciones del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Central del Ecuador.

### **2.5.2 Fase de laboratorio**

#### **Observación microscópica**

Para determinar el nivel de infestación por *Trypanosoma cruzi* en el vector, se realizó la observación microscópica del contenido de heces fecales 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 analizó las ninfas de cuarto y quinto estadio y adultos (Figura 2.3).



**Figura 2.3:** Clasificación de *Triatoma dimidiata* (SNEM, 2010).

Mediante presión abdominal se obtuvo el material fecal de los Triatominos previamente alimentados con la sangre de ratones blancos de laboratorio sanos, estas muestras se disolvieron en solución salina fisiológica y fueron observadas al microscopio de luz (Carl Zeiss Jena®), con objeto 40X en búsqueda de trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, los cuales son formas móviles del parásito que se observan fácilmente (Figura 2.4).



**Figura 2.4: A.** Triatomíneos alimentados con ratones blancos de laboratorio



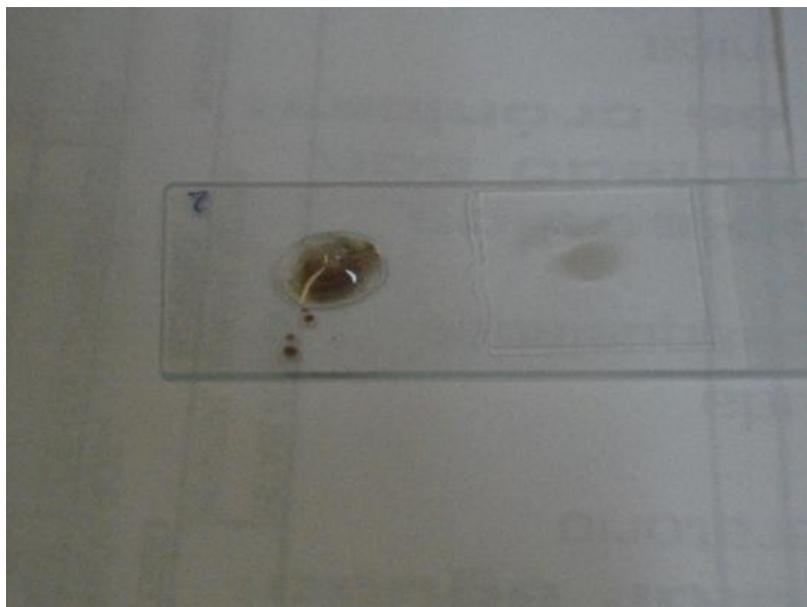
**Figura 2.4: B.** Presión abdominal para extraer muestra de heces fecales del vector.

En el caso de que las muestras de heces fecales no sean proporcionadas por presión abdominal, se procedió a realizar una punción en el abdomen del vector para extraer el contenido abdominal, este procedimiento se realizó con una jeringa de insulina, con 0,5 mL de solución salina fisiológica al

0,9%, posteriormente se observó la presencia o ausencia de *Trypanosoma cruzi* en la muestra (Figura 2.5).

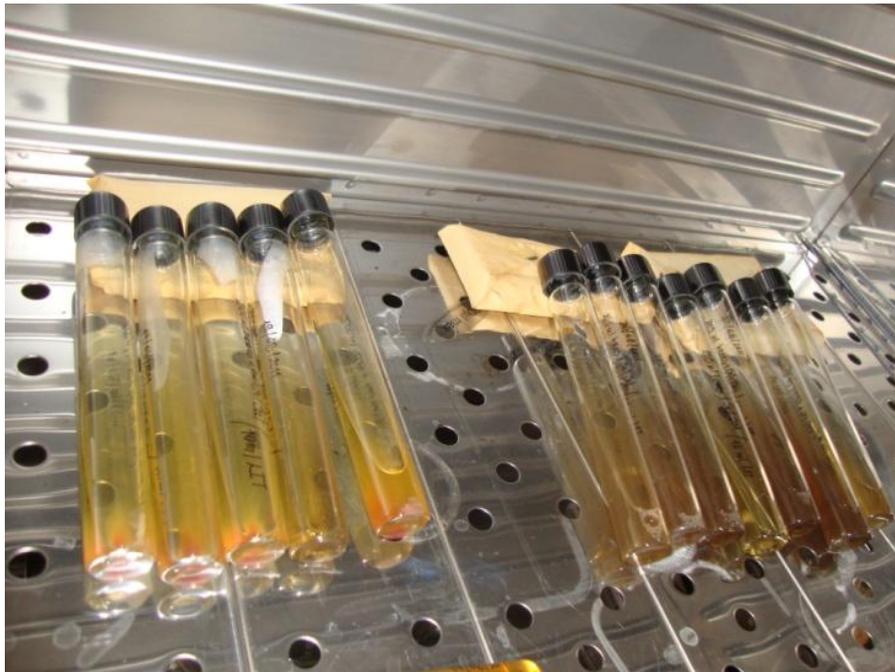


**Figura 2.5: A.** Punción con jeringa de insulina conteniendo solución salina fisiológica estéril.



**Figura 2.5: B.** Muestra de heces fecales del triatomino lista para observación microscópica.

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 (Figura 2.6).

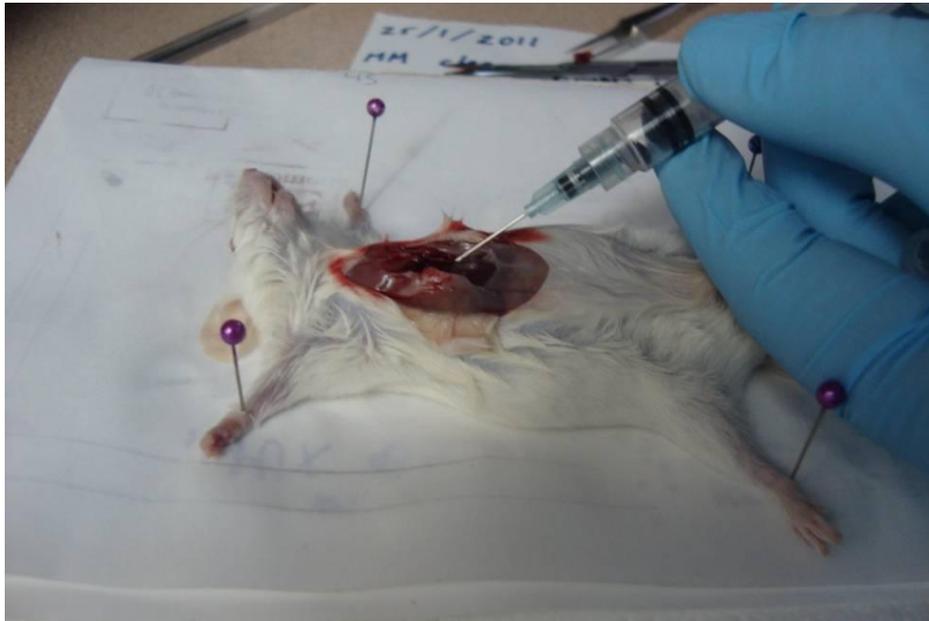


**Figura 2.6:** Inoculación en medio de cultivo líquido LIT.

### **Infecciones experimentales**

En los casos de triatomas con resultados positivos, se procedió a tomar parte de la muestra y se realizó inoculaciones en animales de laboratorio para desarrollar una infección experimental que permita luego aislar el parásito en los medios apropiados, para lo cual se inoculó a tres ratones blancos de laboratorio (Bioterio de la Universidad Central del Ecuador), con 1,5 mL de heces de triatomos para aislar la cepa, después de obtener parasitemia visible en estos, se procedió a hacer punción cardíaca, por cada ratón se

recolectó aproximadamente 1 - 2.5 mL de sangre para posteriormente proceder a infectar con 0.5 mL a seis nuevos ratones de 10 semanas, 25 gramos, con  $10 \times 10^6$  trypomastigotes / mL (Figura 2.7).

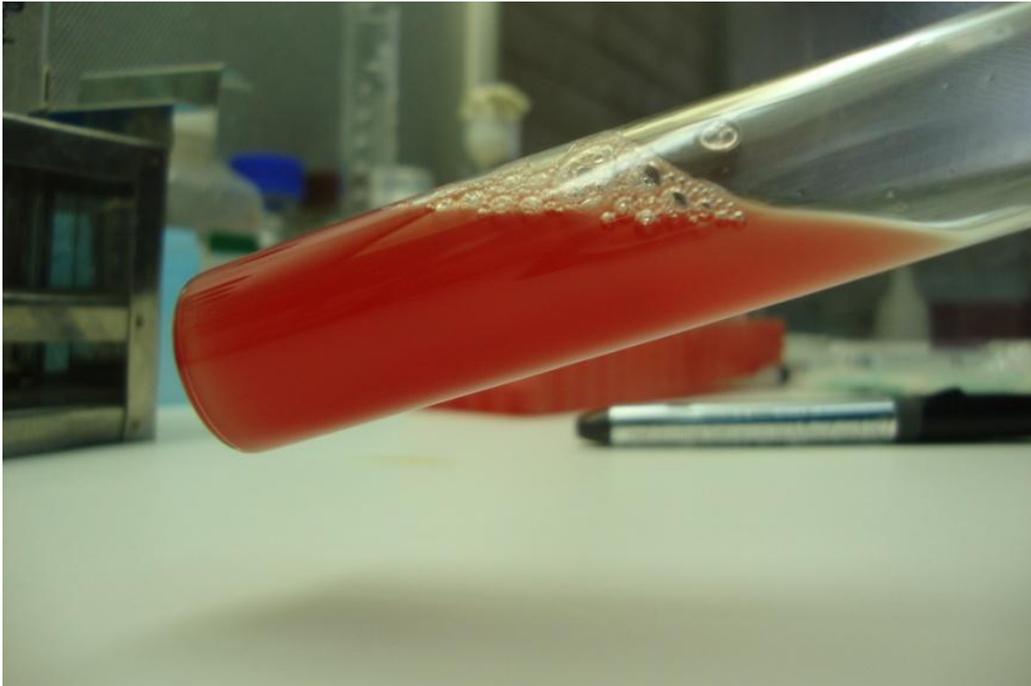


**Figura 2.7:** Punción cardiaca de ratón.

A partir de los 7 días de infección se procedió a observar posible parasitemia en los ratones previamente inoculados con el parásito, en la verificación de parasitemia visible se utilizó una gota de sangre fresca de la cola del ratón, la cual fue desinfectada con alcohol y se realizó un corte en la punta de su cola, esta gota de sangre se observó al microscopio (Carl Zeiss Jena) campo por campo hasta ver posible parasitemia dentro de la placa.

