

**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.**

**Molecular Characterization strains of *Trypanosoma cruzi* through the PCR technique in samples collected in four communities from General Villamil Playas canton, Guayas Province.**

Jiménez Yáñez Silvia Fernanda

Escuela Politécnica del Ejército

Correspondencia: fer.jimenez.yanez@hotmail.com

**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.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, identificación molecular, caracterización molecular.

### **Abstract**

Chagas disease caused by the parasite *Trypanosoma cruse* 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.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, molecular identified, molecular characterization.

# 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 excoiraciones 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 (Carabarin *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.

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 Triatomíneos (*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 multiclinales, 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).

## METODOLOGÍA

### 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.

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.

### **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.

### **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.

## Procedimiento

### 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 Transmitidas por Vectores (SNEM), los vectores fueron colectados por medio de búsquedas domiciliars y peri

domiciliares, 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.

## 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.** Triatominos 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 triatominos para aislar la cepa, después de obtener parasitemia visible en estos, se procedió a hacer

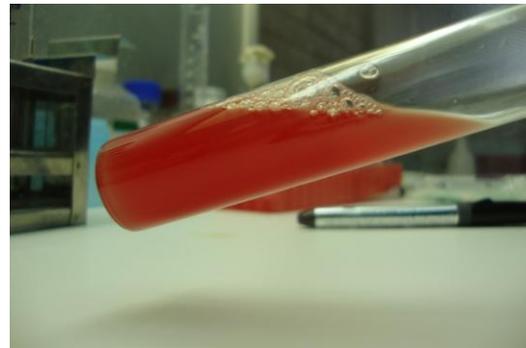
punción cardiaca, por cada ratón se recolectó aproximadamente 1 - 2.5 mL de sangre para posteriormente proceder a infectar con 0.5 mL a seis nuevos ratones de 10 semanas, 25 gramos, con  $10 \times 10^6$  trypomastigotes / mL (Figura 2.7).



**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).

Reactivos	Cantidad
NaCl	7.5g
KCl	0.4g
Triptosa	5g
Sucrosa	2g
Liver infusión	5g
Hemina	20mg
Suero Fetal Bovino	70mL
Estreptomycin (10000 µg/ml)	0.1mL
Penicilina (10000 units/mg)	0.1mL
Gentamicina (10000 µg/ml)	0.1mL

## 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 0.15 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.

### **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.

### **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 encerarlo. 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.

### **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

Primers	Secuencia 5'-3'	Fragmento
S35	AAATAA TGT ACG GKG 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.

Primers	Secuencia 5'-3'	Fragmento
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.

Reactivos	inicial	Rx N°22
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
Vol 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.

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	

Para la prueba de caracterización molecular de las cepas 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 2.5:** Reactivos y cantidades utilizadas para técnica de PCR.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
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 Polymerasa	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.

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 4°C	5min	1 ciclo
	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	

## RESULTADOS

### 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 comunidades de estudio.

Comunidades	Número de Triatominos recolectados	Porcentaje de Triatominos recolectados
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>

### 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%)

### 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.

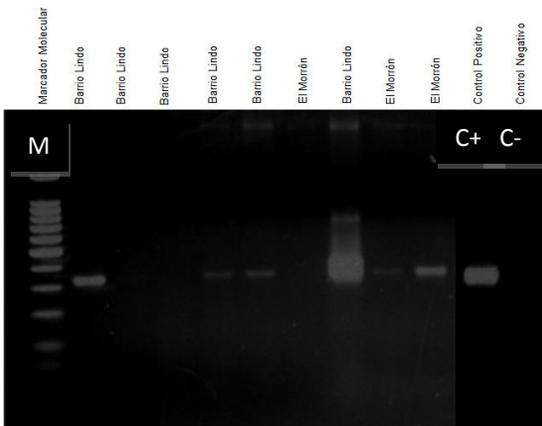
Para la estandarización de la PCR se tomó en cuenta las concentraciones de los reactivos y se dio una estandarización en la corrida de la amplificación (Tabla 3.3, 3.4).

