

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de Sangre por medio de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como un Método Específico en el Diagnóstico Rápido de la Enfermedad de Chagas

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by various symbols including a cross, a book, and architectural elements. The text 'UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA' is inscribed around the perimeter of the seal.

INFORME DE TESIS

Presentado por

JULIA ELISA ANTONIETA MACHUCA HERNANDEZ

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, Agosto del 2000.

DL
06
T(2048)

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA:	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
SECRETARIO:	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I:	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
VOCAL II:	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
VOCAL III:	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV:	Br. César Alfredo Flores López
VOCAL V:	Br. Manuel Anibal Leal Gómez

DEDICATORIA

Dedico Esta Tesis a:

A Dios y a la Virgen Maria

Que me permitieron llegar hasta aqui

A mi patria Guatemala

A mis Padres

Lic. Leonel Machuca Quiroa
Olga Laura Hernández de Machuca
Gracias por su confianza y apoyo.

A mis Abuelos

Con mucho cariño

A mis Hermanos

Kilbert, Glenda, Brasil y Leonel
Que han sido mi ejemplo.

A mis Sobrinos

Con cariño

Al Dr. Julio Cesar Argueta

Por su colaboración incondicional

A mis Compañeras

Nancy Ayala Contreras
Ana Myriam Vargas Gudiel

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a todas las personas voluntarias que hicieron posible la realización de este trabajo.

Licda. María Eugenia Paredes Sánchez Por su asesoría en la investigación.
Licda. Vivian Matta

Lic. Gerardo Arroyo Por su apoyo y colaboración
Licda. María Paula De León
Lic. Rafael Pratdesabal
Dr. Carlos Mendoza

Sra. María Eugenia Garzaro Por su apoyo

Al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
	1. Agente etiológico	5
	2. Vector	6
	3. Epidemiología	8
	3.1 Prevalencia	8
	4. Transmisión	13
	5. Patología	14
	6. Sintomatología	16
	6.1 Enfermedad de Chagas adquirida	16
	a. Periodo agudo	16
	b. Período latente o indeterminado	17
	c. Periodo crónico	17
	6.2 Enfermedad de Chagas congénita	17
	6.3 Enfermedad de Chagas transfusional	18
	7. Inmunidad	18
	8. Diagnóstico Serológico	19
	9. Diagnóstico Parasitológico	20
	9.1 Examen microscópico	20
	9.2 Cultivo	20
	9.3 Inoculación en animales	21
	9.4 Xenodiagnóstico	21
	9.5 Diagnóstico diferencial	21
	10. Reacción en cadena de la polimerasa	22
	10.1 Temperatura y tiempo de ciclo térmico	24
	10.1.1 Desnaturalización inicial	24
	10.1.2 Hibridización de cebadores	24

10.1.3	Extensión del cebador	25
10.1.4	Desnaturalización	25
10.1.5	Número de ciclos	25
10.2	Extensión final	26
10.3	ADN polimerasa	26
10.4	Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)	26
10.5	Cebadores	27
10.5.1	Concentración de cebadores	27
10.6	Adición de aceite y volumen de reacción	27
10.7	Muestras de ADN	28
10.8	Utilización de PCR para Diagnóstico	28
11.	Tratamiento	31
12.	Pronóstico	32
IV.	Justificación	33
V.	Objetivos	34
VI.	Materiales y métodos	35
VII.	Resultados	48
VIII.	Discusión de Resultados	57
IX.	Conclusiones	60
X.	Recomendaciones	61
XI.	Glosario	62
XII.	Referencia	64

I. RESUMEN

Debido a que en Guatemala no se ha utilizado previamente la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas, este trabajo consistió en estandarizar este método en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología, para así lograr la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre completa de pacientes chagásicos.

Para ello se utilizaron los cebadores S35 y S36, los cuales permiten la amplificación de una región del minicirculo del kinetoplasto, la cual es altamente específica para cada especie y no presenta interferencia con el ADN humano. Como muestra se utilizó sangre completa heparinizada de 40 personas distribuidas en la siguiente forma: 15 muestras de personas que padecían la enfermedad y procedían de área endémica (Zacapa), 10 muestras de personas con o sin enfermedad de área endémica (Santa María Ixhuatán) y 15 muestras de personas de área no endémica (Sololá), a quienes se les realizó pruebas serológicas para la enfermedad.

En la estandarización se trabajó con diferentes programas en el termociclador, concentraciones de reactivos, así como reactivos de diferentes casas comerciales, volúmenes de reacción, etc. Los mejores resultados se obtuvieron con la Taq polimerasa de Sigma a una concentración de 1 Unidad que equivalía a 0.25ul para un volumen total de reacción de 25ul, además de una concentración de 4.5mM de MgCl₂. Otra Taq polimerasa que funcionó muy bien fue la preparada a partir de *E. coli* conteniendo el clon para Taq, en el Departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, con la técnica introducida por la Dra. Dorn de la Universidad de Loyola, la cual dió muy buenos resultados al utilizarse 1ul de ésta por volumen total de reacción de 25ul, en unión con un buffer elaborado en FIOCRUZ (Brasil), que posee una concentración de 3.5uM de MgCl₂.

Se evaluó también la técnica de "Hot Start" con la cual se observaron bandas mucho más claras y sin presencia de bandas inespecíficas, pero tuvo la desventaja de que la parafina que se utiliza en esta prueba puede constituirse en causa de error al colocar las

muestras para electroforesis, ya que requiere mucha destreza y mayor consumo de tiempo. Sin embargo constituye una buena alternativa para mejorar la especificidad.

A las muestras se les realizaron pruebas serológicas tales como: aglutinación con partículas de látex, aglutinación con partículas de gelatina e inmunodifusión directa, las cuales fueron comparadas con los resultados de PCR obteniéndose una correlación del 100 por ciento, tanto en las muestras del área endémica de Zacapa como en las del área no endémica de Sololá. Los resultados serológicos fueron comparados con PCR por medio de Kappa; en las muestras del área endémica de Zacapa y del área no endémica de Sololá se obtuvo un Kappa = 1 que demuestra una concordancia total y es un resultado excelente ya que se demostró que la técnica de PCR no detecta falsos positivos ni falsos negativos, mientras que en el área endémica de Santa María Ixhuatán el Kappa obtenido fue de 0.286, debido posiblemente a contaminación de las muestras.

Utilizando una curva de calibración realizada con la cepa H17, se determinó que el método es capaz de detectar hasta 0.115 parásitos (restos metabólicos) en una muestra de 5ml de sangre completa; y aunque se obtuvo una buena correlación entre la serología y el PCR, se recomienda realizar más ensayos con la técnica de PCR en una población mayor, en la que se estudien los falsos positivos con otras enfermedades parasitarias antes de utilizar este método como examen de rutina. En el futuro este método podrá ser utilizado como examen confirmatorio para todos aquellos casos con serología positiva, así como para monitorear a los pacientes bajo tratamiento ya que por estudios realizados en otros países se sabe que permite determinar la eficiencia del mismo.

II. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una de las causas de morbilidad y mortalidad en Latino América. El agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, que produce complicaciones clínicas que se desarrollan 10 a 20 años después de haber ocurrido el contacto, con el apareamiento progresivo de desórdenes cardíacos, digestivos y neurológicos (1). Es transmitido por un triatoma, por lo que está íntimamente relacionado con factores socioeconómicos, pues estos viven en grietas y agujeros de las paredes de adobe, bajareque, palo pique y otras estructuras de casas del área rural y urbana. Además el humano lo puede transmitir por otras rutas, como transfusiones de sangre o infección congénita. Durante la fase inicial, la detección directa del parásito en sangre es difícil debido a los bajos niveles de parasitemia. Igualmente, la detección del parásito en la fase crónica requiere la utilización de métodos biológicos como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, debido a que los niveles de parasitemia son mucho más bajos que en la fase aguda (2).

El xenodiagnóstico es uno de los ensayos más sensibles y específicos para la detección directa del *T. cruzi* en sangre de pacientes chagásicos en la fase crónica. Sin embargo diversos autores reportan positividad en el xenodiagnóstico en un rango desde 17 a 70 por ciento de pacientes serológicamente positivos (3). Los exámenes serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica poseen alta sensibilidad pero baja especificidad debido a reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania* sp. y *T. rangeli* (4,5). En ensayos serológicos, sólo se detectan anticuerpos contra el parásito y no la presencia del parásito en sí; por tanto es muy importante considerar el tipo de examen a utilizar en el seguimiento de pacientes bajo tratamiento de esta enfermedad (2).

Debido a lo anterior, se ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas más sensibles que permitan realizar un mejor diagnóstico. Entre estas técnicas se encuentra la búsqueda de antígenos, fracciones antigénicas o del ADN del parásito en fluidos corporales. En este estudio se estandarizó el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para demostrar la presencia de ADN de *T. cruzi* en sangre completa como una nueva alternativa

de diagnóstico, que ofrece varias ventajas, entre ellas alta sensibilidad y especificidad de resultados.

III. ANTECEDENTES

En 1909, Carlos Chagas se desempeñaba como médico de Minas Gerais, Brasil cuando fue informado que en las paredes y techos de las viviendas de los trabajadores habían ciertos insectos que de noche picaban y succionaban sangre. En el intestino de estos insectos encontró unos protozoos flagelados que llamó *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz. Al inocular el parásito en un grupo de monos a las tres semanas recuperó los tripanosomas circulantes de la sangre de éstos. Posteriormente, aisló el parásito de la sangre de un niño con fiebre, anemia y linfadenopatía generalizada. Con ello demostró que este tripanosoma es el agente patógeno de una enfermedad endémica de ciertas regiones de Brasil, a la que le llamó "Tripanosomiasis Americana". Es con toda justicia que esta enfermedad tiene como epónimo Enfermedad de Chagas (6,7). El segundo país en donde se diagnosticó la Tripanosomiasis Americana, fue El Salvador, por Segovia en 1913 (6).

1. Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protozoo mastigóforo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos y un insecto vector. Los huéspedes mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos (el perro o el gato) o silvestres (diversos mamíferos, especialmente los roedores y los carnívoros) (8).

En sus diversos huéspedes y en medios de cultivo, *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos fundamentales: amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote.

El amastigote es la forma leishmanoide de Wenyon. Se trata de un elemento redondeado de unos dos micrómetros de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el kinetoplasto, al microscopio de luz aparentemente es aflagelado, pero en la ultraestructura se observa que posee un corto flagelo no emergente; es la forma de multiplicación del parásito y lo hace en el interior de las células del mamífero.

El promastigote también se encarga de la división celular y se diferencia del anterior

en que se encuentra en el intestino del vector.

El epimastigote corresponde a la crithidia de la antigua clasificación. Es de aspecto fusiforme, de unos veinte micrómetros de largo, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo o a su nivel, y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Predomina en los cultivos libres de células.

El tripomastigote es de aspecto fusiforme, de unos 20 micrómetros de largo, con kinetoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso; posee un kinetoplasto subterminal, posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. No se multiplica, se le encuentra en la sangre de los mamíferos siendo el diseminador de la infección por vía sanguínea (8,9).

T. cruzi puede crecer en casi todas las células del huésped vertebrado; fibroblastos, células adiposas, células de médula ósea, células del músculo estriado, del bazo, de los nódulos linfáticos, del hígado, riñón o células nerviosas, pero tienen mayor afinidad por las células nerviosas que se encuentran en el músculo liso (10).

2. Vector

Los insectos vectores son reduvídeos, de la familia de los triatomíneos, y están representados por diversos géneros de triatomas. Estos insectos se infectan al ingerir la sangre de los mamíferos que contiene tripomastigotes. En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican muy activamente como epimastigotes por fisión binaria y al cabo de quince a treinta días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma (8).