Posteriormente a la presencia de parásitos en la sangre del ratón, se procedió a realizar hemocultivos en la cámara de flujo laminar (EACH®) con todas las condiciones de esterilidad en medio líquido LIT (Triptosa de Infusión de Hígado), se realizó punción cardiaca en el ratón y se tomó 1.5 mL de sangre

del ratón infectado en 10 mL de medio LIT, se dejó en la incubadora a 28°C por 35 días para observar crecimiento del parásito dentro del medio líquido, se mantuvo diariamente observación continua a los medios para descartar contaminación (Figura 2.8).



**Figura 2.8:** Hemocultivo de la sangre de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

### **Aislamiento y cultivos de *Trypanosoma cruzi***

Para el aislamiento se utilizó el medio líquido de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose), como se describe a continuación en la Tabla 2.4. Para la recolección de las heces de los triatomas positivos mediante observación microscópica, se lavó la parte posterior del vector con una solución a base de solución salina fisiológica estéril, estreptomycin 10000 µg/ml, penicilina 10000 units/mg y gentamicina 10000 µg/mL. Cada 24 horas se observó los cultivos

para comprobar esterilidad y a partir de los 35 días aproximadamente se realizó una prueba microscópica para observar el crecimiento de parásitos.

**Tabla 2.4:** Composición del medio LIT (Liver Infusión Tryptose).

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	7.5g
KCl	0.4g
Triptosa	5g
Sucrosa	2g
Liver infusión	5g
Hemina	20mg
Suero Fetal Bovino	70mL
Estreptomina (10000 µg/ml)	0.1mL
Penicilina (10000 units/mg)	0.1mL
Gentamicina (10000 µg/ml)	0.1mL
H <sub>2</sub> O Destilada	1000ml

### 2.5.3 Técnicas Moleculares

#### Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó un protocolo de extracción modificado a partir de estudios realizados por la Ingeniera Yosselin Vicuña (2009), se utiliza la materia fecal de los vectores como lo detallamos a continuación (Mantis, 1989).

## **EXTRACCIÓN ADN (*Trypanosoma cruzi*) A PARTIR DE MATERIA FECAL DE *Triatoma dimidiata***

- ✓ Las muestras de heces de Triatominos disueltas en solución salina estéril se centrifugó, 5 minutos a 4000 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante.
- ✓ Se adicionó 50 µL de buffer de lisis (EDTA 0.1 M, NaCL 015 M) y se agitó por inversión.
- ✓ Se agregó 100 µL de Proteinasa K 0.1mg/ml, 50 µL de SDS 0.5% y se mezcló por inversión.
- ✓ Se Incubó a 56°C durante 2 a 3 horas agitando los tubos por inversión cada hora
- ✓ Se adicionó a cada tubo un volumen igual de Fenol pH 8 y se agitó con vortex.
- ✓ Se centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C.
- ✓ Se transfirió el sobrenadante y se agregó, un volumen igual Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1 y se mezcló con vortex
- ✓ Se Repetió el paso 6, y transfirió el sobrenadante, se agregó un volumen igual de cloroformo y se mezcló por inversión.
- ✓ Se centrifugó 10000rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante

- ✓ Se adicionó a cada tubo 0.1 volumen de acetato de sodio pH 4.8 y 2-5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló suave y lentamente hasta que aparezca la madeja forma del DNA, se dejó precipitar -20°C. Toda la noche
  
- ✓ Se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante.
  
- ✓ Se agregó 300 µL de etanol al 70% frío, se mezcló lentamente por inversión y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
  
- ✓ Se retiró todo el alcohol que sea posible y se dejó secar.
  
- ✓ Al pellet de ADN se le adicionó 250 µL de buffer TE (Tris-EDTA) 1X. se dejó incubar a 37°C por 60 minutos mezclándolo por inversión continuamente.
  
- ✓ Se extrajo nuevamente el ADN y se repitió del paso 7 hasta el paso 15.
  
- ✓ Se dejó el pellet disolver en TE.

#### **2.5.4 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído.**

##### **Paso 1: Electroforesis en geles de agarosa al 1.5%**

- ✓ Para cuantificar y determinar presencia de ADN extraído se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Para la preparación del gel

se pesó 0.4 gr de agarosa y se colocó en un vaso de precipitación con 25mL de TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1%, se colocó en el microondas por 35 segundos hasta que la agarosa quede totalmente disuelta.

- ✓ Se vertió el gel en un “gel holder” evitando la formación de burbujas de aire, ya que estas pueden afectar la separación de las bandas de ADN. Se inserta la peineta y se deja el gel en un lugar seguro sin moverlo hasta que se polimerice completamente.
  
- ✓ Se colocó el gel en un tanque de electroforesis. Añadiendo suficiente buffer de electroforesis TAE 1X para que cubra el gel.
  
- ✓ Remover la peineta y colocar las muestras en las fosas usando una micropipeta.

### **Paso 2: Preparación de las muestras para la electroforesis**

- ✓ Agregar a las muestras solución de tinción Dye con una relación 5:1 (8 $\mu$ L de la muestra + 2 $\mu$ L de la solución Dye).

### **Paso 3: Corrida del gel de electroforesis**

- ✓ Se colocó 10 $\mu$ L de cada una de las muestras y 6 $\mu$ L del marcador en cada pocillo del gel.
  
- ✓ Se colocó solución TAE 1X en la cámara de electroforesis hasta que recubra el gel y permita el paso de corriente.

- ✓ Se Aseguró que el gel este bien colocado en la cámara de electroforesis desde el polo negativo (negro) hacia el polo positivo (rojo).
- ✓ Se reguló la cámara de electroforesis entre 60 a 80 voltios por 2 a 3 horas.
- ✓ Se retiró el gel de la cámara luego que todas las muestras hayan migrado a través del gel.
- ✓ Se colocó el gel en un recipiente plástico y se tiñó con SYBR SAFE® por 30 minutos.
- ✓ Finalmente se colocó el gel bajo una lámpara UV para observar las bandas de ADN formadas.

### **2.5.5 Determinación de la concentración y pureza de las muestras de ADN mediante espectrofotometría NANODROP 2000™.**

Se utilizó el procedimiento del manual de NANODROP 2000™. Para lo cual primero se inició la programación al modo ADN en el sistema del espectrofotómetro con unidades de la cuantificación ng/μL, factor de dilución 1 y factor para medir ADN 50. Se limpió el lector con papel absorbente y con una pipeta se colocó 2μL de TE con el que se diluye el ADN extraído, esto se realizó para la calibración del equipo y para encerrarlo. Luego se colocó 2μL de la muestra y se realizó la medición anotando los valores de concentración en ng/μL de pureza. Para cada nueva lectura se realizó una limpieza del equipo siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado.

### 2.5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras de ADN extraídas con el protocolo anteriormente mencionado serán usadas para PCR, descrito a continuación.

#### **Materiales y reactivos**

- ✓ Para el ADN control positivo se utilizó muestras proporcionadas del Centro para Control y Prevención de Enfermedades CDC de Atlanta.
- ✓ Secuencia de ADN previamente publicada, la cual nos proporcionó datos específicos para el estudio.
- ✓ Primers específicos S35 y S36 de *Trypanosoma cruzi*, los cuales fueron obtenidos comercialmente (TIB Molbiol) para amplificar un fragmento de 330pb y determinar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de ADN extraído, los que se detallan en el Cuadro 2.1 (Guevara *et al.*, 1996 & Taibi *et al.*, 1995).
- ✓ Primers específicos de TC, TC1 y TC2 del tipo de *Trypanosoma cruzi* para amplificar fragmentos de 300pb de las muestras extraídas de ADN, los que se detallan en el Cuadro 2.2 (Guevara *et al.*, 1996 & Taibi *et al.*, 1995).
- ✓ Reactivos para la PCR detallados a continuación en el Cuadro 2.3 y 2.5.
- ✓ Termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, bajo las siguientes condiciones de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión.

**Cuadro 2.1:** Primers utilizados para la presencia de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de ADN extraídas de las heces de los vectores.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Fragmento</b>
S35	AAATAA TGT ACG GGK GAG ATG CAT GA	330[pb]
S36	GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA	330[pb]

**Cuadro 2.2:** Primers utilizados para la caracterización de las cepas de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de ADN extraídas de las heces de los vectores.

<b>Primers</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Fragmento</b>
TC	CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG	300[pb]
TC1	GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC	300[pb]
TC2	CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G	300[pb]

Para la prueba de identificación de *Trypanosoma cruzi* 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.

**Cuadro 2.3:** Reactivos y cantidades utilizadas para técnica de PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final Rx N°22</b>
dNTP Mix	1	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1	1
GoTaq 5X Buffer	3	3
Primer 1 (2.5µM)	0,4	0,4
Primer 2 (2.5µM)	0,4	0,4
GoTaq Polymerasa	0,125	0,125
Agua ultra pura	8,10	8,10
ADN	1	2
Volumen final	15	16

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

**Cuadro 2.4:** Ciclos del termociclador para la amplificación de los primers S35 y S36.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial 95°C	5min	1 ciclo
Desnaturalización 95°C	1min	30 ciclos
Alineamiento 60°C	1min	30 ciclos
Extensión 72°C	1min	30 ciclos
Extensión final 72°C	5min	1 ciclo
4°C	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	

Para la prueba de caracterización molecular de las cepas de *Trypanosoma cruzi*, los materiales y químicos adicionales para la PCR (Go Taq DNA polimerasa, 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.