**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.

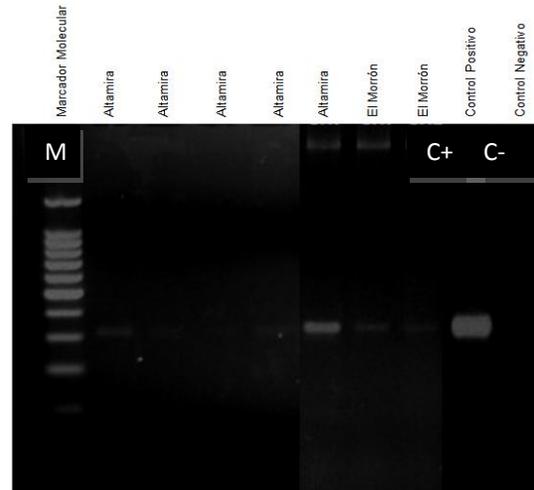
Reactivos	Concentración final Rx N°22
dNTP Mix	1
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1
GoTaq 5X Buffer	3
Primer 1 (2.5µM)	0,4
Primer 2 (2.5µM)	0,4
GoTaq	0,125
Polymerasa	
Agua ultra pura	8,10
ADN	2
Volumen final	16

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

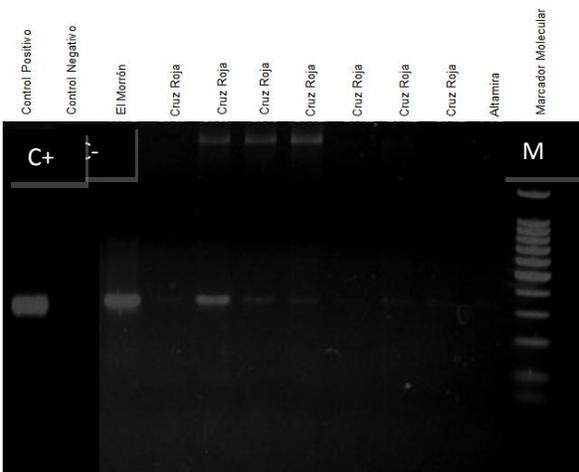
Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95°C	5min	1 ciclo
Desnaturalización 95°C	1min	30 ciclos
Alineamiento 60°C	1min	30 ciclos
Extensión 72°C	1min	30 ciclos
Extensión final 72°C	5min	1 ciclo
4°C	Hasta el análisis de los productos del gel de agarosa	



**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 3.3:** 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.



**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.

### 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.

Barrio	% muestras positivas en la PCR con primers S35 Y S36
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>

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

El ADN inicial de *Trypanosoma cruzi* fue cuantificado mediante fluorimetría 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/μL, hay muestras con una cantidad considerable de ADN las cuales resultaron favorables en la caracterización.

**Tabla 3.6:** Cuantificación del ADN en ng/μL de 25 muestras de heces de *Triatomino*s.

Muestra	Barrio	ng/uL
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

### Caracterización molecular

Las 25 muestras estudiadas para la presencia de *Trypanosoma cruzi*, fueron sometidas nuevamente, bajo las mismas condiciones de

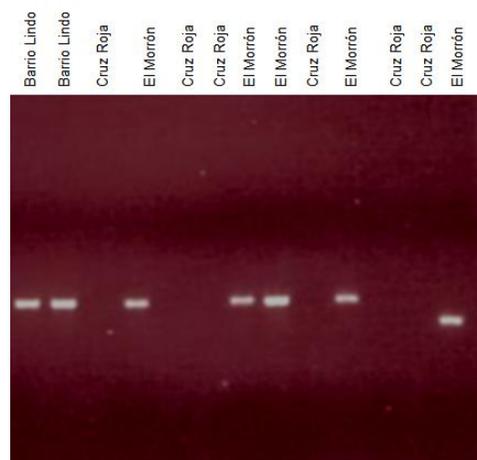
concentración antes mencionadas, ahora con primers TC, TC1 y TC2 (Figura 3.4 y 3.5). Para el análisis de la PCR en la caracterización molecular, se tomaron en cuenta las siguientes concentraciones de los reactivos utilizados, así como también el siguiente procedimiento para su amplificación (Tabla 3.7 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.