Es de hábito exclusivamente nocturno que produce una picadura completamente indolora. Tiene especial predilección por la cara o los sitios al descubierto (11). Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes metacíclicos, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas, cuando el mamífero se rasca (8).

Los animales domésticos, mamíferos, aves, etc., así como animales silvestres (armadillo, murciélago, tacuazín, etc.) son igualmente atacados. Además sirven de reservorio ya que no presentan la enfermedad y están asociados a falta de higiene y salubridad (6, 10, 12)

Estos se adaptan mejor a los climas secos, generalmente habitan en casas rurales y suburbanas donde existen condiciones favorables para su desarrollo. Se les encuentra en ranchos techados de zacate o de cualquier clase de paja, en las paredes de palo pique, de barro no cocido o bajareque. Durante el día se ocultan entre el techo pajizo, grietas de las paredes, entre la madera de catres, gallineros, en lugares en donde duermen animales domésticos, etc. (11).

Manifiestan cierto grado de canibalismo, mediante el cual insectos en ayunas que no han podido satisfacer su apetito, se arrojan sobre sus congéneres llenos de sangre y los succionan por punción abdominal (10).

Para que la fecundación de los huevos tenga lugar debe preceder una punción de sangre, en caso contrario los huevos son estériles. Las larvas que salen de los huevos sufren diferentes mudas pasando por el periodo de ninfa antes de transformarse en adultas (11, 13).

Tres son los factores de principal importancia en la eficiencia del vector: 1) grado de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, 2) Tiempo de intervalo entre alimentación y defecación y 3) grado de contacto con el huésped humano (14).

Los vectores más importantes son: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*. *Rhodnius prolixus*. (10).

3. Epidemiología

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos.

De acuerdo con la OMS existirían alrededor de 24 millones de personas infectadas en el continente. Los triatomas que transmiten la infección por *T. cruzi*, se distribuyen en un área que se extiende desde el paralelo 43° de latitud norte (sur de California), hasta el paralelo 49° latitud sur (región central de la Argentina). En esta extensa región, prevalecen las condiciones ecológicas favorables para la transmisión y la manutención de la parasitosis (8, 15).

La severidad e irreversibilidad de las lesiones cardíacas y de otros órganos, provocan invalidez y mortalidad entre los grupos económicamente activos. Sin embargo, las estadísticas sanitarias no reflejan la verdadera magnitud del problema, porque la enfermedad prevalece en zonas suburbanas o rurales donde la atención médica no capta, en su integridad, la importancia de la infección (15).

El conocimiento de la magnitud de la infección chagásica y su repercusión sobre la salud y la economía de los países latinoamericanos varía grandemente, ya que la falta de recursos para el diagnóstico y la ausencia de estudios anatomopatológicos dificultan el conocimiento de las diversas formas clínicas, por lo que muchos casos son registrados como muerte súbita, especialmente en el área rural. (8, 15).

3.1. Prevalencia

La primera publicación referente a la existencia de tripanosomas en el país, la debemos a la inquietud científica del maestro Dr. Rafael Morales, quien aún siendo estudiante presentó en la revista "La Juventud Médica" (Tomo XIV, No. 3, marzo 1914), su comunicación: "Los Tripanosomas en Guatemala" (*Trypanosoma lewisi*), que encontró en algunos roedores en la ciudad capital (16).

La historia de la enfermedad de Chagas se inicia en Guatemala en 1932, cuando invitado por los señores Nottebom vino el Profesor Dr. Edward Reichenow, del Instituto de Medicina Tropical y de la Universidad de Hamburgo, con el propósito de efectuar investigaciones científicas en fincas cafetaleras en los departamentos de Santa Rosa y Escuintla. En un folleto, de 24 páginas publicado por la Dirección General de Sanidad, Reichenow nos refiere con amplitud de detalles el resultado de sus estudios efectuados en la finca "Las Viñas", del municipio de Barberena, departamento de Santa Rosa y luego en "San Andrés Osuna" y "Concepción", del Departamento de Escuintla. Obtuvo numerosos ejemplares e hizo cuidadosas observaciones de un redúvido que por sus características morfológicas supuso que se trataba de *Triatoma dimidiata*, del que presentó tres fotografías: cara dorsal, perfil y estadios ninfales en quienes encontró un 40 por ciento de infección por *Trypanosoma cruzi*. Igual proporción halló en ejemplares de redúvidos procedentes de las fincas "Sabanetas" y "Cerro Redondo" y algunos de Cuilapa que le diera el Dr. Augusto González y uno de San Miguel Chicaj, municipio del departamento de Baja Verapaz, proporcionado por el Sr. Carlos Lehnhoff. En la finca "Las Viñas", practicó exámenes de sangre a noventa perros, quince menores de cuatro meses, en los que encontró tres infectados con *T. cruzi*. En parte de su trabajo nos dice: "He inyectado el contenido del recto de chinchorras infectadas a algunos cuyos, a un conejo joven y a dos perritos, habiendo apreciado sin excepción, en la sangre de estos animales, después de un intervalo de doce a veintinueve días, flagelados del aspecto característico del *T. cruzi*" (16, 17).

La culminación de las investigaciones de Reichenow fue el diagnóstico de los dos primeros casos de enfermedad de Chagas en Guatemala. "En el primer caso se trata de un niño indígena que, cuando se encontraron los tripanosomas, tenía un año y seis semanas de edad, estando bien desarrollado y dando la impresión de completa salud". "En el segundo caso en el que comprobé la infección, se trataba de un niño hijo de ladinos. Tenía un año y siete meses de edad, estando igualmente bien desarrollado". En ambos casos sólo se pudo observar algunos ganglios axilares e inguinales aumentados de volumen. Por esos años aun se afirmaba que el mixedema, bocio y cretinismo eran secuelas de enfermedad de Chagas; al no encontrar esos síntomas en los adultos que examinó en "Las Viñas" hicieron que Reichenow diera como conclusión de sus investigaciones: "Por lo

tanto, si por una parte pude identificar la existencia de la enfermedad de Chagas en Guatemala, por otra parte estoy persuadido de que esta enfermedad no tiene la gran importancia que se le ha querido dar". Fue lamentable que después de acuciosas observaciones sobre vectores y reservorios, el investigador alemán, en base a dos casos asintomáticos en niños y a la ausencia de trastornos bociógenos en adultos, estuviese convencido de la poca importancia clínica de la enfermedad de Chagas. Afirmación que contribuyó a detener por una década su investigación en nuestro país (16).

En 1935, el Dr. Romeo de León inicia el estudio de esta enfermedad reportando la existencia de nuevos casos humanos, y el descubrimiento del TSP (*Trypanosoma* no clasificado) en los monos. Un año más tarde identificó un tripanosoma con marcas diferentes a *T. cruzi* y al que denominó *Trypanosoma guatemalensis*. Comunicó estos hallazgos en el primer Congreso Interamericano de Medicina, celebrado en Río de Janeiro, en 1946, luego en el Congreso Médico Estudiantil, en México 1947 y en el primer congreso de Malariología en Maracay, también en 1947. En este último quedó establecido que el flagelado denominado por De León *T. guatemalensis*, ya había sido descrito con anterioridad por Tejera como *T. rangeli*. Por ley de prioridad fue el último nombre el aceptado y quedó que De León fue el primero en descubrirlo en casos humanos ya que Tejera lo identificó en reduvidos, transmisores invertebrados. *T. rangeli* es considerado como el agente etiológico de la tripanosomiasis americana en forma benigna, ya que hasta la fecha no se ha podido demostrar su valor patológico (16 - 20).

Autores sudamericanos como Maza y Talice descartan definitivamente la relación entre trastornos tiroideos (bocio y cretinismo) y enfermedad de Chagas (16).

En julio de 1947, El Dr. Jorge A. Fernández observa en el tercer servicio de mujeres del Hospital General "San Juan de Dios", de la ciudad capital, el primer caso de cardiopatía chagásica con comprobación histológica (necrópsica), trabajo que es continuado y completado más tarde por Tejada. Por motivos que indica el autor, la publicación se hizo cinco años después, en la revista La Escuela de Medicina, en su sexta época. El diagnóstico microscópico se hizo en el Laboratorio de Histopatología que entonces estaba a cargo del

Dr. Francisco J. Aguilar. Durante 1952 - 1954, el intenso trabajo de Peñalver y col., permitió la descripción de la enfermedad en diversas zonas rurales del país, y la realización de las primeras acciones del gobierno con el objeto de iniciar las campañas de erradicación (16 - 20).

Este y otros trabajos permitieron establecer que los principales vectores de *T. cruzi* en el país eran *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*, siendo los tres hematófagos, con hábitos domiciliarios, así como describir la zona endémica del país que incluyó a los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa (17 - 20).

Los nuevos conocimientos aportados por estos trabajos al describir la enfermedad en zonas rurales, permitieron que a nivel de gobierno se realizaran las acciones con el fin de erradicar esta enfermedad. Desafortunadamente a partir de estos trabajos (1954) es poco lo que a nivel nacional se sabe de la enfermedad ya que los datos obtenidos, especialmente desde 1980, corresponden a trabajos de investigación aislados y realizados por las Universidades. En la sección de Tripanosomiasis de la Dirección General de Servicios de Salud, el diagnóstico se realiza temporalmente y los casos remitidos a esta sección se realizan en forma voluntaria ya que no se realiza una vigilancia epidemiológica (17, 18, 21).

De 1960 a 1983 es poca la información que se tiene, ya que con el tiempo se fue dejando de producir los reactivos y por lo consiguiente no se realizó el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En el Departamento de Citohistología de la Fac. de CCQQ y Farmacia se realizó un estudio de 1984 a 1987, el cual permitió determinar que la prevalencia general es del 9.24 por ciento, encontrándose que los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa presentaban las prevalencias más altas, así también se determinó que el área endémica abarcaba más departamentos, lo que parecería indicar una migración de la enfermedad (22).

Hasta 1989 no era una enfermedad de notificación obligatoria en el Ministerio de Salud Pública, el cual creó el Departamento de Chagas adscrito al Servicio Nacional de Erradicación de malaria SNEM, por la cantidad de casos acaecidos. Para la creación del centro de referencias Clínicas se logró algunos contactos con organizaciones internacionales como el convenio de cooperación entre el gobierno de Guatemala y Japón, con la colaboración muy estrecha de la Universidad de San Carlos de Guatemala de 1991 a 1996, y el convenio en 1994 con la División de Malaria con el apoyo de la O.P.S. los cuales colaboraron en investigaciones con las que se avanzó y se obtuvieron mayores logros acerca de la enfermedad de Chagas, entre las cuales se citan algunas a continuación (22).

Matta y colaboradores a fin de evaluar la presencia de la infección congénita, de 1989 - 1991 llevaron a cabo en el hospital de Chiquimula un estudio con una muestra de 600 parejas madres/neonatos donde se detectaron cinco niños con infección congénita, de los cuales únicamente tres presentaron sintomatología sugestiva. En este caso se utilizó la técnica de IHA-Hoechst y reactivos de ELISA (antígeno soluble) e IFI preparados en el Departamento de Citohistología con la cepa Y. Los resultados demostraron que esta transmisión existe en Guatemala. Debido a lo anterior el Departamento de Citohistología en 1992 realizó un estudio con 32 recién nacidos de madres chagásicas que visitaron el Hospital Nacional de Zacapa y que tenían títulos de anticuerpos IgM específicos a *T. cruzi* pero con hemocultivos y parasitemia negativa, lo cual hacía dudar el diagnóstico de infección chagásica congénita. Se les realizó un seguimiento por un año con determinaciones sucesivas de IgM (ELISA) y de IgG (ELISA, IHA), observándose que la IgM se negativizó aproximadamente a los 6 meses, mientras que la IgG aumentó progresivamente (22).