**Cuadro 2.5:** Reactivos y cantidades utilizadas para técnica de PCR.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>
dNTP Mix	0,125	0,125
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,25	1,25
GoTaq 5X Buffer	2,5	2,5
Primer 1 (10 uM)	0,125	0,125
Primer 2 (10 uM)	0,125	0,125
Primer 3 (10 uM)	0,125	0,125
GoTaq Polimerasa	0,05	0,05
Agua ultra pura	5,7	5,7
ADN	2,5	2,5
Volumen final	12,5	12,5

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

**Cuadro 2.6:** Ciclos del termociclador para la amplificación de los primers TC, TC1 y TC2.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial 94°C	5min	1 ciclo
Desnaturalización 94°C	30min	30 ciclos
Alineamiento 55°C	30min	30 ciclos
Extensión 72°C	45min	30 ciclos
Extensión final 72°C	5min	1 ciclo
4°C	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	

## CAPITULO 3.

### RESULTADOS

#### 3.1 Recolección de Triatominos en las comunidades Barrio Lindo, El Morrón, Altamira y Cruz Roja del cantón General Villamil Playas.

Un total de 206 Triatominos fueron recolectados en las comunidades de Barrio Lindo, El Morrón, Altamira y Cruz Roja como lo demuestra la Tabla 3.1. Las muestras fueron recolectadas durante todo el día bajo escombros, en casas de animales domésticos, nidos de aves y dentro de las viviendas.

**Tabla 3.1:** Triatominos recolectados en las comunidad de estudio.

<b>Comunidades</b>	<b>Número de Triatominos recolectados</b>	<b>Porcentaje de Triatominos recolectados</b>
Barrio Lindo	112	54.4%
El Morrón	11	5.3%
Altamira	9	4.4%
Cruz Roja	74	35.9%
<b>TOTAL</b>	<b>206</b>	<b>100%</b>

### 3.2 Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en muestras de heces fecales del vector *Triatoma dimidiata* en las comunidades de estudio.

Mediante la prueba de microscopía de las heces fecales del vector, de un total de 206 Triatominos recolectados, se determinó que el 72.33% (149/206) fueron positivos a *Trypanosoma cruzi* y 27.67% (57/206) fueron negativos.

En la Tabla 3.2, se dio valores porcentuales de un análisis por microscopía de los 206 vectores recolectados en cada comunidad.

**Tabla 3.2:** Prevalencia de *Trypanosoma cruzi*, del análisis de *Triatoma dimidiata* en las comunidades de estudio.

Comunidades	% Positivos	% Negativos
Barrio Lindo	67/112 (59.82%)	45/112 (40,18%)
El Morrón	8/11 (72.72%)	3/11 (27,27%)
Altamira	9/9 (100%)	0
Cruz Roja	65/74 (87,83%)	9/74 (12,16%)

### 3.3 Extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* y optimización de la PCR

Para la extracción de ADN el presente estudio se basó en un protocolo ya estandarizado en trabajos previos, los cuales utilizaron Fenol – Cloroformo – Alcohol Isoamílico.

Para determinar la integridad y presencia de ADN de *Trypanosoma cruzi*, se corrió un gel de agarosa al 1.5% con primers específicos S35 y S36, teñido con bromuro de etidio, en el cual se utilizó un marcador molecular de 1000 pb para determinar el tamaño de las bandas de 330pb aproximadamente y se determinó la presencia de ADN como se muestra en la Figura 3.1, 3.2 y 3.3.

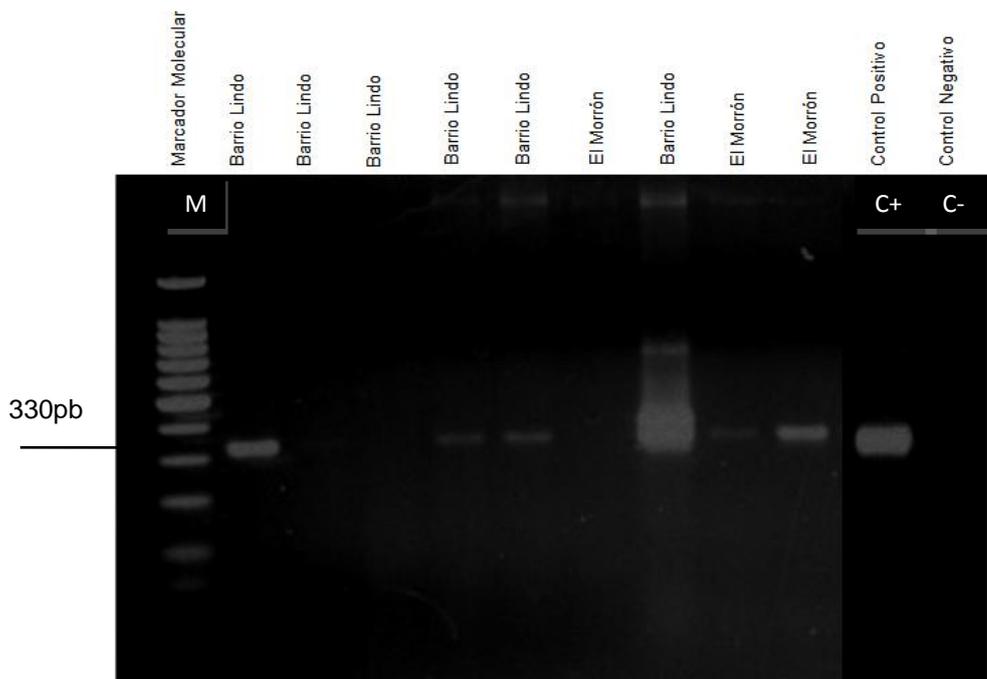
Para la estandarización de la PCR se tomó en cuenta las concentraciones de los reactivos y se dio una estandarización en la corrida de la amplificación (Tabla 3.3, 3.4).

**Tabla 3.3:** Estandarización de los reactivos utilizados en la PCR para mostrar presencia de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de ADN extraídas de las heces de los vectores.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración final Rx N°22</b>
dNTP Mix	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1
GoTaq 5X Buffer	3
Primer 1 (2.5µM)	0,4
Primer 2 (2.5µM)	0,4
GoTaq Polymerasa	0,125
Agua ultra pura	8,10
ADN	2
Volumen final	16

**Tabla 3.4:** Ciclos del termociclador para la amplificación de los primers S35 y S36.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95°C	5min	1 ciclo
Desnaturalización 95°C	1min	30 ciclos
Alineamiento 60°C	1min	30 ciclos
Extensión 72°C	1min	30 ciclos
Extensión final 72°C	5min	1 ciclo
4°C	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	



**Figura 3.1:** Gel de Agarosa al 1.5% con los productos PCR, amplificando un fragmento con primer específico (S35y S36) de *Trypanosoma cruzi*. **M.** Marcador comercial de 1 KB, **C-**. Control Negativo. **C+.** Control Positivo. Muestra de material fecal de los *Triatomas dimidiata* recolectados en las zonas de estudio.

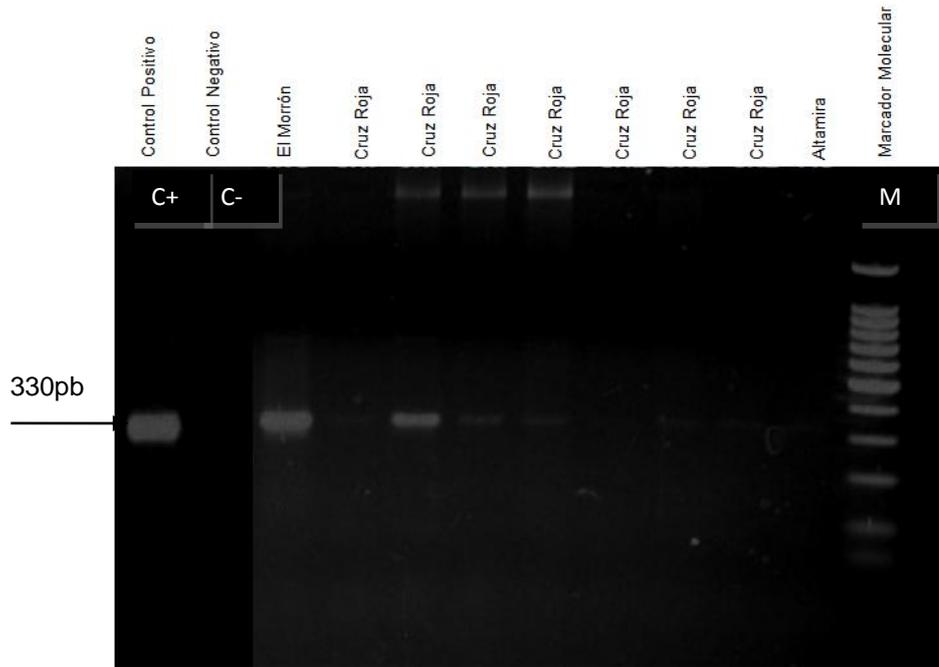


Figura 3.2: Gel de Agarosa al 1.5% con los productos PCR, amplificando un fragmento con primer específico (S35y S36) de *Trypanosoma cruzi*. M. Marcador comercial de 1 KB, C-. Control Negativo. C+. Control Positivo. Muestra de material fecal de los *Triatomas dimidiata* recolectados en las zonas de estudio.