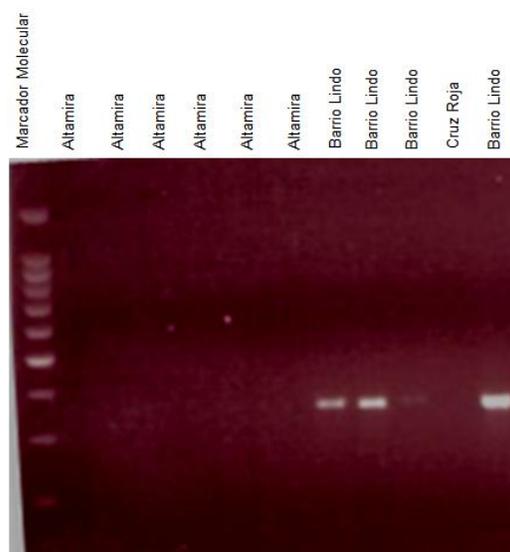
Reactivos	Concentración final
dNTP Mix	0,125
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,25
GoTaq 5X Buffer	2,5
Primer 1 (10 µM)	0,125
Primer 2 (10 µM)	0,125
Primer 3 (10 µM)	0,125
GoTaq Polimerasa	0,05
Agua ultra pura	5,7
ADN	2,5
Volumen final	12,5

**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.

### 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).

### 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 ctcccaaac
	61 aagaatttcg taattttcgg aacccttta
	tgtgtaatt ataccaccta taccttacc
	121 ataccaccaa cacaaccta ccatcaagaa
	tacagaaact atagtatcat caatatcaag
	181 ataacacact caatgcaatc atacaatgcc
	ccacagaaca taacatttg tigtgtaaac
	241 tatatcatta gtatctactc tataaattat
	tattccgga cccctctcac ctctacatta
	301 caccaacccc aatggaaccc ccacctccc
	gaaaaatca caaatcaat aaaataatgt
	361 acgggggaga tgcattgatt ttggcccaa
	aagtgaacg cccctcccaa aaccaacatt
	421 tctgaaatt ccacatctt tcaacctg
	ttataccata ccacaatcta ttaccacca
	481 tccaaccaa caccaaata taaatgtaa
	ctgaatacat aactacaata acgtaacaa
	541 atctatcca caaactaca ccattgtctc
	ttacacaatg ttctcaacta catcattata
601 attacagaaa atatactata tctaaagac	
tcattataat atccaaaacc caccctcca	
661 cctcccttat atacaccaa cccaatcga	
acc	

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

Secuencia primers	Nucleótidos (BLAST)
<b>S36</b>	1 ataatgtacg ggggagatgc atgattttc
	cgccccaaat tgaacgccc ctcccaaac
	61 cacattttcc gaatcctcat aaccattcc
	taacccttac acaacattat aagattatc
	121 aacaaactat agaataataa agaatatatt
	gtctaattta tctatacaa catatcttat
	181 ctcttatatc atagttaata taatacacct
	ctacatacta taaacataca taacacctct
	241 acaccatatt caattccaaa ttactacta
	caccacccta tctaccacac cacattacca
301 cctctatatt acaccaaccc caatggaacc	

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

Secuencia primers	Nucleótidos (BLAST)
TC2	1 acctgcaggc acacgtgtgt gtgtgtatgt atgtgtgtgt gccccacca cctccggctc 61 cttcatgttt gtgtcgtcgc tgccttgc tgcgaagca cgggtgcctg tcgtgtccgt 121 ctgctgctt tgtgttctg cactccaccg cgtgttttac ggtgtgcct gcgtttttg 181 gtgttttct gctttttcc cgtttttgg ctctcgcac tgaaccgcct gcacacaccg 241 ctccgcacgc attagtgcg tgtgtccgc cccccgacac ttctgtggc gctgatcggg 301 cgactccgcc ag

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

**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).

### **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 Triatomíneos 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 Triatomíneos por microscopía de luz es una de las técnicas ampliamente utilizadas para estimar la prevalencia de Triatomíneos naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* en estudios de vigilancia entomológica y de Triatomíneos 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).

### **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 Triatomíneos 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).

### **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.

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.

## 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-Yarbuh 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 *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*; 81: 222-9.

Botero & Restrepo. 2003. *Parasitosis Humana*. Cuarta edición; 7: 210-235.

Breniere Z. 2002. Life cycle of *Trypanosoma 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*.

Carabarán 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 of 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. Trypanosome cruce: Mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* 2003; 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., Ouaisi A., Guderian R. Evaluation of a recombinant protein (RTC24) and synthetic peptides in anti-*Trypanosoma cruzi* positive samples from blood bank donors in chagasic endemic areas of Ecuador. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 19-22. 1999.

Guevara 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., Ouaisi 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.

Kirchhoff 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., Teye 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 *Trypanosoma 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 amplication using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiology* 27:1477-1482.

Muschiatti 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. 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. *Clinica 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 Biostatistics. 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.