En 1994, Paz y colaboradores realizaron un estudio con 30 sueros de pacientes adultos originarios de Santa María Ixhuatán y Santa Rosa, que presentaron positividad en por lo menos dos métodos serológicos de rutina (IHA, ELISA y/o IFI) en los que se quería confirmar la enfermedad por medio de técnicas inmunoquímicas y con los cuales se obtuvo una buena correlación (23).

En 1995, Matta y colaboradores realizaron un estudio con 544 muestras de la población de Santa María Ixhuatan, observándose una mayor seroprevalencia en el sexo femenino (64 por ciento), así como una tendencia al incremento progresivo de la seropositividad con el aumento de edad, ya que los rangos de edad más afectados fueron: mayores de 40 años con 44 por ciento de los casos positivos y 31 a 39 años con 18 por ciento. La población adulta con la que se trabajó fue de 314 personas, de ellos 37 (13.35 por ciento) fueron positivos para la enfermedad de Chagas, siendo mayor para el sexo femenino con 25 personas (13 por ciento) de positividad y 12 (9.8 por ciento) para el sexo masculino, probablemente esto se debió a la mayor afluencia del sexo femenino. De los 37 seropositivos, 7 pacientes presentaron hallazgos anormales electrocardiográficos como bloqueo completo de rama derecha (BCRD) y eje desviado a la izquierda (EDI); en el sexo femenino el hallazgo más frecuente fue BCRD mientras que en el sexo masculino fue EDI. Se llegó a la conclusión de que este porcentaje bajo observado nos indica que estas anormalidades no son signos patognomónicos de la enfermedad de Chagas, lo que hace necesario realizar el diagnóstico en base a los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio (24).

4. Transmisión

El hombre puede infectarse por *T. cruzi* mediante diversos mecanismos:

- El más importante es por las deyecciones de triatomíneos. El insecto, al picar en zonas descubiertas de la piel del hombre durante el sueño, elimina sus heces con los tripomastigotes metacíclicos que penetran por el sitio de la picadura o por las mucosas.
- Vía transplacentaria. Una madre infectada puede transmitir los *Tripanosoma cruzi* circulantes en la sangre durante la segunda mitad de la gestación. Esto ocasiona una infección congénita.
- Vía transfusional. Esta constituye un peligro real, puesto que *T. cruzi* mantiene su viabilidad en las bolsas de sangre refrigeradas hasta por dos meses.
- Por trasplante de órganos. Esto ocurre principalmente en trasplantes renales, de donadores infectados cuyos receptores son seronegativos para la enfermedad de Chagas.

- Por lactancia materna. Es una remota posibilidad de infección. En la literatura se refieren varios casos bien documentados de este mecanismo de transmisión.
- Por la manipulación de sangre y animales infectados, como ocurre en las infecciones accidentales que se producen en los laboratorios que trabajan en la enfermedad de Chagas experimental, o en los individuos que descueran animales silvestres o semidomésticos infectados (25).

En forma experimental, se ha demostrado la transmisión de *T. cruzi* por vía oral, sea por infección directa con el flagelado o mediada por moscas (*Musca domestica*), que previamente han digerido deyecciones de triatomas infectados con el parásito. Probablemente, este mecanismo de transmisión tenga poca o ninguna significancia para la infección directa del hombre.

Es más frecuente que la infección chagásica ocurra en la niñez, aunque la sintomatología suele aparecer muchos años después de la primoinfección. Por causas no determinadas, el compromiso visceral miocárdico o del tubo digestivo es más frecuente en el sexo masculino (25).

5. Patología

En el hombre se han detectado autoanticuerpos que reaccionan contra el endotelio, los vasos y las células musculares del corazón (anticuerpos EVI). Estos anticuerpos están presentes en el 95 por ciento de los pacientes con miocarditis chagásica crónica activa y en el 45 por ciento de los individuos infectados asintomáticos. El rol patógeno de los anticuerpos no está claro. Se piensa que existirían determinantes antigénicos comunes a las células cardíacas y a *T. cruzi*, lo que induciría la producción del daño por parte de los linfocitos sensibilizados por el parásito (26, 27).

En el huésped vertebrado, *T. cruzi* produce una destrucción de células y de tejidos que resulta proporcional a su velocidad de multiplicación. Como es un protozoo que se multiplica en el interior de las células, se forman los pseudoquistes, que antes se conocían como "Nidos de Leishmanoides". Al inicio de la infección, el organismo reacciona con una

inflamación predominantemente polimorfonuclear y con la aparición de anticuerpos séricos aglutinantes y precipitantes. A medida que continúa la multiplicación endocelular del tripanosoma, los componentes antigénicos, constituidos por los parásitos muertos y el material proteico de las células destruidas, determinan una inflamación predominantemente linfoplasmocitaria y un ascenso de los títulos serológicos. La parasitemia, al inicio muy elevada, se va haciendo escasa. La inflamación va aumentando progresivamente, lo que contrasta con la disminución, y casi desaparición, de los pseudoquistes de los tejidos (26, 27).

En la enfermedad de Chagas existe compromiso de los órganos ricos en sistema fagocítico mononuclear (ganglios linfáticos, hígado y bazo), sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos, especialmente el tubo digestivo. En la fase aguda de la infección se observa un aumento de volumen de los ganglios, esplenomegalia y hepatomegalia, meningoencefalitis y cardiomegalia por la dilatación de las cavidades del corazón. En la fase crónica, el compromiso se centra fundamentalmente en el miocardio y en el tubo digestivo. En estos casos se desarrollan enormes cardiomegalias por la dilatación e hipertrofia del miocardio, con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que puede ocasionar un verdadero aneurisma, sobre todo en la punta del corazón. El tubo digestivo, principalmente el esófago y el colon, aparecen elongados y muy dilatados, con importante hipertrofia de la capa muscular, son megas digestivos tan característicos de la fase crónica de la tripanosomiasis (26, 27).

El desarrollo de un mega depende del número de neuronas comprometidas. Después de años, se produce la hipertrofia muscular, la dilatación y la elongación del órgano hueco. En el corazón, al producirse la despoblación neuronal de los ganglios parasimpáticos cardíacos, se establece un desequilibrio neurovegetativo, con un predominio relativo del sistema simpático. Así, se produciría un trabajo cardíaco desgastante que da como resultado una cardiopatía chagásica (26, 27).

6. Sintomatología

6.1 Enfermedad de Chagas Adquirida

Después de un período de incubación, estimado entre cuatro y catorce días se desarrolla la enfermedad en la cual se distinguen los periodos agudos, latente o indeterminado y crónico (8, 28).

a. Período Agudo

La inmensa mayoría de los pacientes adquieren la infección sin manifestaciones clínicas evidentes y sólo alrededor del 5 por ciento de los infectados tienen una fase aguda sintomática. Si bien el período agudo se puede presentar a cualquier edad, es mucho más frecuente en el niño.

- Chagoma de inoculación: La primoinfección o "chagoma de inoculación" habitualmente se produce en la cara, pero también puede afectar otros sitios. Cuando los tripomastigotes invaden la piel periorbital o conjuntival, se produce el complejo oftalmoganglionar o "signo de Romaña-Mazza" caracterizado por un edema periocular unilateral, bipalpebral, elástico, duro de color violáceo (ojo en tinta) e indoloro, que puede dificultar la apertura palpebral. Se presenta además hiperemia de la conjuntiva, escasa secreción conjuntival, dacriocistitis y adenopatía satélite, destacándose un ganglio sobre los demás.
- Compromiso visceral: Es más frecuente observarlo en niños. En un menor de 2 años, se presenta como un cuadro grave, caracterizado por fiebre de intensidad variable, habitualmente no más elevada de 38°C, hepatoesplenomegalia y poliadenopatías generalizadas, anasarca, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia y meningoencefalitis. En el niño mayor, el cuadro es semejante, pero más atenuado y en el adulto es de rara observación. El compromiso cardíaco se debe a una miocarditis de intensidad variable. Se describen formas de aumento moderado del corazón, con escasa sintomatología y ligeras alteraciones del ECG; pero también se

observan casos severos y graves, con gran cardiomegalia.

La meningoencefalitis suele observarse en el niño menor, se caracteriza por trastornos motores, convulsiones, vómitos y compromiso sensorial, con discretas alteraciones del LCR que son de mal pronóstico (8, 28 - 30).

b. Período Latente o Indeterminado

Transcurrido el período agudo, la sintomatología desaparece y se entra en un estado de latencia, caracterizado por una lenta multiplicación intracelular de los parásitos y oligoparasitemias, sin signos clínicos. La curación espontánea con eliminación del parásito, es rara. Este período puede durar indefinidamente durante toda la vida o pasar a la forma crónica de la enfermedad (8).

c. Período Crónico

Aparece usualmente en forma habitual después de diez o más años de una primoinfección. Se caracteriza por el daño irreversible de algunos parénquimas, especialmente del corazón y de los órganos huecos, además de presentar niveles mucho más bajos de parásitos que en la fase aguda (8, 28).

6.2 Enfermedad de Chagas Congénita

El paso de *T. cruzi* al feto, durante la gestación, determina un cuadro clínico caracterizado por prematurez, hepato, esplenomegalia y compromiso variable del sistema nervioso central y el miocardio (8, 28, 30).

El peso del niño al nacer suele ser inferior a 2,500 gr. El aumento del volumen del hígado y del bazo constituyen los signos principales de la infección. Habitualmente el cuadro clínico evoluciona sin fiebre. En alrededor del 50 por ciento de los casos se observan signos y síntomas de meningoencefalitis, con alteraciones del LCR (hiperalbuminorraquia y elevado número de linfocitos). El compromiso cardíaco, aunque

con menor frecuencia, suele desencadenar una insuficiencia cardiaca congénita, con el ECG alterado (8, 28, 29, 31).

Además suele observarse una anemia leve, a veces con caracteres hemolíticos e ictericia. En la piel aparecen chagomas, con placas eritematosas y pústula central, localizados en las extremidades inferiores. Sin embargo, no todos los niños con infección chagásica congénita presentan una sintomatología; puede ocurrir que el peso del niño al nacer sea normal y el hallazgo de hepato y esplenomegalia haga sospechar de la enfermedad. La enfermedad de Chagas congénita debe ser considerada como grave, porque produce una elevada mortalidad, especialmente en aquellos niños que presentan sintomatología al nacer (8, 28, 30).

6.3 Enfermedad de Chagas Transfusional

La infección por *T. cruzi* a través de transfusión sanguínea puede producir un cuadro clínico de acuerdo con el estado inmunológico del receptor. En inmunocompetentes (pacientes previamente sanos o con hemorragias), la infección pasa habitualmente inadvertida y si aparece sintomatología (fiebre prolongada por meses, adenopatía, hepatomegalia, etc.), es tardía, raramente se le asocia con la transfusión, y la detección de *T. cruzi* es dificultosa. En cambio en el paciente inmunocomprometido el cuadro clínico generalmente es agudo y se manifiesta por fiebre alta y mantenida, con compromiso progresivo del estado general. En estos casos la detección de *T. cruzi* en la sangre es relativamente fácil (8, 28, 29, 31).

7. Inmunidad

El hombre presenta algunas variaciones individuales en lo que respecta a la resistencia natural a los tripanosomas. En el plasma se pueden encontrar anticuerpos protectores y fijadores del complemento específico a cada cepa, los que presumiblemente causan la desaparición de las formas sanguíneas (32 - 34).