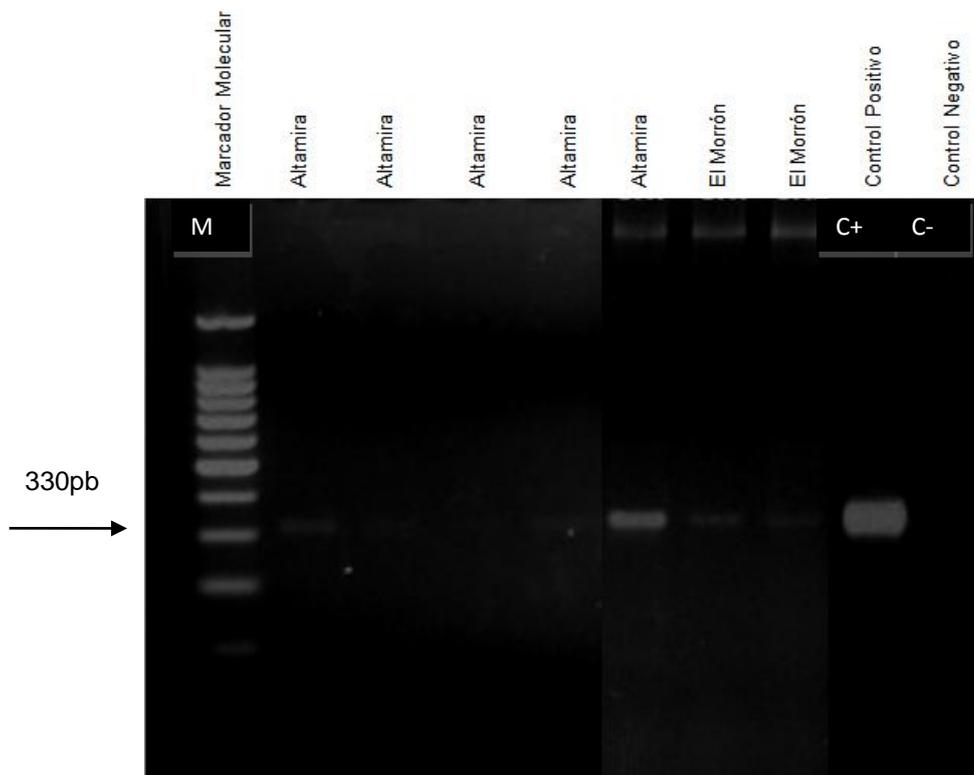


Figura 3.3: Gel de Agarosa al 1.5% con los productos PCR, amplificando un fragmento con primer específico (S35y S36) de *Trypanosoma cruzi*. M. Marcador comercial de 1 KB, C-. Control Negativo. C+. Control Positivo. Muestra de material fecal de los *Triatomas dimidiata* recolectados en las zonas de estudio.

### 3.4 Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* por el método de PCR

De las 149 muestras de heces de triatominos con resultados positivos en la microscopía, fueron seleccionados 25 muestras al azar para el análisis de PCR, tomando una concentración diluida y estandarizada de 2.5µM y un volumen aumentado de 0.4µL en los primers S35 y S36 para la presencia de *Trypanosoma cruzi*, mostrando resultados positivos en las 25 muestras tomadas (100%) (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5:** Análisis de 25 muestras de heces del vector con primers específicos S35 y S36.

<b>Barrio</b>	<b>% muestras positivas en la PCR con primers S35 Y S36</b>
Barrio Lindo	24% (6/25)
El Morrón	24% (6/25)
Altamira	24% (6/25)
Cruz Roja	28% (7/25)
<b>Total</b>	<b>100% (25/25)</b>

### 3.5 Cuantificación del ADN control de *Trypanosoma cruzi*.

El ADN inicial de *Trypanosoma cruzi* fue cuantificado mediante fluorometría y mediante espectrofotometría en el equipo NANODROP 2000™, los resultados se muestran en la Tabla 3.6.

Como se indica en la Tabla 3.6 la cantidad de ADN requerido en las 25 muestras tomadas para posteriores ensayos, debe estar por encima de 30

ng/ $\mu$ L, hay muestras con una cantidad considerable de ADN las cuales resultaron favorables en la caracterización.

**Tabla 3.6:** Cuantificación del ADN en ng/ $\mu$ L de 25 muestras de heces de *Triatomino*s.

<b>Muestra</b>	<b>Barrio</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>
Heces	Barrio Lindo	30.9
Heces	Barrio Lindo	36.1
Heces	Barrio Lindo	191.1
Heces	Barrio Lindo	257.3
Heces	Barrio Lindo	165.8
Heces	Barrio Lindo	65.9
Heces	El Morrón	30.8
Heces	El Morrón	97.8
Heces	El Morrón	83.9
Heces	El Morrón	80.2
Heces	El Morrón	125.2
Heces	El Morrón	155
Heces	Altamira	134.2
Heces	Altamira	179.9
Heces	Altamira	178.4
Heces	Altamira	223.1
Heces	Altamira	63.9
Heces	Altamira	122.1
Heces	Cruz Roja	750.4
Heces	Cruz Roja	529
Heces	Cruz Roja	516.8
Heces	Cruz Roja	46.9
Heces	Cruz Roja	54.8
Heces	Cruz Roja	37.6
Heces	Cruz Roja	94.9

### 3.6 Caracterización molecular

Las 25 muestras estudiadas para la presencia de *Trypanosoma cruzi*, fueron sometidas nuevamente, bajo las mismas condiciones de concentración antes mencionadas, ahora con primers TC, TC1 y TC2 (Figura 3.4 y 3.5). Para

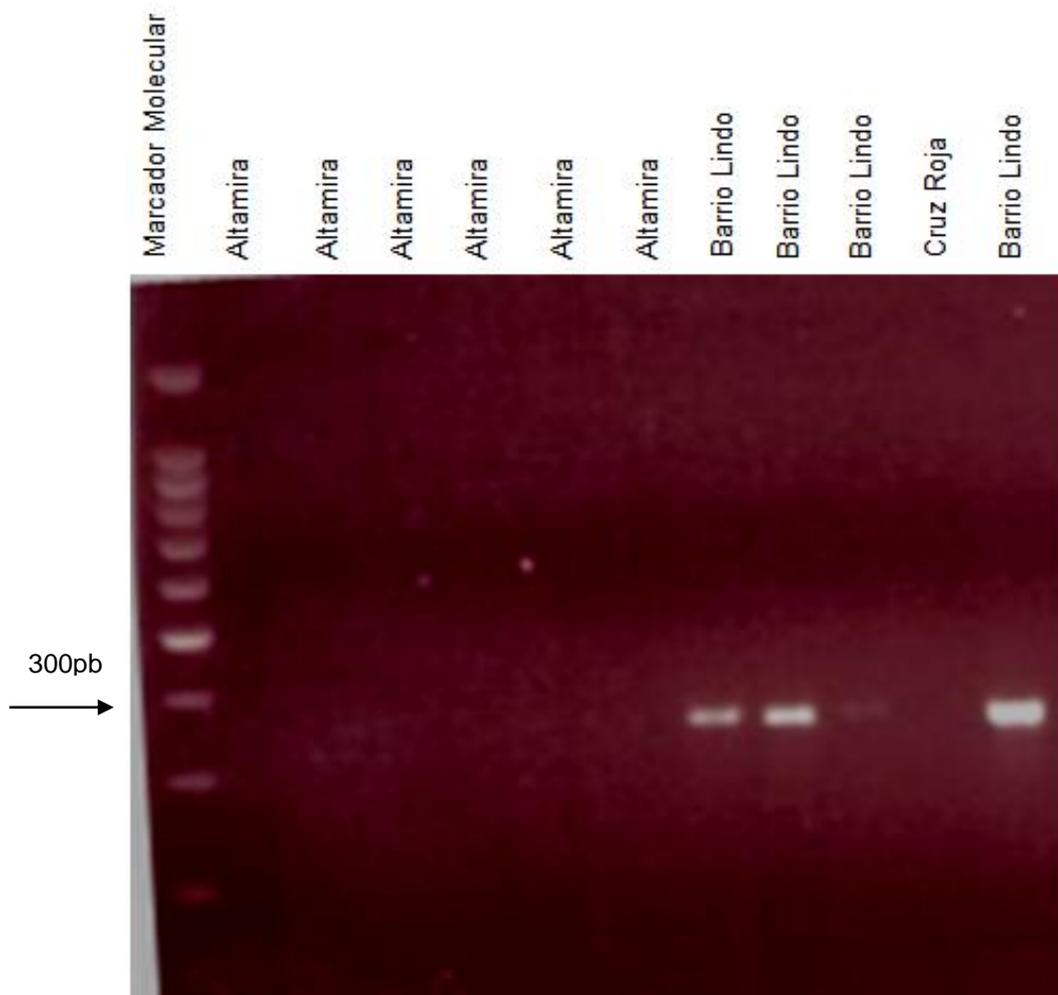
el análisis de la PCR en la caracterización molecular, se tomaron en cuenta las siguientes concentraciones de los reactivos utilizados, así como también el siguiente procedimiento para su amplificación (Tabla 3.7 y 3.8).

**Tabla 3.7:** Estandarización de los reactivos utilizados en la PCR para la caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de ADN extraídas de las heces de los vectores.

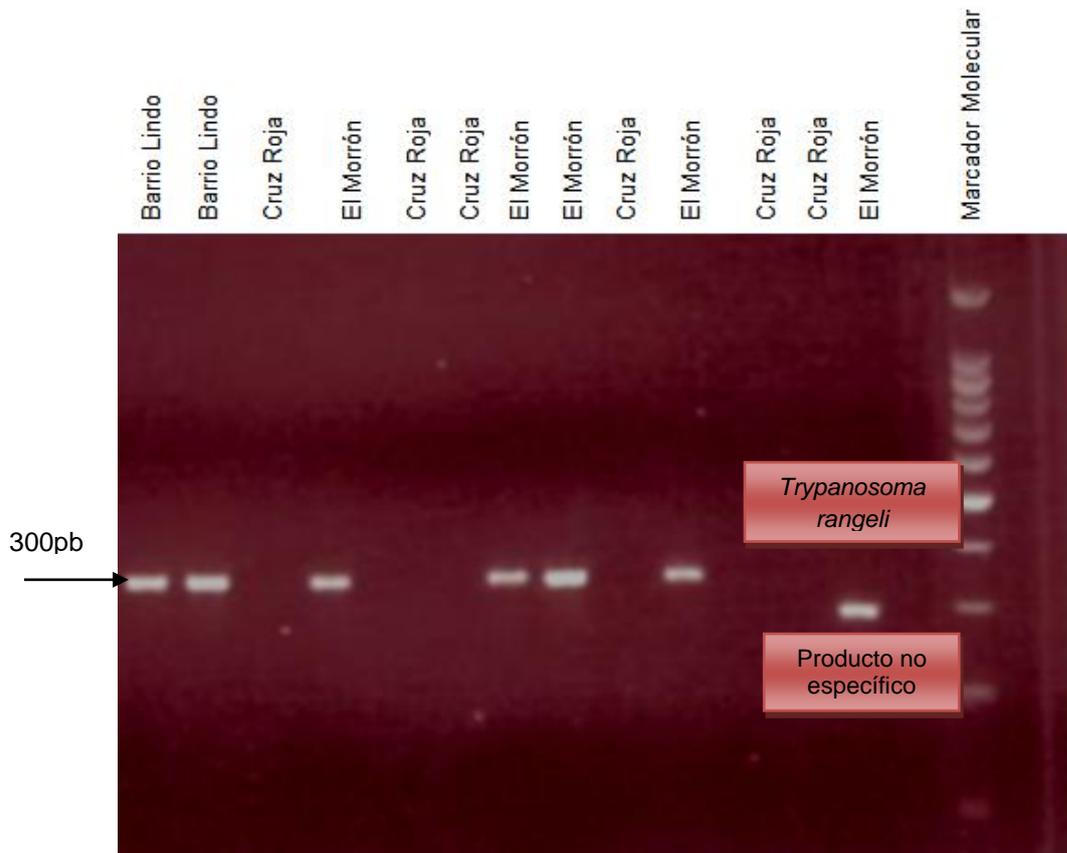
Reactivos	Concentración final
dNTP Mix	0,125
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,25
GoTaq 5X Buffer	2,5
Primer 1 (10 µM)	0,125
Primer 2 (10 µM)	0,125
Primer 3 (10 µM)	0,125
GoTaq Polymerasa	0,05
Agua ultra pura	5,7
ADN	2,5
Volumen final	12,5

**Tabla 3.8:** Ciclos del termociclador para la amplificación de los primers TC, TC1 y TC2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 94°C	5min	1 ciclo
Desnaturalización 94°C	30min	30 ciclos
Alineamiento 55°C	30min	30 ciclos
Extensión 72°C	45min	30 ciclos
Extensión final 72°C	5min	1 ciclo
4°C	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	



**Figura 3.4:** Gel de Agarosa al 1.5% con los productos PCR, amplificando un fragmento con primers específicos (TC, TC1, TC2) de *Trypanosoma cruzi*. Marcador comercial de 1 KB y M muestra de material fecal de los *Triatomas dimidiata* recolectados en las zonas de estudio.



**Figura 3.5:** Gel de Agarosa al 1.5% con los productos PCR, amplificando un fragmento con primers específicos (TC, TC1, TC2) de *Trypanosoma cruzi*. Marcador comercial de 1 KB y M muestra de material fecal de los *Triatomas dimidiata* recolectados en las zonas de estudio.

El análisis en la caracterización molecular los cuales nos dio resultados positivos en 10 muestras, 24% (6/25) en Barrio Lindo y 16% (4/25) en El Morrón (Tabla 3.9), indicando que el Tipo II de *Trypanosoma cruzi* está presente en este análisis con un tamaño de banda aproximado de 300pb.

**Tabla 3.9:** Análisis de 25 muestras de heces del vector para la caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* en las cuatro comunidades de estudio.

<b>Comunidades</b>	<b>% Muestras amplificadas con primers TC, TC1 y TC2</b>	<b>% Muestras no amplificadas</b>
Barrio Lindo	6/25 (24%)	0
El Morrón	4/25 (16%)	2/25 (8%)
Altamira	0	6/25 (24%)
Cruz Roja	0	7/25 (28%)

### 3.7 Identificación molecular

Con técnicas moleculares, se confirmó que el parásito encontrado en las muestras de heces obtenidas de *Triatoma dimidiata* es de *Trypanosoma cruzi* Tipo II, para lo cual hemos obtenido la secuencia de nucleótidos siguiente (Tablas 3.10, 3.11 y 3.112).

#### 3.6.1 Secuencias analizadas

Los siguientes estándares de restricción permitieron la caracterización de diferentes cepas y clones del parásito, en función a la semejanza que tiene los perfiles de los productos de digestión del ADN de minicírculos por endonucleasas de restricción. Por lo que las secuencias analizadas a continuación presentaron estándares de restricción idénticos o semejantes, representando así gran diversidad genética intraespecífica.

**Tabla 3.10:** Secuencia analizada para el primer S35.

Secuencia primers	Nucleótidos (BLAST)
<b>S35</b>	1 ataatgtacg ggggagatgc atgattttg gccccaaaag tgaacgccc ctccaaaac
	61 aagaatttcg taatttcgg aacccttta tgtgtaattt ataccaccta taccttacc
	121 ataccaccaa cacaacacta ccatcaagaa tacagaaact atagtatcat caatatcaag
	181 ataacacact caatgcaatc atacaatgcc ccacagaaca taacattttg tigtgtaaac
	241 tatacatta gtatctactc tataaattat tattccgta cccctctcac ctctacatta
	301 caccaacccc aatcgaaccc ccacctccc gaaaaattca caaaatcaat aaaataatgt
	361 acgggggaga tgcattgatt ttggcccaa aagtgaacg cccctccaa aaccaacatt
	421 ttctgaaatt ccacatctt ttcaacctg ttataccata ccacaatcta ttaccacca
	481 tccaaccaa caccaaatta taaaatgtaa ctgaatacat aactacaata acgtaacaa
	541 atctcatcca caaactcaca ccattgtctc ttacacaatg ttctcaacta catcattata
	601 attacagaaa atatactata tctaaagac tcattataat atccaaaacc caccactcca
	661 cctcccttat attacaccaa cccaatcga acc

**Tabla 3.11:** Secuencia analizada para el primer S36.

Secuencia primers	Nucleótidos (BLAST)
<b>S36</b>	1 ataatgtacg ggggagatgc atgattttc cgccccaaat tgaacgccc ctccaaaac
	61 cacattttcc gaatcctcat aacccttcc taacccttac acaacattat aagatttacc
	121 acaaaactat agaataataa agaatatatt gtctaattta tctatacaaa catatcttat
	181 ctcttatac atagtaata taatacacct ctacatacta taaacataca taacacctct
	241 acaccatatt caattccaaa ttacactaca caccaccta tctaccacac cacattacca
301 cctctatatt acaccaaccc caatcgaacc	

**Tabla 3.12:** Secuencia analizada para el primer TC2.

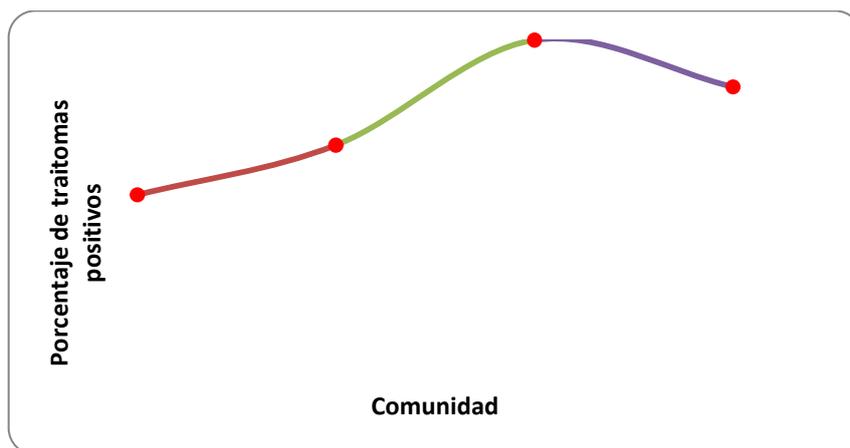
Secuencia primers	Nucleótidos (BLAST)
<b>TC2</b>	1 acctgcaggc acacgtgtgt gtgtgtatgt atgtgtgtgt gccccacca cctccggctc
	61 ctctatgitt gtgtcgtcgc tggcctgtc tgcgcaagca cgggtgctctg tctgtccgt
	121 ctgctgctt tgtgttctcg cactccaccg cgtgttttac ggtgttgcct gcgtttttg
	181 gtgttttct gctttttcc cgtcttttg ctcctcgac tgaaccgcct gcacacaccg
	241 ctccgcacgc attagtcgcg tgtgttccg cccccgacac ttctgtggc gctgatcggg
301 cgactccgcc ag	

### 3.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de prevalencia se utilizaron los resultados de los Triatominos recolectados en las zonas de estudio y el número de Triatominos positivos encontrados en cada comunidad. Así, se hizo un análisis de varianza a fin de determinar los rangos de parasitemia en cada una de las comunidades; posteriormente se efectuó una regresión logística para representar la pertenencia de una observación a uno de los grupos y estimar el valor de la variable binaria en las comunidades bajo estudio (Anexo 1).

En el análisis de varianza ANOVA se pudo observar que la comunidad de Barrio Lindo tiene una prevalencia baja del parásito (59.82%), Altamira y Cruz Roja tienen una prevalencia alta del parásito (100% y 87.84%) y El Morrón (72.73%), no podemos establecer que se encuentra dentro de una prevalencia alta o baja para dar un resultado exacto, donde el análisis de varianza utilizado no cumple con las condiciones establecidas (Tabla 3.13).

**Tabla 3.13:** Análisis de Triatomas positivos para *Trypanosoma cruzi*.



Se utilizó el análisis de regresión logística para modelar la relación entre una variable respuesta de naturaleza dicotómica, en relación a nuestra variable independiente o regresora con los resultados de odd ratio, tomando a Barrio Lindo como nuestra constante de estudio, se obtuvo valores de positividad para cada una de las comunidades con un 95% de confiabilidad se pudo observar que El Morrón tiene 1.79 más probabilidades de que el insecto vector tenga el parásito causante de la enfermedad, Cruz Roja un 4.85 más probabilidad de que el vector contenga el parásito.