La resistencia natural del humano al *T. cruzi* no ha sido bien demostrada. Algunos pacientes durante la fase aguda de la enfermedad experimentan algunos síntomas como la depresión de linfocitos T, que contrastan con los de otros pacientes también en fase aguda pero con síntomas más comunes, sin embargo se ha observado que en ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* existe un incremento en la actividad celular de células accinas (NK), este aumento sugiere una resistencia natural, aunque no se está bien seguro (35).

Los controles para la proliferación del *T. cruzi* tanto en la fase aguda como en la crónica no son conocidos, pero se sabe que son diferentes dependiendo del estado. Los anticuerpos específicos juegan un papel central muy importante en la fase crónica y esta razonablemente establecido, pero tal papel en la fase aguda no está bien definida. El mecanismo de defensa en la fase aguda se está investigando por medio de adaptaciones del *T. cruzi* en el laboratorio, produciendo intensa parasitemia en ratones, en la que se ha observado severa inmunosupresión de la actividad policlonal y alta mortalidad (35).

8. Diagnóstico Serológico

Las pruebas serológicas están basadas en la reacción antígeno - anticuerpo, y son las más utilizadas para el diagnóstico, entre estas están: Fijación del Complemento (prueba de Machado), ELISA, látex, inmunohemaaglutinación e inmunofluorescencia indirecta, esta última proporciona un apoyo confirmatorio en la infección por *T. cruzi*. Pruebas de ELISA, con el uso de antígenos recombinantes desarrolladas recientemente, proporcionan ahora un instrumento serodiagnóstico muy específico y sensible para la detección de *T. cruzi*. Estas pruebas son útiles sobre todo para estudios de detección en bancos de sangre. La aglutinación directa en una prueba de tarjeta es valiosa para usar en el campo o instalaciones médicas rurales, usando antígeno tripanosómico liofilizado (32, 36 - 37).

La prueba de inmunodifusión doble no se recomienda para ser utilizada como prueba de tamizaje ya que su sensibilidad para detectar pacientes en fase aguda es baja y con respecto a especificidad, existen reacciones cruzadas con sueros positivos para

Leishmania. Esta prueba tiene como ventajas que es simple y práctica de realizar, de bajo costo y no necesita de equipo sofisticado. Este método es útil para el serodiagnóstico de los pacientes en fase indeterminada de la enfermedad, siempre y cuando se utilice como antígeno el estadio de tripomastigote del parásito (38 - 41).

9. Diagnóstico Parasitológico

Para la demostración del parásito se utiliza sangre, de preferencia tomada durante el ascenso de la temperatura. También pueden obtenerse muestras de líquido cefalorraquídeo, aspirados de ganglios linfáticos o de la lesión primaria, o muestras obtenidas por punción de la cresta iliaca, médula ósea esternal o bazo (36).

9.1 Examen Microscópico

La sangre fresca o los tejidos extraídos en solución salina se deben conservar calientes y examinarlos inmediatamente para observar a los tripanosomas moviéndose activamente. Las películas gruesas se pueden tefir con el colorante de Giemsa. Sin embargo, para confirmación se requieren películas delgadas. A veces es necesario centrifugar. Deben tefirse los frotis de tejidos para identificar las formas pretripanosómicas. El centrifugado de líquido cefalorraquídeo se debe examinar de la misma manera, pero rara vez hay más de un tripanosoma por mililitro (32, 36 - 37).

El método de concentración por capilar para el diagnóstico parasitológico es efectivo sólo cuando la parasitemia es alta, es decir, la densidad de parásitos en sangre del paciente es mayor a cuatro células/ul de sangre. En esta técnica el EDTA no debe ser utilizado como preservante de la muestra sanguínea ya que el mismo podría inhibir la movilidad del parásito (42 - 44).

9.2 Cultivo

Todas las muestras pueden ser sembradas en medios de cultivo, entre ellos Tobie, el

semisólido de Wenyon, el NNN, LIT, u otros medios de cultivo para *T. cruzi* o *T. rangeli*. Los microorganismos crecen a temperaturas de 22 a 24°C y se hacen resiembras cada 1 a 2 semanas. El material centrifugado se examina microscópicamente para obtener tripanosomas. El medio de cultivo para las formas africanas no es satisfactorio (32, 36 - 37).

9.3 Inoculación en Animales

T. cruzi y *T. rangeli* se pueden demostrar por inoculación intraperitoneal de la sangre a cierto número de ratones (cuando se pueden conseguir perros o gatos estos son los animales de elección). Los tripanosomas aparecen en la sangre pocos días después de una inoculación satisfactoria (32, 36 - 37).

9.4 Xenodiagnóstico

Es el método de elección cuando se sospecha que existe enfermedad de Chagas y las otras pruebas fueron negativas, especialmente durante la fase temprana de la enfermedad. Como la infección de laboratorio producida por *T. cruzi* es un peligro definido, sólo personas capacitadas en el procedimiento deben efectuar la prueba. Alrededor de seis triatomas sanas, criadas en laboratorio, son alimentadas en el paciente y sus excreciones se estudian de siete a diez días después para buscar las formas de desarrollo. La defecación ocurre inmediatamente después de la alimentación reciente, o se le puede forzar sondeando suavemente al ano del insecto y presionando su abdomen (32, 36 - 37).

9.5 Diagnóstico Diferencial

La diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* es muy importante. Se ha descrito un procedimiento, que permite distinguir las dos especies basado en la electroforesis del ADN total de los parásitos en geles de agarosa los cuales son teñidos con bromuro de etidio (36).

10. Reacción en cadena de la polimerasa

Recientemente se ha diseñado y perfeccionado una metodología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación *in vitro* de una región selectiva de ADN al imitar el fenómeno de replicación de ADN *in vivo*. Esta técnica es sumamente específica en la detección y relativamente rápida (45).

La técnica puede resumirse en tres importantes pasos: desnaturalización de la doble hélice de ADN a 95-96°C, hibridización de los cebadores a un sitio complementario del templado a 45-72°C y extensión del cebador en la terminal 3'OH por adición sucesiva de dNTPs. La desnaturalización consiste en la separación de las cadenas de ADN, para formar cadenas sencillas, por medio de altas temperaturas. La hibridización es la restauración de la condición de doble cadena por reducción de temperatura, en presencia de un par de oligonucleótidos sintéticos que tienen afinidad específica por la región del ADN en cuestión, siendo uno de ellos complementario al extremo 5' del gen o fragmento del ADN que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta. La extensión es lograda por la polimerización del ADN llevada a cabo por una enzima termoestable a partir de los oligonucleótidos apareados en el paso anterior. Este ciclo se repite de 30 a 50 veces, lográndose multiplicar la secuencia original en una progresión geométrica, de tal forma que al final del proceso, la cantidad del ADN amplificado es de 10^6 a 10^7 veces la cantidad original (46).

El esquema de desnaturalización, hibridización y extensión con cada paso definido por un periodo fijo de tiempo es llamado ciclo. La repetición de tal ciclo lleva a la amplificación del ADN (47).

Los componentes que se requieren para la reacción son:

- ADN templado de hebra única o plantilla de ADN
- Cebadores (secuencias de oligonucleótidos complementarias a las terminales de una secuencia definida de ADN templado)
- Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)

- Enzima ADN polimerasa termoestable

Una nueva hebra de ADN complementaria puede obtenerse por síntesis enzimática bajo condiciones apropiadas. La plantilla de ADN de hebra única es fácilmente generada por desnaturalización caliente de ADN de hebra doble. Los cebadores pueden ser sintetizados en el laboratorio o comprados comercialmente. Los buffers utilizados comúnmente en la reacción de PCR contienen Mg^{+2} , cationes monovalentes y cosolventes, los cuales ayudan a estabilizar la enzima e influyen en el proceso enzimático de desnaturalización de ADN. La introducción de ADN polimerasa estable al calor brinda un gran significado en el mejoramiento del PCR y la automatización, además de ayudar a futuros métodos de PCR (45).

En principio cada componente físico y químico de un ensayo de PCR puede ser considerado como un factor variable. Como se demostrará, estos factores no son independientes uno de otro y únicamente por razones didácticas, serán descritos en secciones separadas. Estos factores incluyen:

- Temperatura y tiempo del ciclo térmico
- Desnaturalización inicial
- Extensión del cebador
- Desnaturalización
- Número de ciclos
- Extensión final
- ADN polimerasa
- Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)
- Cebadores
- Concentración de cebadores
- Adición de aceite y volumen de la reacción
- Muestras de ADN
- Utilización de PCR para el diagnóstico

10.1 Temperatura y Tiempo del Ciclo Térmico

Los siguientes parámetros son útiles para termocicladores con bloque metálico (DNA Thermal Cycler, DNA Thermal Cycler 480, Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus Instruments, USA; Polychain I, Polychain II, Poligen, FRG) o con circulación de agua (Thermocycler 60/1, Thermocycler 60/2, Biomed, FRG) utilizando tubos de reacción de 500 ul (Eppendorf Safelock, Perkin-Elmer Gene Amp) y un volumen de reacción final de 25-100ul. (47).

9.1.1 Desnaturalización Inicial

Antes de iniciar la PCR se pueden remover impurezas de las muestras de ADN tales como proteasas o cloroformo calentando a 95°C por 10 min. Durante la realización del PCR la mezcla de reacción puede ser desnaturalizada completamente con un ciclo inicial de calentamiento a 95°C durante 3-5 minutos para que los cebadores puedan hibridarse después del enfriamiento. El ADN genómico no podrá renaturalizarse completamente bajo las condiciones utilizadas en los ciclos subsiguientes (48).

10.1.2 Hibridización de Cebadores

Durante la PCR, el paso de hibridación del cebador es la fase con temperatura más baja. Probablemente el componente más crítico para la optimización de la especificidad del ensayo de PCR es la elección de la temperatura de hibridación (47).

Durante los primeros ciclos de una PCR analítica utilizando una plantilla de ADN genómico, los cebadores deben realizar un tamizaje genómico hasta encontrar los sitios complementarios de hibridación. La probabilidad y especificidad de la hibridación de los cebadores depende de la temperatura, tiempo y de la concentración de los productos utilizados como blanco (plantilla de hebra única) y del cebador mismo. Bajo las condiciones adecuadas, en los primeros ciclos la concentración del blanco se duplica con cada ciclo y la disminución relativa de los cebadores es intangible. La probabilidad de una

hibridización exitosa durante los primeros ciclos está determinada principalmente por el número de copias del blanco y de que se cuente con suficiente tiempo para el tamizaje genómico que le permita a los cebadores encontrar el blanco lo cual depende exclusivamente de la temperatura de hibridización. Si la temperatura es muy alta no ocurre la hibridización pero si la temperatura es muy baja se incrementa dramáticamente la hibridización inespecífica (47,49).

10.1.3. Extensión del Cebador

La elongación a 72°C por 20 segundos para fragmentos menores de 500pares de bases y de 40 segundos para fragmentos mayores de 1.2 kilobases siempre da resultados satisfactorios. Si se sospecha que están presentes estructuras secundarias de los productos de amplificación debe tratarse con tiempos más largos (47).

10.1.4 Desnaturalización

La desnaturalización a 95°C por 20 a 30 segundos es usualmente suficiente, pero es esencial que se adapte el tiempo de desnaturalización, a los tubos y máquinas de PCR que se están utilizando. En los últimos ciclos, las temperaturas de desnaturalización bajas son mejores para conservar la actividad enzimática. Fragmentos relativamente cortos son más fácilmente separados que el ADN compuesto. Si la temperatura de desnaturalización es muy baja, el ADN incompletamente separado se vuelve a unir inmediatamente durante el enfriamiento, y esto no da acceso al cebador (47).