El análisis estadístico en el programa utilizado InfoStat, mostró en la concentración de ADN analizado existe un nivel de parasitemia similar en las cuatro comunidades, pero también nos indicó que mediante la prueba de Duncan y haciendo un análisis de proporciones con cuartiles, Barrio Lindo y Cruz Roja mostraron una significancia en la parasitemia (Error estadístico de muestreo de 69,29% y 64,15% respectivamente), con un índice de confiabilidad del 90% y un valor  $p= 0,1928$ . Este valor  $p$  nos indicó que por lo menos una de las cuatro comunidades (Cruz Roja) tiene diferencia proporcional en el nivel de parasitemia existente en las muestras (Cuadro 3.1y 3.2).

Así también de las 206 muestras analizadas en total y 149 muestras positivas bajo microscopía de luz, se analizó que el 72.33% (Nivel de confianza de 95%, Máximo 78.44% y Mínimo 66.22%) de la población de Triatomíneos está infectada con el parásito *Trypanosoma cruzi*.

Se hizo la prueba de mínimos y máximos para todas las comunidades y los resultados nos indicaron que no existe una diferencia significativa entre la población de Triatomíneos infectados con el parásito *Trypanosoma cruzi* dentro de las cuatro comunidades, ya que los valores estuvieron dentro de un mismo rango de significancia de 0 – 100% con un nivel de confianza del 95%. Pero

realizando un análisis de porcentajes para cada una de las comunidades de estudio se encontró que Barrio Lindo tiene una prevalencia del parásito dentro de los vectores analizados del 59.8% (67/112), El Morrón de 72.7% (8/11), Altamira de 100% (9/9) y Cruz Roja de 87.8% (65/74).

En los análisis de PCR con los primers S35 y S36 nos dio un valor del 100% (25/25) de *Trypanosoma cruzi* en las muestras, mientras que con los primers TC, TC1 y TC2 un 40% (10/25) muestras positivas para *Trypanosoma cruzi* Tipo II y un 60% (15/25) muestras negativas o no amplificadas con estos primers.

### **3.8 Infecciones experimentales**

Los ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, presentaron parasitemia visible, sin embargo la infección de los ratones no pudo ser confirmada mediante PCR, con primers específicos de *Trypanosoma cruzi* (300-450pb), debido a contaminación en la muestra.

Los medios de cultivo líquidos LIT, no presentaron parasitemia visible debido a la falta de asepsia previa a la inoculación, o probablemente la cantidad de heces inoculadas en cada tubo con el medio líquido LIT fue demasiado alta para que los antibióticos realizaran un trabajo eficiente al momento de mantener estéril al medio. Por lo tanto no se observaron fragmentos de bandas amplificadas para la presencia de *Trypanosoma cruzi* en el medio de cultivo.

## CAPITULO 4.

### DISCUSIÓN

#### **4.1 Recolección de Triatominos en las comunidades de Barrio Lindo, el Morrón, Altamira y Cruz Roja y prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en las muestras de heces fecales del vector *Triatoma dimidiata* en las comunidades de estudio.**

De 206 muestras analizadas de las heces del vector Triatomino, analizadas bajo microscopía de luz en el 72.33% se determinó la presencia de *Trypanosoma cruzi* en las cuatro comunidades de estudio Barrio Lindo, El Morrón, Altamira y Cruz Roja y se analizó por la técnica de PCR para determinar la presencia del parásito en todas las muestras, posteriormente se realizó la caracterización molecular del parásito en estudio con primers específicos TC, TC1 y TC2.

Este trabajo mostró una prevalencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en el vector *Triatoma dimidiata* del 72.33% y haciendo una comparación con el estudio realizado por Vicuña (2009), donde se mostró que la prevalencia fue de 98.48%, se puede decir que existe hasta la actualidad una alta infección en la población del cantón General Villamil Playas.

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es una enfermedad transmitida a humanos de manera vectorial por chinches hematófagos, que se encuentra confinada a la población que vive en zonas rurales de extrema pobreza. Sin embargo, debido a los movimientos migratorios de personas infectadas de estas zonas a zonas urbanizadas, esta

enfermedad ha comenzado a dispersarse en proporciones preocupantes, transmitiendo la enfermedad por medio de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y vía placentaria de madre a hijo (Guevara *et al.*, 2000).

Las zonas de riesgo donde la transmisión vectorial existe con certeza, abarca 183 cantones (121 áreas de salud) en 20 provincias del Ecuador, donde el principal vector encontrado en la zona de estudio fue *Triatoma dimidiata* y este es considerado como el principal factor de transmisión de la enfermedad de Chagas en la provincia del Guayas (Grijalva *et al.*, 2011), De los 8.4 millones de personas que viven en zonas endémicas, de 3 a 5 millones son especialmente vulnerables debido a las características de sus viviendas o a su situación económica baja (OPS, 2009).

En este estudio al vector Triatomino se lo encontró fácilmente en nidos de gallinas, nidos de ratas, en nidos de raposas, incluso dentro de las casas de animales domésticos y en poca cantidad dentro de los domicilios debido a que es un animal nocturno.

La infestación está caracterizada por un alto porcentaje de Triatominos que viven en zonas peri domésticas que son comunes en zonas rurales de la costa ecuatoriana, para lo cual, mediante datos proporcionados por SNEM (2010), indicaron que los habitantes que viven en una zona rural se encontraron con un alto porcentaje de infestación de Triatominos en los alrededores de sus viviendas, debido a las bajas actividades de control que se les proporciona, haciendo de esto una alta posibilidad de contagio al humano.

Como señala Grijalva (2011), la supervivencia de estos vectores en la mayoría de los casos es debido a la clase socio económica, como se mostró en

este estudio en presencia de la clase de casas construidas en la localidad, son viviendas cuyos materiales de construcción a base de paja, madera pueden ser reservorios para esta clase de animales, así también, los restos de basura y desechos encontrados como llantas viejas facilitan la supervivencia de la especie porque son perfectos para la presencia de otros animales los cuales pueden servir de alimento a los vectores. Debido al bajo presupuesto que el grupo SNEM tiene cada año es muy difícil mantener un resultado positivo en las fumigaciones realizadas.

Así también, el desarrollo de estrategias adecuadas para el control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, depende de la disponibilidad de datos confiables sobre la distribución geográfica, características ecológicas y tendencias conductuales de las especies de Triatomíneos presentes en la región. Se debería tomar en cuenta los índices de infestación domiciliar y natural de estos vectores por *Trypanosoma*, la densidad y el potencial papel vectorial de estas especies, parámetros básicos en la aplicación de un posible programa de control a implementarse por el Ministerio de Salud Pública (Vargas, 2005).

#### **4.2 Análisis de Triatomíneos**

Siendo *Triatoma dimidiata* un vector importante epidemiológicamente en la transmisión de la enfermedad de Chagas, es necesario empezar con un adecuado sistema de control en las comunidades que habita, para terminar con su ciclo biológico y de reproducción dentro de los mamíferos que son buenos reservorios del parásito dentro del ciclo de transmisión peri doméstica del humano (Carcavallo *et al.*, 1998; Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002).

La mayoría de la población ecuatoriana vive en zonas altas, donde no se encuentran Triatominos domiciliados, (con excepciones como la presencia de *Triatoma carrioni* en parroquias andinas del sur), y que no hay en el país vectores domésticos extremadamente eficientes como *Triatoma infestans* (abundante en el sur del Perú) o *Rhodnius prolixus* (principal vector en el norte de Colombia). Este puede ser el motivo a que las tasas generales de prevalencia en zonas no endémicas de nuestro país sean bajas, tomando en consideración a los países vecinos (Vicuña, 2009).

Mediante este estudio, hemos podido observar que *Triatoma dimidiata* se está convirtiendo en un potente vector de *Trypanosoma cruzi*, presente en áreas consideradas como endémicas para la enfermedad de Chagas en humanos a pesar de los cambios ambientales existentes en nuestro país.

El análisis de muestras de heces de Triatominos por microscopía de luz es una de las técnicas ampliamente utilizadas para estimar la prevalencia de Triatominos naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* en estudios de vigilancia entomológica y de Triatominos infectados experimentalmente en insectarios. Sin embargo la observación microscópica directa presenta ciertas limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, siendo altamente dependiente de la experiencia del observador. En nuestro estudio no se tuvo esa dificultad ya que las pruebas de identificación del parásito por PCR con primers específicos S35 y S36 mostró que de las 25 muestras tomadas al azar el 100% resultaron positivas al análisis de *Trypanosoma cruzi*. Pero en otros estudios realizados la técnica de microscopía no distingue entre parásitos con flagelos similares como *Trypanosoma cruzi* o *Trypanosoma rangeli* o *Blastochritidia* (Muschiatti, 2010).

Es posible que las muestras analizadas presenten una infección mixta, de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* u otros flagelados no patógenos que infectan a los mismos hospedadores y se transmiten por el mismo vector. Estos motivos son los que han llevado a los investigadores a la utilización de más estudios en diferente tipo de vectores que puedan tener infección por el mismo parásito con el fin de identificarlos (Miles *et al.*, 1997; Núñez *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Miralles *et al.*, 2002).

No se puede descartar la posibilidad de que ciertos vectores contengan una mezcla de parásitos dentro de su organismo, así como también puedan tener un mismo parásito con diferente especie, en la actualidad los estudios indicaron que esta posibilidad puede ser de gran tamaño, marcando una amplia posibilidad de síntomas diferentes en pacientes infectados y mostrando así un difícil diagnóstico de la enfermedad (Solari *et al.*, 2001 & Breniere *et al.*, 2002).

El comportamiento del parásito *Trypanosoma cruzi* puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado una tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Así mismo, uno de los problemas planteados consiste en conocer si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en respuesta de los pacientes al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas que presentan las cepas de *Trypanosoma cruzi* que prevalecen en cada área geográfica, o en las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Andrade, 1985).

### 4.3 Extracción de ADN, optimización de PCR y caracterización molecular

La técnica de PCR ha sido utilizada para la detección de diversas infecciones parasitarias producidas por protozoarios como *Trypanosoma cruzi*, ha sido considerada la mejor prueba para el diagnóstico de la infección de la enfermedad, al amplificar pequeñas cantidades de ADN parasitario presentes en las muestras de heces fecales de los insectos vectores (Alarcón *et al.*, 2009). En este estudio detectamos ADN de *Trypanosoma cruzi* en 100% (25/25) de muestras de heces de vectores colectados en las diferentes comunidades.

La utilización de la PCR es eficaz y posee un elevado grado de sensibilidad (100%), más no permite discriminar la fase aguda o tardía de la infección, por lo tanto la aplicación de la metodología molecular y técnica de microscopía en las muestras de heces fecales de los Triatominos utilizados en este estudio, son ampliamente recomendables para el diagnóstico de la transmisión de la enfermedad de Chagas (Moreno *et al.*, 2006).

Guevara (1999), mencionó que las técnicas moleculares facilitan la confirmación de cada especie de microorganismos existentes, en este estudio la caracterización de *Trypanosoma cruzi* permitió establecer una relación más amplia en filogenética entre las diferentes especies de *Trypanosomas cruzi* existentes en nuestro país analizando diferentes vectores, esto es importante para la determinación de características parasitológicas entre individuos afectados con la enfermedad de Chagas y/o la patogenicidad de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* que en futuros estudios se puedan identificar en Ecuador.

Diversos estudios muestran también que la virulencia de *Trypanosoma cruzi*, en los que se ha demostrado que depende del número de trypomastigotes inoculados, sin embargo Mazzotti (1940), atribuye la virulencia a la susceptibilidad del hospedero al parásito y Phillips (1960), lo atribuye a la localización y multiplicación de los parásitos en los tejidos infectados (Brenner & Melo, 1985).

Análisis de los perfiles de digestión de kADN de *Trypanosoma cruzi*, revelan una extrema diversidad intraespecífica, demostrando que una única cepa del parásito podría contener dos o más genotipos clonales diferentes, representando probablemente clones que existen naturalmente y que fueron genéticamente aislados uno del otro con el pasar del tiempo (Britto & Constança, 2009). La clasificación de las cepas de *Trypanosoma cruzi* sirvió como importante herramienta epidemiológica para monitorear cepas específicas en la naturaleza, así como para entender el posible papel de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* en el síndrome de la enfermedad.

Estudios en la actualidad recomiendan que los taxones de *Trypanosoma cruzi* sean agrupados en dos linajes principales: *Trypanosoma cruzi I* (zimodema Z1 o linaje 2) y *Trypanosoma cruzi II* (zimodema Z2 o linaje 1). Estos estudios llevaron a la definición de una amplia hipótesis sobre las relaciones parásito-huésped-vector-hábitat que abre la posibilidad de establecer el significado epidemiológico de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* al vincular distintos genotipos con los grados de virulencia y patogenicidad, las formas clínicas, los niveles de respuesta al tratamiento antiparasitario o el comportamiento biológico de las cepas en diferentes huéspedes (Montamat, 1996).

Boglio *et al* (1987), demostraron la existencia de patrones isoenzimáticos diferentes según la etapa del ciclo de vida en que se encuentra el parásito, observándose diferencias en el número de bandas, posición e intensidad de las mismas dando lugar a zimodemos diferentes. Estas diferencias obtenidas, según la etapa del ciclo de vida del parásito, pueden ser parte del proceso regulatorio asociado con cambios metabólicos y morfológicos de *Trypanosoma cruzi*, es por eso que el presente estudio tal como mostraron los resultados de la caracterización molecular con primers específicos TC, TC1 y TC2 indicó una notable diferencia entre cada una de las muestras analizadas, lo que nos dio a entender que si existe la posibilidad de zimodemos diferentes dentro de una misma población de vectores.

Muchas de las cepas naturales de *Trypanosoma cruzi* son multiclonales y se encuentran compuestas de poblaciones del parásito tanto del grupo *Trypanosoma cruzi I* como del grupo *Trypanosoma cruzi II*. Sin embargo, este número de clones puede cambiar drásticamente a medida que transcurre la infección, ya que en la fase crónica de la enfermedad ciertos clones del parásito son eliminados probablemente como resultado de factores inmunológicos del hospedero o debido a la capacidad de multiplicación o requerimientos nutricionales de cada clon (Franco *et al.*, 2003). Este puede ser otro de los motivos por los cuales en el presente estudio 15 de las 25 muestras nos dieron negativo para determinar la caracterización de la cepa existente en las muestras.

Otros estudios, como secuenciación nucleotídica de los fragmentos amplificados usando una herramienta como Blast, busca similitudes de la secuencia dada por la especie del parásito, permitiendo así alinear la secuencia del fragmento amplificado con otras secuencias presentes en las bases de datos ya establecidas en estudios anteriores, con el objetivo de

construir dendogramas que permitan ubicar filogenéticamente al organismo dentro de los tripanosomátidos (Muschiatti, 2010).

#### **4.4 Infección experimental**

La infección a los ratones con *Trypanosoma cruzi* presentaron parasitemia visible en la prueba bajo microscopía, pero al realizar el hemocultivo de la sangre del ratón infectado y posteriormente realizar el análisis de la presencia del parásito por PCR, no mostró resultados positivos visibles, la baja cantidad de parásitos en el medio de cultivo inoculado pudo ser la causa por la cual no se pudo identificar el parásito en la prueba o a su vez la contaminación presente en el medio de cultivo dio como resultado una baja concentración del parásito para poder concluir con la prueba de identificación. A pesar de que la prueba de PCR utilizada es de alta sensibilidad y fue específica para la identificación la cantidad de ADN en el medio de cultivo fue muy baja para que nos indicara que *Trypanosoma cruzi* estaba presente en las muestras.

Es posible también que el hemocultivo realizado con la sangre de los ratones haya sobrepasado el tiempo adecuado de crecimiento del parásito y el medio se haya quedado sin el alimento necesario para que el parásito siga multiplicándose (Guevara, 1999).

Otros estudios han demostrado que existe una inestabilidad en los patrones electroforéticos isoenzimáticos después de pases sucesivos de las cepas por hospederos vertebrados e invertebrados y por medios de cultivo (Magalhaes & Brener, 1996).

El realizar pruebas en medios de cultivo líquidos, como en el presente trabajo, puede facilitar el desarrollo del parásito “*in vitro*” para mantener la cepa para estudios de caracterización molecular, bioquímica, biológica y ecológica, haciendo de este método una prueba importante para la continuación de posibles investigaciones en el país. Es una prueba que demanda mucha precisión y control en la elaboración de su medio de cultivo, es por eso que con la continua observación permitirá mantener una cantidad de parásitos suficientes para posteriores investigaciones.

## CAPITULO 5.

### CONCLUSIONES

De la gran cantidad de vectores Triatominos existentes en la población del cantón General Villamil Playas se encontró en un muestreo de 206 Triatominos, que el 72.33% de vectores analizados bajo microscopía tienen *Trypanosoma cruzi* presente en sus muestras.

Las muestras recolectadas fueron en lugares donde las condiciones de vivienda no eran óptimas haciendo de esto un factor importante para la reproducción y permanencia del vector causante de la enfermedad. Dio como resultado positivo para la presencia de *Trypanosoma cruzi* en las cuatro comunidades de estudio de 59.82% (67/112) en Barrio Lindo, 72.72% (8/11) El Morrón, 100% (9/9) Altamira y 87.83% (65/74) en Cruz Roja.

El análisis microscópico resultó de alta sensibilidad más no de alta especificidad para demostrar que existía *Trypanosoma cruzi* en las muestras analizadas, así también el estudio complementario para la identificación con PCR con primers S35 y S36 también mostró excelentes resultados 100% (25/25) en las 25 muestras tomadas al azar en las cuatro comunidades para el presente estudio.

La cantidad de ADN de *Trypanosoma cruzi* en las 25 muestras analizadas tuvo como resultados cantidades superiores a 30ng/μL, haciendolas favorables para el análisis de PCR.

La prueba de PCR con los primers específicos TC, TC1 y TC2, mostraron resultados positivos en el análisis de caracterización molecular en 10 de las 25 (40%) muestras de heces de Triatominos analizadas para determinar la existencia de *Trypanosoma cruzi* Tipo II.

## CAPITULO 6

### RECOMENDACIONES

Seria recomendado realizar pruebas alternas tanto en vectores como en los integrantes de cada una de los domicilios encontrados con presencia positiva del parásito *Trypanosoma cruzi*, para así llevar a cabo una base de datos de la relación entre la infección a humanos y la infección a vectores.

El control de prevención a nivel domiciliario y peri domiciliario anualmente se debería realizar de manera continua, como se ha venido haciendo hasta las presentes fechas en conjunto con el SNEM, ya que esto podría dar mejores resultados a la erradicación del vector causante de la enfermedad.

Realizar estudios moleculares a vectores positivos como a vectores negativos, porque los análisis microscópicos no son 100% eficientes para determinar parasitemia en muestras de heces de insectos vectores.

Realizar estudios de caracterización molecular para otros tipos de *Trypanosomas*, ya que se ha demostrado que no solo puede existir una sola clase de *Trypanosoma* dentro de un vector.

Realizar un estudio con mayor cantidad de muestras para tener datos más específicos para un estudio estadístico, analizando el costo - beneficio de las pruebas microscópicas y las pruebas moleculares a largo plazo.

## CAPITULO 7.

### BIBLIOGRAFÍA

Abad-Franch, F., & 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. *Memorias 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. & Paucar, A. (1999). Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 387-393.