10.1.5 Número de ciclos

En una PCR analítica, el número de ciclos no debe exceder de 40ciclos. Aunque se han establecido amplificaciones producidas originalmente de menos de 10 moléculas en una reacción óptima que puede generalmente detectarse en un gel de agarosa bromuro de etidio con menos de 40 ciclos. El número de ciclos más apropiado va de 25 a 35. Muchas veces, al incrementar el número de ciclos se producen amplificaciones no deseadas y productos no

deseados. Una molécula de polimerasa bacteriana no cataliza la extensión de más de un cebador por ciclo (47).

10.2 Extensión Final

Generalmente después del último ciclo, se realiza un tiempo de espera de 5-15 minutos a 72° para promover la total extensión de los productos parcialmente extendidos y completar la hibridización de productos complementarios en una hebra. Después de completar la PCR los tubos pueden ser almacenados a -20° hasta que sean necesarios para analizar los productos (48).

10.3 ADN polimerasa

La cantidad de polimerasa es uno de los factores más importantes a ser optimizados para una prueba en particular. Para la mayoría de pruebas, la cantidad óptima de enzima será entre 0.5 y 2.5 U en un volumen de reacción de 50µl. Concentraciones altas de enzima algunas veces llevan a disminuir la especificidad, pero es esencial para pruebas diagnósticas de muestras de diferentes pacientes utilizar cierto exceso de polimerasa debido a la potencial actividad inhibitoria de las muestras (50 - 52).

10.4 Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)

Generalmente, una solución stock 10mM con cantidades equimolares de las cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) es apropiado para ensayos con tubos múltiples. Para experimentos menores deben prepararse soluciones stock 1-2 mM y almacenarse a -20°. Mezclas no equimolares de dNTP reducen la fidelidad de la polimerasa. Se ha observado una disminución significativa de la intensidad de la señal cuando se utilizan soluciones almacenadas por más de 2 meses. Las concentraciones óptimas de dNTP dependen de:

- Longitud de los productos de amplificación
- Concentraciones de MgCl₂
- Concentración del cebador

- Astringencia de la reacción

En otras ocasiones el dNTP reduce la concentración de Mg^{2+} libre, interfiriendo con la actividad de la polimerasa y disminuyendo el anillamiento del cebador. La ADN polimerasa cataliza la polimerización de dNTP con alta fidelidad en bajas concentraciones de dNTP (menor de 10 μ M) las cuales son utilizadas correctamente para obtener una óptima sensibilidad de una PCR analítica de 100 a 200 μ M. Pero en una preparación de PCR, en la que los productos son reamplificados en las hebras únicas o dobles para secuenciar o sintetizar pruebas, podría ser esencial la disminución de la concentración de dNTP a 20-40 μ M (47).

10.5 Cebadores

En la mayoría de aplicaciones, es la secuencia y la combinación de los cebadores lo que determina el éxito de los ensayos. Los tamaños útiles de cebadores son de 14 a 40 bases de longitud con el 40 y 75 por ciento de uniones G-C (Guanidina-Citocina). Existe una fórmula que permite calcular el contenido de uniones G-C en los oligonucleótidos de los cebadores. La utilización del cebador depende del propósito del experimento. Las reglas generales para el diseño de cebadores fueron enumeradas por Rappolee 1990 (47).

10.5.1 Concentración de cebadores

Deben prepararse, soluciones stock acuosas de los cebadores. No son necesarias cantidades equimolares si se va a realizar amplificación de ADN de hebra sencilla. La concentración de los cebadores debe calcularse y ajustarse para reflejar un número real de moléculas, preferiblemente nanogramos/ml o alguna otra forma de expresar concentración (47).

10.6 Adición de Aceite y Volumen de Reacción

La mayoría de termocicladores no calientan las tapaderas de los tubos de reacción,

por lo que es necesario aplicar una capa de aceite mineral sobre la mezcla de reacción para prevenir la evaporación y la contaminación a lo largo del ensayo. La evaporación eleva la concentración de los reactivos y disminuye la temperatura. Sin embargo altas concentraciones de aceite disminuyen el entorno térmico, por lo que es necesaria la estandarización de la cantidad de aceite a agregar para minimizar estos factores. En la mayoría de reacciones se agregan 70ul de aceite por 100ul de reactivo, 40ul de aceite por 50ul de reactivo y 30ul de aceite por 25ul de reactivo que es probablemente suficiente. Si es necesario el aceite puede ser removido con cloroformo pero es mejor evitarlo cuando se hace electroforesis (53, 54).

10.7 Muestras de ADN

Una muestra para PCR puede estar contaminada, inhibida por la reacción o no contener ADN. Esto es crucial para el ensayo diagnóstico y se necesita incluir controles que verifiquen todas estas posibilidades (47).

Además del ADN, pueden haber otras sustancias en las muestras que interfieran con el proceso de PCR. Algunas veces es la pureza de la muestra la que limita la sensibilidad del ensayo. En algunos casos la congelación de las muestras puede afectar la reproducibilidad (47).

Para muestras clínicas, es importante que se esté consciente del potencial de inhibición por parte de compuestos como EDTA, heparina y compuestos relacionados con H_2PO_4 etc. El EDTA presente en las muestras de sangre como anticoagulante, puede ser removido de la sangre simultáneamente con la hemoglobina de eritrocitos hemolizados antes de la lisis de los leucocitos lavados (47).

10.8 Utilización de PCR para el Diagnóstico

Se han realizado muchos estudios acerca de la utilidad de la reacción de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en los que se han obtenido resultados

satisfactorios.

La mayor aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa es el diagnóstico de la infección de *T. cruzi* y simultáneamente la identificación directa de los diferentes clones naturales circulantes en vectores y sangre de mamíferos. La PCR amplifica la región variable del minicirculo del kinetoplasto de *T. cruzi* directamente de muestras biológicas (heces de conejo infectado con triatomas, muestras de sangre de ratones infectados experimentalmente y muestra de sangre humana infectada artificialmente). Aunque la utilidad de esta técnica para estudios epidemiológicos es todavía discutida (55).

En 1992, Russomando y colaboradores obtuvieron ADN de pacientes chagásicos, el cual fue amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores y oligonucleótidos con hibridación específica para una secuencia altamente repetitiva de ADN nuclear de *T. cruzi*. Muestras de pacientes infectados en fase aguda y crónica dieron resultados positivos en este método y no se observó diferencias significativas cuando se utilizaron muestras de sangre completa o suero (56).

Avila y colaboradores evaluaron un panel de 114 muestras de sangre de pacientes chagásicos en fase crónica y pacientes no chagásicos, los que fueron evaluados para *T. cruzi* por el método de xenodiagnóstico, serología y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras de sangre fueron preservadas en buffer de guanidina-EDTA, el ADN total de sangre fue aislado con el ion cobre 1,10-phenanthrolina y se utilizó una plantilla para amplificación por PCR de las regiones variable y conservada de las moléculas del minicirculo de *T. cruzi*. Los productos de PCR fueron tamizados por hibridación con Southern blot con una sonda de oligonucleótido marcado con digoxigenina específica para la región conservada del minicirculo. El método mostró una sensibilidad de 100 por ciento comparada con la serología. Todas las muestras positivas para serología y negativas por xenodiagnóstico fueron positivas en PCR. Esto demuestra que la amplificación por PCR de ADN de minicirculo del kinetoplasto de *T. cruzi* reemplaza al xenodiagnóstico en evaluación de parasitemia en pacientes chagásicos en fase crónica y sirve como complemento de la serología, y en tamizaje de donadores en bancos

de sangre (57).

Una solución de guanidina 6M HCl/ EDTA 0.2M fue utilizada para lisis y almacenamiento de especímenes de sangre. El ADN almacenado en sangre lisada con guanidina-EDTA (GEB) estableció que no se degradaba después de un mes de incubación a 37°. Sugiriendo que este reactivo es apropiado para el transporte de muestras de sangre del campo hacia el laboratorio para su análisis. El ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en GEB puede ser extraído con nucleasas químicas, ion cobre 1,10 phenanthrolina. Este procedimiento libera moléculas del minicírculo linearizadas por catenación y permite que una pequeña alicuota del lisado original sea utilizado para el análisis por amplificación con PCR. Esto incrementa la sensibilidad del método dramáticamente por la detección de un pequeño número de parásitos en un volumen grande de sangre. Se realizó aislamiento de ADN de alicuotas de GEB positivas para *T. cruzi* por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con 3 sets de cebadores del minicírculo de kADN específicos para *T. cruzi* produciendo bandas de 83 pares de bases y 122 pares de bases de fragmentos de la región conservada y de 330 pares de bases de la región variable. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel y 7^o hibridización. Los resultados indican que una célula de *T. cruzi* en 20 ml de sangre puede ser detectada por este método. Muestras de sangre de pacientes chagásicos en fase crónica fueron utilizadas y amplificaciones de secuencias del minicírculo del ADNk de *T. cruzi* fueron detectadas en todos los casos aunque los resultados del xenodiagnóstico hayan sido negativos. El método de PCR muestra que puede ser utilizado para reemplazar o complementar al xenodiagnóstico o serología en estudios clínicos o epidemiológicos de la enfermedad de Chagas durante la fase crónica (58).

La detección del ADN del kinetoplasto del *T. cruzi* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas. En Bolivia se ha aplicado esta técnica en 45 niños de primaria con exámenes serológicos sugestivos de presencia de la enfermedad. 26 de las 28 serologías positivas resultaron positivas por PCR. Adicionado a esto, 2 niños serológicamente negativos tuvieron un resultado positivo por PCR. Este resultado sugiere que la detección

de ADN de *T. cruzi* en sangre por PCR puede ser un útil complemento de la serología en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Bolivia (59).

11. Tratamiento

No hay tratamiento eficaz para la tripanosomiasis americana en la fase crónica, ya que las drogas utilizadas eliminan únicamente los parásitos extra celulares. El tratamiento es eficaz únicamente en la fase aguda, sin embargo el Nifurtimox (Bayer 2502) más interferón gamma pueden acortar la fase aguda y pueden aliviar por una temporada a algunos pacientes con tripomastigotes aún presentes en la sangre. El Benzonidazol (Rochagan) y el Nifurtimox son las drogas de elección y requieren un tratamiento largo de aproximadamente 60 días o más, por lo que muchos pacientes requieren hospitalización debido a los efectos adversos frecuentemente asociados. No se han desarrollado vacunas debido a una posible asociación de estas con enfermedades autoinmunes; el único control efectivo es a través de fumigación de las áreas afectadas por el vector (32, 60-61).

Las drogas utilizadas en las últimas tres décadas, Nitrofurán (Nifurtimox) y Nitroimidazole (Benzonidazol) para el tratamiento en pacientes chagásicos, son potencialmente tóxicas por sus compuestos heterocíclicos, los cuales deben ser administrados en bajas cantidades, aunque producen un alto rango de cura en la fase aguda y un pequeño porcentaje en la fase crónica. Debido a esto se quiere introducir nuevos compuestos farmacéuticos con estrategias alternativas (62).

Brener y colaboradores, realizaron estudios con el ketoconazol, que es una droga antifúngica, de la que demostraron la actividad en infecciones experimentales de *T. cruzi* y confirmaron el efecto de la droga y el rango de actividad con diferentes cepas de *T. cruzi* resistentes o susceptibles a ambas drogas Nifurtimox y Benzonidazol. El resultado obtenido fue que la administración de ketoconazol en pacientes chagásicos en fase crónica en dosis utilizadas en el tratamiento de micosis profundas induce la cura demostrada por exámenes serológicos y parasitológicos (62).