Alarcón, M., Pérez, M., Villareal, J., Araujo, S., Goncalves, L., González, A., Moreno, E., & Lugo-Yarbu A. (2006). Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* en ratones con infección chagásica aguda. *Bol Malariol y Sal Amb.*; 46: 137-48.

Álava, L., (2011). Incidencia de la Enfermedad de Chagas en las muestras recolectadas de la comunidad El Bejuco en el Instituto Nacional de Higiene de Portoviejo.

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

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

Ayala, M., (2009). El mundo de los artrópodos. Investigaciones de campo.

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

Bogliolo, A. Godfrey, D., (1987). Isoenzyme changes during the life cycle of *Trypanosome cruzi*. Trans Roy Sci. Trop. Med. Hyg.; 81: 222-9.

Botero & Restrepo., (2003). Parasitosis Humana. Cuarta edición; 7: 210-235.

Breniere, Z., (2002). Life cycle of *Trypanosome cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 12:171-8.

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

Brener, M., Camargo, A., (1996). Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Sao Paulo, Brasil. *Recent development in the field of Chagas' disease*. Bull WHO 1982; 60: 463-473.

Britto Constança, (2009). Variabilidad genética del kADN aplicada a estudios de epidemiología molecular de la enfermedad de Chagas. Laboratorio de Biología Molecular y Enfermedades Endémicas, *Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz*, 21040-900, Río de Janeiro, RJ, Brasil.

Carabarin, A., Gonzales, M., Baylon, L., & Rosales, J. (2011). Enfermedad de Chagas, una enfermedad olvidada. Volumen 18 pg 5.

Carcavallo, R., Rocha, D., Galíndez-Girón, I., Sherlock, A., Galvao, C., Martínez, A., Tonn, E., & Corton, E. (1998). Feeding sources and patterns. (pp. 537-560) In: Carcavallo R., Galíndez – Girón I., Jurberg J., & Lent H., (Eds). *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas* Vol. II. Editora Fiocruz, Río de Janeiro.

Carcavallo, R., Rodríguez, M., Salvatella, R., Casas, S., Rocha, D., Galíndez-Girón, I., Sherlock, A., Galvao, C., Otero-Arocha, M., Martínez, A., Rosa, J., Canale, D., Farr, T. & Barata, J. (1998). Habitats and related fauna (pp. 561-600) In: Carcavallo R., Galíndez – Girón I., Jurberg J. & Lent H., (Eds). *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas* Vol. II. Editora Fiocruz, Río de Janeiro.

Castillo, I. & Guijarro, M. (2006). *Estadística descriptiva y cálculos de probabilidad*. Universidad de Cantabria.

Castner, J. (2000). *Book and photos by Chagas bugs*.

Cedillos, R. (2008). Enfermedad de Chagas y proyectos filogenéticos. *Centro de Investigaciones y desarrollo de Salud (CENSALUD)*.

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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 317-320.

Cruz-Reyes, A. & Pickering-López, J. (2006). Chagas disease in México: an analysis geographical distribution during the past 76 years. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 345-354.

Defranc, M. (1982). *Enfermedad de Chagas*, Casa de La Cultura Ecuatoriana, Núcleo Del Guayas, Guayaquil, PP 275.

Dumontiel, E., Ramírez-Sierra, J., Ferral, J., Euán-García, M. & Chávez-Núñez, L. (2009). Usefulness of community participation for the fine temporal monitoring of house infestation by Non-domiciliated triatomines. *Journal of parasitology*, 95: 469-471.

Dumontiel, E., Ruíz-Piña, H., Rodríguez-Félix, E., Barrera-Pérez, M., Ramírez-Sierra, M., Rabinovich, J. & Meno, F. (2004). Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yucatán Peninsula, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 253-256.

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).

Ferral, J., Chávez-Núñez, L., Euán-García, M., Ramírez-Sierra, M., Nájera-Vázquez, N. & Dumontiel, E. (2010). Comparative field trial of alternative vector control strategies for non-domiciliated *Triatoma dimidiata* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 60-66.

Filardi, L. & 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.

Franco, D., Vago, A., Chiari, E., Meira, F., Galvao, L., & Machado, C. (2003) Trypanosome cruse: Mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.*; 104: 54-61.

Freilij, H., & Altcheh, J. (1995). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 21: 551–555.

Garzón, E., Barnabe, C., Córdova, X., Bowen, C., Gómez, E., Ouaisi, A., Tibayrenc, M., Guevara, A. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chagasic chronic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

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

Guevara, A., Eras, J., Recalde, M., Vinueza, L., Cooper, P., Ouaisi, A., & Guderian, R. (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, A., Ruiz, C., Houghton, R., Reynolds, L., Sleath, P., Benson, D., Ouaiissi, A., & Guderian, R. (1999). 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.

Guevara, A., Garzón, E., Bamabe, C., Córdova, X., Bowen C., Paredes, W., Gómez, E., Ouiaissi, A., Tibayrenc, M. (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.

Guevara, E., 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 diagnóstico de la enfermedad de Chagas, Universidad de los Andes, 1<sup>era</sup> edición, Santafé de Bogotá-Colombia.

Guzmán, E., Zavala, J., Acosta, K., & Rosado, M. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Grijalva, M., Escalante, L., Paredes, R., Costales, J., Padilla, A., Rowland, E., Aguilar, H., & 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.

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

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

Magalhães, J., Andrade, S., & Scerlock, Y. (1996). *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Ver. Inst Med Trop São Paulo*; 38: 23-28.

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

Mazzotti, L. (1940). El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de *Chagas* estudia al triatómino como transmisor de la enfermedad de Chagas.

Mejía, A., & Triana, O. (2005). Análisis de LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomedicina*. Instituto Nacional de Salud.

Melgar, S., Chávez, J., Landaverde, P., Herrera, F., Rodas, A., Enríquez, E., Dorn, P., & Monroy, C. (2007). The number of families of *Triatoma dimidiata* in a Guatemala house. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 221-223.

Melo, R., & Brener, Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosome cruse* strains. *J Parasitol*; 64: 475-482.

Miles, M., Toye, P., Oswald, S., Godfrey, D. (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, M. (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, M., Yeo, M., & Gaunt, M. (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.

Miles, M., Nunes, *et al.*, Rodríguez, *et al.*, & Miralles, *et al.* (2002). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease, en (Kelly JM ed.) Molecular mechanisms in the pathogenesis of Chagas disease.

Miralles, A., Moya, E., García, M., & Rosillo, S. (2002). Chagas disease among the Latin American adult population.

- Montamat, E., de Luca D`Oro, G., Gallerano, R., Sosa, R., & Blanco, A. (1996). Characterization of Trypanosome cruzi populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 625-628.
- Montiel, G., & Díaz, G. (2002). 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.
- Moreno, E., Araujo, M., Alarcón, M., Lugo de Yarbuh, A., Araujo, S., & Borges, R. (2006). Efecto de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. *Rev. Cient.*; 5: 506-16.
- Moser, D., Kirchhoff, L., & Donnelson, J. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiology* 27:1477-1482.
- Muschietti, J. (2010). Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular. Universidad de Buenos Aires
- Naquira, C., Cabrera, R. (2001). Breves reseñas históricas de la Enfermedad de Chagas a 100 años de su descubrimiento y situación actual en Ecuador.

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)*. (Cassab, J., Noireau, F., Guillén, G., eds). Ediciones Gráficas, La Paz, Bolivia.

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

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

Philip, W. (1960). *Chagas disease, a tropical parasitic disease*.

Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., Garcia-Rodriguez, J., Piedrola-Angulo, (1978). *Microbiología y Parasitología Medica*, 2da edición, Salvat editores S.A, Madrid.

Reyes-Novelo, E., Ruíz-Piña, H., Escobedo-Ortegon, F., & Barrera-Pérez, M. (2010). Algunos aspectos biológicos preliminares sobre la reproducción de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de Yucatán, México. (pp. 729-734). In: Cruz-Miranda S., Tello-Flores J., Mendoza-Estrada F., & Morales-Moreno A. (Eds). *Entomología mexicana*. Sociedad mexicana de Entomología A. C. Texcoco, México.

- Rosner, B. (2010). Fundamentals of Bioestistics. Test non parametricals.
- Ruíz-Piña, H., & Cruz-Reyes, A. (2002). The opossum *Difelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of Trypanosome cruse in Dzidzilché, yucatán, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97:613-620.
- Solaris, A., Campillay, R., Ortiz, & Wallace, A. (2001). Identification of Trypanosome cruse genotypes circulating in chilean chagasic patients. *Experimental parasitology* 97: 226-233.
- Taibi, A., Guevara, E., Schoneck, R., Yahiaoui, B., & Ouaissi, A. (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, F. (1998). Izoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
- Valente, S., Valente, V., & Fraiha, H. (1999). Considerations on the Epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 94: 393-398.

Vallejo, G., Guhl, F., Chiari, E., & Macedo, A. (1999). Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Departamento de Biología. Instituto de Ciencias, Universidad de Tolima.

Vargas, F. (2005). Epidemiología Molecular de Trypanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región norte y nororiental del Perú.

Vicuña, Y. (2009). Enfermedad de Chagas en el Ecuador: Estudios epidemiológicos e inmunológicos en la población general Villamil Playas, Provincia de Guayas. Evaluación de la respuesta inmune humoral en infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí-Ecuador.

Villacis, A., & Grijalva, M., (1999). Estudios en vectores *Rhodnius ecuadoriensis* endémicos de la Costa del Ecuador.

Villalba, C., Prado, J., & Ramos, H. (1992). Programa regional para el control de la enfermedad de Chagas en América Latina.

Wendel, S., & Brener, Z. (1992). Historical Aspects. En: Chagas' Disease. American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine (Wendel S.).

World Health Organization WHO. (1991). Control of Chagas' disease- Report of a WHO Expert Committee.

World Health Organization WHO Technical report series 811-Geneva.

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

World Health Organization (WHO). (2010). Chagas Disease: Control and Elimination. Report by The Secretariat. Sixty-Third World Health Assembly A63/17.

Zeledón, R., & Rojas J. (2006). Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 379-386.