12. Pronóstico

En la fase aguda, sólo el 10 por ciento de los pacientes mueren por miocarditis o meningoencefalitis (niños menores de 1 año). La fase indeterminada puede durar toda la vida. La cardiomiopatía comienza entre los 20 y 50 años de edad y la insuficiencia cardíaca en estas edades produce la muerte de uno a cinco años después de su aparición inicial (10).

Múltiples pruebas indican que si se trata a los pacientes con enfermedad de Chagas con Nifurtimox o Benznidazol, disminuye la posibilidad de una futura afección crónica. Aunque no hay acuerdo general en cuanto a la posibilidad de que el tratamiento farmacológico de casos indeterminados, es decir, pacientes asintomáticos con serología positiva, evitara el desarrollo de la afección crónica posteriormente. Muchos que se tratan en la fase aguda nunca desarrollan anticuerpos a *T. cruzi* o solo de manera pasajera. Debido a esto, se supone que es posible eliminar los microorganismos y curar al paciente si se trata en la fase aguda. Sin embargo, no siempre se obtienen estos resultados con nifurtimox y al parecer las cepas del parásito de ciertas áreas geográficas (Brasil) responden menos al tratamiento que las de otros países (Argentina y Chile).

Los marcapasos cardíacos pueden prolongar la supervivencia en casos de bloqueo cardíaco completo. La insuficiencia congestiva de la cardiomiopatía chagásica es desalentadoramente resistente a los medicamentos cardiotrópicos usuales.

Existen varias opciones para la atención y tratamiento de la afección mega. En las etapas iniciales del megaesófago, quizá es más eficaz la dilatación neumática del esfínter que el uso de bujías. En casos más avanzados se requiere diversos procedimientos quirúrgicos como miotomía o resección parcial del esfínter. Las etapas iniciales de megacolon se tratan con dietas y laxantes y en ocasiones enemas. A veces en los casos más graves puede researse una sección aperistáltica del colon (63).

IV. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase aguda es difícil debido a los bajos niveles de parasitemia. Igualmente, la detección del parásito en la fase crónica requiere la utilización de métodos biológicos, como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, debido a que los niveles de parasitemia son mucho más bajos que en la fase aguda.

Debido a esto, se ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas más sensibles que permitan realizar un mejor diagnóstico. Entre estas técnicas se encuentra la búsqueda de antígenos, fracciones antigénicas o del ADN del parásito en fluidos corporales, como la demostración del ADN de *T. cruzi* en sangre completa y suero, a través de la técnica de PCR la que ofrece varias ventajas como alta sensibilidad y especificidad de resultados.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores S35 - S36 lo que permitió la demostración de pequeñas cantidades de ADN del parásito en sangre completa y realizar más oportunamente el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes tanto en fase crónica como aguda. De esta manera, en un futuro se podrá dar una mayor información al médico, para que la administración del tratamiento específico sea antes de que la enfermedad progrese y el daño sea mayor.

Al estandarizar la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Citohistología, se puede disponer de una nueva metodología confirmatoria para el servicio de diagnóstico de la enfermedad de Chagas que ofrece el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR) y el departamento de Citohistología.

V. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como un método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en el departamento de Citohistología.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en sangre de pacientes chagásicos, por medio de los cebadores S35 y S36.
- Comparar los resultados obtenidos con la técnica de PCR con los obtenidos por métodos serológicos.
- Establecer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una metodología confirmatoria, y un servicio de referencia que para el diagnóstico de Chagas brinda el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR).

VI. Materiales y Métodos

5.1. Universo de Trabajo

Diferentes metodologías para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

5.1.1. Muestra

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serología (aglutinación con partículas de latex, aglutinación con partículas de gelatina GPAT e inmunodifusión directa IDD).

5.2. Recursos

5.2.1. Recursos Humanos:

Investigadora: Julia Elisa Antonieta Machuca Hernández

Asesoras: Licda. María Eugenia Paredes Sánchez y

Licda. Vivian L. Matta de García

Colaboradores: Dr. Julio Cesar Argueta (M.S.P.A.S.)

Dr. Carlos Mendoza (Universidad del Valle de Guatemala)

Dra. Claude Pirmes (FIOCRUZ, Brasil)

5.2.2. Institucionales

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Departamento de Citohistología

Asociación Internacional de Energía Atómica

5.2.3. Materiales

5.2.3.1 Equipo:

Estufa

Baño de María

Termociclador PTC-100™ Peltier-Effect Cyclin MJ Reserch Reserch
INC. Programmable Thermal Controller

Equipo horizontal para electroforesis

Accesorios para electroforesis

- Placas de vidrio

- Peines

- Micropipetas graduadas

- Tips de punta larga

Fuente de poder

Fuente de luz ultravioleta

Cámara fotográfica

Centrífuga para eppendorf Biofuge Heraeus Step Sept Tech

Centrífuga refrigerada para eppendorf

Baño de agua con agitación

Bloque térmico a temperatura baja

Bloque térmico a temperatura alta

Campana para PCR MJ Reserch INC.

Refrigeradora a 4°C

Refrigeradora a -70°C

Refrigeradora a -20°C

5.2.3.2 Reactivos

Solución de Guanidina-HCl 6M, 200 mM EDTA

Fenol-cloroformo

Cloroformo

Agua desionizada

Taq polimerasa (Sigma, Perkin Elmer, del Kit de FIOCRUZ, una producida en la Universidad de Loyola y una producida por la Dra. Dorn de la Universidad de Loyola en el Depto. de Biología de la Facultad de CCQQ y Farmacia.).

MgCl₂ 25 mM

Cebadores S35 y S36

dNTP's

BSA

Buffer para PCR

Buffer TBE 1X

Bromuro de etidio

Acetato de sodio 3M

Etanol al 80%

Agarosa

Escalera de peso molecular de ADN

5.2.3.3 Cristalería

Tubos vacutainer con EDTA

Probetas de 100ml, 500ml y 1000ml

Erlenmeyers de 500ml y 1000ml

Beakers de 25ml, 100ml, 500ml y 1000ml

Pipetas de 5ml y 10ml

Pipetas pasteur

5.2.4. Procedimiento de la Estandarización

Para la estandarización del método se prepararon muestras de sangre con diferentes concentraciones de parásitos de la cepa H17 (Tabla No.1), a manera de curva de calibración para garantizar que cada uno de los pasos del procedimiento estuviera funcionando bien.

Tabla No. 1

Concentración de parásitos en diferentes diluciones de la curva de calibración.

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN (parásitos / ml)
1:10	1.15×10^8
1:100	1.15×10^7
1:1000	1.15×10^6
$1:10^3$	1.15×10^5
$1:10^4$	1.15×10^4
$1:10^5$	1.15×10^3
$1:10^6$	115
$1:10^7$	11.5
$1:10^8$	0.115

5.2.4.1. Extracción del ADN

- Se colectaron 5 ml de sangre por punción venosa y se transfirieron a un tubo de polipropileno, conteniendo igual volumen de solución de guanidina HCl/EDTA. Se agitaron los tubos, se sumergieron parcialmente en agua y se hirvieron durante 15 minutos.
- A 100µl de sangre se agregó igual volumen de fenol-cloroformo, se mezcló y centrifugó por 3 minutos a 12 gravedades.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo rotulado.
- Se agregaron 150ul de agua tridestilada estéril al tubo que contenía el precipitado, se mezcló, centrifugó y transfirió el sobrenadante al mismo tubo rotulado.
- Al tubo conteniendo el sobrenadante acuoso, se le agregó un volumen de 150µl de cloroformo, se mezcló, centrifugó y pasó el sobrenadante a otro tubo.
- Se midió cuidadosamente el total de sobrenadante y se agregó acetato de sodio 3M formando una dilución 1:10 y posteriormente se agregó el doble del volúmenes de etanol, para precipitar el ADN.
- Para la precipitación se probaron dos métodos, durante 15 minutos a -20°C y

- también durante toda la noche a -20°C , posteriormente se centrifugó 15 minutos a 1200rpm en frío o 60 minutos a temperatura ambiente.
- h. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1ml de etanol 70°GL, se centrifugó por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el botón en un bloque caliente a 70°C por 5 minutos.
 - i. Se resuspendió el ADN en 50ul de agua desionizada y se almacenó a -20°C

5.2.4.2 Extracción Comercial con el Kit de Wako:

- a. Se agregó 0.5ml de sangre con EDTA- Na_2 (anticoagulante), dentro de un tubo eppendorf de 1.5ml y se mantuvo en hielo.
- b. Se agregó 0.5ml de solución de lisis, se invirtió el tubo varias veces para mezclar la solución.
- c. Se centrifugó a 10,000 gravedades, 20 segundos a 4°C , cuidadosamente se removió el sobrenadante, manteniendo intacto el precipitado rojo oscuro.
- d. Se agregó 1ml de solución de lisis al tubo y mezcló 30 segundos a una velocidad moderada.
- e. Se centrifugó a 10,000g por 20 seg. a 4°C y posteriormente se removió el sobrenadante del tubo.
- f. Se repitió la operación "d" y "e"
- g. Se suspendió el precipitado en 200ul de solución de reacción enzimática. Se agregó 10ul de solución de proteasa y mezcló por inversión.
- h. Se incubó a 37°C por 1 hora. (durante la incubación, se mezcló la solución varias veces por inversión).
- i. Se agregó 0.3ml de solución de NaI y mezcló bien por inversión.
- j. Se agregó 0.5 ml de alcohol isopropílico hasta que apareció un material blancuzco (DNA).
- k. Se centrifugó a 10,000g por 10 minutos a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y colocó el tubo boca abajo para remover el sobrenadante que había quedado.
- l. Se lavó el precipitado en el tubo con 1ml de solución de lavado(A), se centrifugó a

- 10,000g por 5 minutos, luego se mezcló el tubo hasta que el precipitado se desprendió de la pared del tubo.
- m. Se repitió la operación del inciso "l" utilizando solución de lavado (B) en lugar de la solución de lavado (A).
- n. El precipitado se secó al vacío por 3 minutos (el ADN no debe secarse completamente debido a que es difícil disolverlo).

5.2.4.3 Amplificación del ADN Extraído:

A. Condiciones del Termociclador

Se ensayaron diferentes temperaturas y ciclos, tomando como base un esquema utilizado en la mayoría de artículos consultados, el cual se fue cambiando conforme se fue estandarizando el método, por otros programas utilizados en diferentes laboratorios.

Programa inicial, el cual es utilizado en la mayoría de laboratorios en los que se realiza PCR para la enfermedad de Chagas.

1.	1 ciclo	94°C	1 minuto
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		55°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa utilizado en el instituto FIOCRUZ (Brasil).

1.	2 ciclos	98°C	1 minuto
		64°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		64°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa recomendado en los insertos de la casa comercial Sigma, el cual difiere del programa inicial en que en el paso de desnaturalización, lleva el doble del tiempo.

1.	1 ciclo	94°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		55°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa utilizado por la Universidad de Loyola

1.	1 ciclo	94°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		60°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

B. Reactivos

Se iniciaron los experimentos con un volumen de 50ul, debido a que la máquina que se utilizó tiene capacidad para tubos de 60ul, pero durante la estandarización se determinó que funciona bien un volumen menor, por lo que se disminuyó el volumen de todos los reactivos a la mitad es decir que el volumen total de reacción fue de 25ul, lo que permitió economizar reactivos. Se agregaron las muestras en tubos adecuados conteniendo los siguientes reactivos que forman la mezcla maestra para PCR: Buffer 10X, dNTPs, cebadores (S35 y S36), Taq polimerasa, Agua.

El buffer de la enzima normalmente contiene cierta cantidad de magnesio estandarizada para cada lote de enzima; si el buffer no indica que contiene magnesio (como en el caso de la de la casa comercial Perkin Elmer) se debe estandarizar la cantidad a agregar.

B1. Cebadores

- a. Para mejorar el rendimiento de los reactivos se experimentó la actividad de los cebadores en volúmenes de 0.5 y 1 μ l.
- b. Se adicionó al método de PCR la técnica de "Hot Start", para la cual se formaron perlas de parafina en la campana de flujo laminar del Departamento de Citohistología, las cuales además fueron autoclaveadas para poderlas utilizar en el mezcla maestra. Se dividió la mezcla maestra en dos partes (Tabla No.2), se agregó la bolita de parafina en el eppendorf, encima de la mezcla maestra 1 (MM1) y se calentó a 80°C por 5 minutos en el termociclador para que la parafina se fundiera, luego se enfrió a 4°C por 5 minutos para que se formara una tapa, posteriormente se sacó del termociclador se agregó la mezcla maestra 2 (MM2) y se pusieron los eppendorfs de nuevo en el termociclador para que la tapa de parafina se derritiera y se mezclara el master mix 1 con el 2 y la hibridización se diera a la temperatura optima y no antes. A los tubos con "hot start" se les agregó solo una gota de aceite, para que la parafina no quede muy suave a diferencia de los que no tienen hot start, a los que se les adiciona dos gotas de aceite mineral para evitar evaporación de reactivos debido a las altas temperaturas.

Tabla No. 2

Mezcla maestra para PCR utilizando "Hot Start" en el que se utilizan mezcla maestra 1 (MM1) y mezcla maestra 2 (MM2).

REACTIVOS	MM1 X 1 tubo	MM2 X 1 tubo
Buffer	2.5	2.5
25mM MgCl ₂	9	0
2mM dNTPs	5	0
S35	1	0
S36	1	0
Taq	0	0.5
Agua	4.5	19

Se realizaron ensayos con reactivos de distintas casas comerciales, para evaluar especificidad y sensibilidad de éstos y así obtener mejores resultados.

B2. Taq Polimerasa

Para estandarizar la concentración de Taq que debía agregarse por volumen de reacción se realizaron varios experimentos como la comparación de 5 tipos de Taq (Sigma, Perkin Elmer, una donada por el Departamento de Biología la cual fue preparada en el Instituto Loyola, una preparada por la Dra. Patricia Dorn del Instituto Loyola en el Departamento de Biología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y una del Kit de FIOCRUZ), de las cuales se probaron lotes diferentes.

Además se experimentó con diferentes concentraciones de estas desde 1 Unidad hasta 5 Unidades. Se corrió PCR con reactivos de diferentes casas comerciales (Sigma, Perkin Elmer y el Kit de FIOCRUZ) para definir cuales daban mejores resultados, además de probar diferentes concentraciones de cada uno.

Para descartar la posibilidad de que los cebadores de *T. cruzi* interfirieran con el buen funcionamiento de la Taq polimerasa y que debido a esto no obtuviéramos bandas, se realizaron experimentos en los que se probó con ADN extraído de sangre infectada con *Leishmania mexicana* en diluciones de 1:10 y 1:100 con cebadores específicos para *Leishmania* (HM1, HM2, HM3), y así observar si con éstos teníamos el mismo problema.

Una de las Taq fue donada por el Departamento de Biología, pero debido a que se desconocía la concentración, se evaluaron diferentes volúmenes (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0ul), además de ser evaluada también para *Leishmania* y de realizar la extracción de ADN por dos métodos, un Kit comercial y el método convencional de guanidina.

La Taq polimerasa preparada en el departamento de Biología con la metodología de la Dra. Dorn, fue evaluada para determinar su actividad en diferentes volúmenes (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0ul), y debido a que no había un buffer específico para ésta Taq se probó con el buffer de Brasil, buffer de Sigma y buffer ajustado a la concentración que poseía el de

Brasil (3.5uM MgCl₂), para ver con cual se obtenia mejores resultados. Las cinco Taq fueron probadas también, con y sin "Hot Start".

B3. MgCl₂

Para cada lote de Taq se utilizaron buffers con diferentes concentraciones de MgCl₂ que variaron de 1.5mM hasta 4.5mM de MgCl₂.

B4. dNTPs

Se realizaron varios experimentos en los que se evaluaron dNTPs Perkin Elmer en unión con los reactivos de Sigma y el Kit de FIOCRUZ; los dNTPs debían poseer un pH de 7.

C. Curva

Posteriormente se realizó la curva de parásitos con la Taq producida en el departamento de Biología, ya que ésta fue una de las que mejores resultados proporcionó, y la concentración de la polimerasa fue de 1ul de reactivo / 25ul de reacción.

D. Procesamiento de las Muestras

Con la técnica de PCR ya estandarizada se comenzó a evaluar las muestras positivas de pacientes provenientes de área endémica (Zacapa y Santa María Ixhuatán), y las muestras negativas de pacientes provenientes de área no endémica (Sololá). Estas se relacionaron con la serología, pero debido a contaminación se suspendió esto hasta encontrar la fuente de la misma.

Se esterilizó todo el equipo con cloro y luz Ultra Violeta, desde los tips, pipetas, etc. hasta el termociclador; además toda el área del laboratorio fue lavada con cloro. Se extrajo nuevo ADN de las muestras y se le realizó también el procedimiento de extracción de ADN a la Guanidina, debido a que se pensó que la guanidina era la que podía haber estado contaminada, y se realizó PCR para cerciorarnos. Además se extrajo ADN de las muestras con un nuevo acetato de sodio. Y se comenzó a realizar PCR solo con controles, cambiando reactivo por reactivo, hasta que se encontró la causa de la contaminación.

Luego de eliminar la contaminación y las bandas inespecíficas, para determinar si había algún problema en la extracción de ADN se probó extraerlo por medio del Kit de Wako y simultáneamente por el método experimental de Guanidina. Se trabajó con una muestra conocida de sangre infectada con 500ul de epimastigotes de *T. cruzi* lavados y suspendidos en PBS. Luego se realizó PCR de los ADN extraídos para observar cual daba mejores resultados.

5.2.4.4 Electroforesis:

- a. Se preparó un gel de agarosa de 1.5 por ciento (electroforesis horizontal) con el número de pozos (9 ó 17 pozos) de acuerdo al número de muestras que se utilizaron, para una gel pequeña se agregó al molde 18 ml de agarosa y para una gel grande 30 ml para que el mismo no fuera muy grueso y las bandas corrieran más rápido y se observaran mejor. Se utilizó un marcador (escalera de peso molecular de ADN de 100 pb) y de este se agregó 1ul con 1ul de buffer de carga y 9ul de agua.
- b. Se mezclaron las muestras con una solución (buffer de carga) compuesta por 30 por ciento de glicerol, 0.25 por ciento de azul de bromofenol y 0.25 por ciento de xilencianol en una proporción de 1ul para cada 10ul de muestra. Se probó también en proporciones de 0.5ul de buffer de carga por 5ul de muestra y 1.5ul de buffer de carga por 15ul de muestra para observar con que volumen nos da un mejor resultado.
- c. Se corrieron las muestras por aproximadamente 2 horas a 50V o 35 minutos a 100V.

5.2.4.5 Revelado:

- a. Se colocó el gel en una solución conteniendo 5ug/ul de bromuro de etidio diluido en buffer TBE, durante 15 minutos y luego se decoloró por 15 minutos más en agua destilada.
- b. Se observó por transiluminación UV y se fotografió (8 minutos y 4.5 de amplitud).

5.2.4.6 Interpretación:

La observación de una banda de 330pb de longitud, indicó la presencia de kADN de *T. cruzi*, y consecuentemente resultado positivo para el PCR.

5.2.4.7 Aglutinación con partículas de látex

El método es una técnica basada en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia con antígenos de *T. cruzi*. Se mezclaron 3ul de reactivo con 3ul de plasma en una placa, se colocaron en un rotor y se leyó el resultado a los 5 minutos. Si se observó aglutinación el resultado fue positivo, de no observarse la misma, el resultado se consideró negativo.

5.2.4.8 Aglutinación con Partículas de Gelatina (GPAT), Fujirebio

El método es una técnica comercial basada en la aglutinación de partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos de *T. cruzi*.

Se efectuó en placas en forma de U llevando a cabo primero un tamizaje, y si la muestra presentó un tamizaje positivo se tituló. Para el tamizaje en el pozo número uno de la placa se colocaron 175ul de diluyente de muestra, 25ul de suero o plasma para obtener una dilución 1:8. Previamente las partículas sensibilizadas se reconstituyeron con la solución diluyente y se dejaron reposar al menos 30 minutos. Luego se mezclaron las partículas sensibilizadas, se agregaron a cada pozo 25ul de partículas de gelatina, se mezcló, se tapó con papel adhesivo para placas y se dejó reposar a temperatura ambiente por dos horas. Se tomaron positivas las muestras que presentaron aglutinación en un título igual o mayor a 1:32, si no se observó aglutinación el resultado se consideró negativo.

5.2.4.9 Inmuno difusión directa (IDD)

Se prepararon las láminas de agar con azida de sodio y PBS dispensando en cada una de ellas aproximadamente 5ml de la mezcla. Se perforaron los agujeros utilizando como guía una hoja de papel milimetrado preparada para el efecto. Se centrifugó a 3000rpm por 5min el antígeno de *T. cruzi* y cada uno de los sueros evaluados. Se colocaron cuidadosamente 10ul del antígeno en el pozo central y 10ul de cada suero en los pozos externos teniendo cuidado de no estropear el agar y no rebasar los pozos. Incubar en cámara húmeda de 48 a 72 horas a temperatura ambiente.

Se colocó cada una de las láminas en un recipiente que contenía NaCl al 0.85% para desproteinizarlas (remover cualquier proteína sérica que no sea complejo antígeno anticuerpo) durante 24 horas con agitación constante, se colocó un pedazo de papel filtro humedecido con la solución anterior sobre cada una de las láminas y se secaron con aire caliente completamente.

Se separó el papel de la lámina con cuidado de no romper el agar, se coloreó por una o dos horas con azul de Coomasie y se destiñó con cuidado de no perder las bandas de precipitación teñidas, se secaron al aire y se montaron de nuevo en la lámina. Las muestras que presentan bandas de precipitación se consideraron positivas.

5.3. Análisis de Investigación

5.3.1. Diseño Estadístico

Se empleó un nivel de investigación de tipo descriptivo usando una escala binomial de medida.

5.3.4. Análisis de Datos

- a. Los resultados se obtuvieron como respuesta binomial y de estos se analizó la concordancia PCR – serología por medio del índice de Kappa.

VII. RESULTADOS

Para la estandarización de la técnica se realizó una serie de experimentos hasta obtener los mejores resultados positivos.

La extracción de ADN se realizó por dos diferentes métodos, uno en el que se dejó precipitar el ADN toda la noche y luego se centrifugó en frío y el otro donde se dejó precipitar 30 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente. Se observó que precipitando durante toda la noche se obtienen mejores resultados.

Para que el precipitado de ADN se seque más rápido y sin el peligro de que se dañe debido a periodos muy largos a alta temperatura, se le agregó 1ml de etanol a 70° GL se centrifugó durante 3 minutos, luego se decantó el etanol y se colocó en el bloque caliente a 70°C por aproximadamente 3 a 5 minutos.

Se extrajo el ADN por dos métodos diferentes, el método convencional de guanidina y el del kit comercial de Wako, y al comparar por PCR se observó que las bandas que se obtuvieron fueron de la misma intensidad y peso molecular.

En la estandarización de la amplificación del ADN, se utilizaron cuatro métodos: el programa inicial, el utilizado en FIOCRUZ (Brasil), el de la casa comercial SIGMA y el utilizado por la Dra. Patricia Dorn de la Universidad de Loyola, USA. Se encontró que el programa del termociclador que mejor funcionó fue el recomendado por la Dra. Patricia Dorn (Tabla No. 3), y que con la Taq polimerasa producida por la misma Universidad también se obtuvo un buen resultado.

Tabla No.3
Programa para termociclador utilizado por la Dra. Dorn de la Universidad de
Loyola, USA

CICLOS	TEMPERATURAS °C	TIEMPO (min.)
1	94	2
33	94	1
	60	1
	72	1
1	72	10

Se determinó que el volumen de cebadores que debía utilizarse era de 0.5ul de cada uno, por 25ul de volumen total de reacción, ya que con un volumen menor no se detectaban bandas cuando la concentración de ADN era baja (Tabla No.4).

Tabla No. 4
Comparación entre la intensidad de las bandas al utilizar dos diferentes volúmenes de cebadores con dos diferentes concentraciones de ADN en controles positivos.

Controles Positivos	Volúmenes de Cebadores (ul)	
	0.5	0.25
Control positivo 1:1	+++	+
Control positivo 1:6	++	-

Al comparar la eficiencia de diferentes Taq polimerasa se obtuvieron resultados positivos con una de las Taq polimerasa comerciales (Sigma) con concentración de 1 Unidad y un volumen de 0.25ul por volumen total de reacción de 25ul, además de una

concentración de 4.5mM de $MgCl_2$. Otra Taq polimerasa con la que se obtuvieron buenos resultados fue la producida por la Dra. Patricia Dorn en el Departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, la cual dió resultados positivos al utilizarse 1.5ul de ésta por 25ul de volumen total de reacción, en unión con un buffer elaborado en FIOCRUZ (Brasil), que posee una concentración de 3.5uM de $MgCl_2$. Para esta Taq polimerasa se experimentó con volúmenes de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 pero las bandas no fueron claras en estas concentraciones.

Con la Taq polimerasa de Perkin Elmer no se pudo obtener resultados positivos, aun aumentando o disminuyendo la concentración de $MgCl_2$. Se realizaron experimentos para probar la actividad de dNTPs, de la misma casa comercial obteniendo buenos resultados tanto con los reactivos del kit de FIOCRUZ (Brasil) como con el de Sigma.

Para descartar la posibilidad de que los cebadores de *T. cruzi* interfirieran con el buen funcionamiento de la Taq polimerasa y que debido a esto no se obtuvieran bandas se realizó un ensayo en el que se probó la Taq polimerasa con ADN extraído de sangre infectada con *Leishmania mexicana* en diluciones de 1:10 y 1:100 y cebadores específicos para *Leishmania* (HM1, HM2, HM3), pero con estos tampoco se obtuvieron bandas.

Posteriormente se realizó un experimento para probar la Taq polimerasa que fue donada por el departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, y como no se conocía la concentración ni la actividad que ésta poseía, se utilizaron diferentes volúmenes de ésta (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0ul) pero no se obtuvieron bandas. Esta misma Taq polimerasa se utilizó con muestras de *Leishmania* y muestras de ADN extraído de pacientes por medio del Kit comercial y con Guanidina, pero no se obtuvieron resultados positivos con ninguno de los cambios que se realizaron.

Las cinco Taq polimerasa fueron probadas también utilizando "Hot Start", método que se ha reportado produce bandas más claras y específicas (64), pero las únicas que dieron buenos resultados fueron las de Sigma y la de la Universidad de Loyola, ya que con las otras Taq polimerasa no se obtuvo bandas.

La curva de parásitos realizada con la cepa H17 determinó el número mínimo de parásitos que el PCR puede detectar, esta curva se realizó con y sin "Hot Start", encontrándose que el mínimo detectado es de 0.115 parásitos en una muestra de 5ml de sangre completa. Utilizando "Hot Start" en la elaboración de esta curva las bandas fueron más claras y sin tantas bandas inespecíficas (Tabla No. 5).

Tabla No. 5

Resultados obtenidos en la curva de calibración con y sin "Hot Start".

Dilución de parásitos	# de Parásitos	Con Hot Start	Sin Hot Start
1:10	1.15×10^8	++	-
1:100	1.15×10^7	++	-
1:1000	1.15×10^6	+++	+++
$1:10^3$	1.15×10^5	+++	+++
$1:10^4$	1.15×10^4	+++	+++
$1:10^5$	1.15×10^3	++	+++
$1:10^6$	115	++	+++
$1:10^7$	11.5	+	+++
$1:10^8$	0.115	+	++

En base a los resultados obtenidos se determinó que el protocolo a seguir fue el siguiente (Tabla No. 6)

Tabla No. 6

Mezcla maestra de PCR estandarizada a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia.

Reactivos	Concentraciones (ul)
Buffer 10X	2.5
dNTP's	4.0
S35	0.5
S36	0.5
Taq polimerasa	1.5
Agua	13.5

Teniendo la técnica estandarizada (Tabla No.3 y 6) se procesaron las muestras del área endémica (Zacapa), y de área no endémica (Sololá). Se obtuvo buenos resultados, ya que las muestras con serología positiva presentaron resultados positivos en PCR, bandas claras y de peso molecular esperado y las muestras con serología negativa fueron también negativas en PCR. Esto se tuvo que suspender debido a presencia de contaminación.

Eliminada la contaminación se inició nuevamente el proceso de las muestras de pacientes. La población evaluada para el estudio comprendió 40 muestras de sangre completa de personas distribuidas de la siguiente forma: 15 muestras de personas procedentes de área endémica (Zacapa), 15 muestras de personas procedentes de área no endémica (Sololá), y 10 muestras de personas procedentes de área endémica (Santa María Ixhuitán). Las muestras se sometieron a exámenes serológicos tanto como a PCR (Tabla No. 7, 8); para lo cual se extrajo 5ml de sangre heparinizada a cada persona, se tomó 1ml de plasma para la serología y el resto de la sangre completa se utilizó para extracción de ADN al que posteriormente se le realizó el PCR.

Las pruebas serológicas realizadas a los sueros fueron: aglutinación con partículas de gelatina, aglutinación con partículas de látex e inmunodifusión directa, las cuales fueron comparadas con PCR. Con los datos obtenidos se compararon ambas técnicas utilizando el

estadístico Kappa. Debido a que tanto la serología como el PCR de las muestras de Sololá fueron negativos no se incluye tabla de resultados.

Tabla No. 7

Resultados de PCR y serología de 15 muestras de pacientes de área endémica (Zacapa)

Muestra	PCR S35 y S36	PCR 121 y 122	Latex	IDD	GPAT
1	+	+	+	+	+ ≥1:256
2	+	+	+	+	+ ≥1:256
3	+	+	+	+	+ ≥1:256
4	+	+	+	+	+ ≥1:256
5	+	+	+	+	+ ≥1:256
6	+	+	+	+	+ ≥1:256
7	+	+	+	+	+ ≥1:256
8	+	+	+	+	+ ≥1:256
9	+	+	+	+	+ ≥1:256
10	+	+	+	+	+ ≥1:256
11	+	+	+	+	+ ≥1:256
12	+	+	+	+	+ ≥1:256
13	+	+	+	+	+ ≥1:256
14	+	+	+	+	+ ≥1:256
15	+	+	+	+	+ ≥1:256

IDD: Inmuno difusión directa. GPAT: Aglutinación con partículas de gelatina

Tabla No. 8

Resultados de PCR y serología de 10 muestras de pacientes de área endémica (Santa María Ixhuatan)

Muestra	PCR S35 y S36	PCR 121 y 122	Latex	IDD	GPAT
1	+	+	+	+	+ 1:128
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

IDD: Inmuno difusión directa. GPAT: Aglutinación con partículas de gelatina

Con los resultados obtenidos del área endémica de Zacapa el 100% de las muestras serológicamente positivas, fueron PCR positivo, con lo que se obtuvo un resultado de Kappa = 1. (Tabla No.9)

En el gel se pudo observar perfectamente las bandas de 330 pares de bases en los pozos del 6 al 13 y los controles positivo y negativo que se ponían en cada gel, además pueden observarse unas bandas adicionales de 100 y 700 pb las cuales son inespecíficas (Anexo No.1)

Puede observarse perfectamente que cuando hay contaminación los controles negativos también presentan banda. (Anexo No. 2) mientras que en uno donde no hay contaminación los controles se diferencian claramente (Anexo No. 3)

Tabla No. 9

Comparación de resultados de muestras de área endémica (Zacapa) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	15	0
	-	0	0

Con las muestras del área no endémica se observó una relación entre serología y PCR de 100%, ya que todas las muestras serológicamente negativas fueron negativas también para PCR, obteniendo como resultado un Kappa = 1. (Tabla No. 10)

Tabla No. 10

Comparación de resultados de muestras de área no endémica (Sololá) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	0	0
	-	0	15

Con las muestras de Santa María Ixhuatán se observó que una de las muestras serológicamente positivas presentó PCR positivo, 6 de las muestras con serología negativa

presentan también PCR negativo, pero 3 de las muestras con serología negativa presentaron resultados positivos para PCR, con estos resultados se obtuvo un Kappa = 0.286

(Tabla No. 11)

Tabla No. 11

Comparación de resultados de muestras de área endémica (Santa María Ixhuatán) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	1	3
	-	0	6

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a que en Guatemala no se había utilizado previamente la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas, este trabajo consistió en estandarizar el método, para así lograr la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre completa de pacientes chagásicos, el cual se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología.

En la estandarización de la extracción de ADN se hicieron muy pocos cambios ya que el método convencional de Guanidina (2,59) utilizado en la mayoría de laboratorios que trabajan con PCR demostró ser bueno y acoplarse muy bien a las condiciones del laboratorio donde se trabajó, debe tenerse mucho cuidado que el fenol-cloroformo tenga un pH de 8 ya que si es más ácido se extrae ARN y no ADN que es el necesario para PCR. Además debe dejarse precipitar el ADN el tiempo necesario (toda la noche) a -20°C y centrifugarse al otro día en frío para que el botón obtenido sea mejor.

Se observó que para secar el precipitado conteniendo el ADN en menor tiempo era necesario decantar el sobrenadante donde se dejó precipitar, agregar en el tubo 1 ml de etanol 70° , centrifugarlo por 3 minutos, posteriormente decantar el etanol y secar en el bloque caliente a 70°C por aproximadamente 3 a 5 minutos. Al principio se omitía el paso del etanol 70° por lo que el secado en el bloque caliente tardaba demasiado y la dilución del ADN en el agua era difícil.

Se utilizaron varios programas en el termociclador de los cuales, uno se descartó por ser para tipificación de especies y se eligió para trabajar el utilizado por la Dra. Patricia Dorn de la Universidad de Loyola, el cual dió muy buenos resultados en unión con la Taq polimerasa producida con el método de la misma Universidad, los cuales se acoplaron muy bien a las condiciones que se tenían en el laboratorio.

En la estandarización de la amplificación del ADN se observó que la Taq polimerasa comercial (Taq Perkin Elmer), no dió resultados positivos al aumentarse ni disminuirse la

concentración de $MgCl_2$, además no funcionó en unión de ningún otro reactivo tales como Sigma ni los del Kit de FIOCRUZ (Brasil). Se probó además con "Hot Start" y no se obtuvieron bandas, por lo que se descartó de los reactivos utilizados en este trabajo.

Se observó que en el transporte de la enzima (Taq polimerasa) debe conservarse la cadena de frío, ya que una de las principales causas de los problemas encontrados se debió a que varias de las enzimas recibidas habían perdido su actividad.

El "Hot Start" es una técnica utilizada para obtener bandas más claras y sin presencia de bandas inespecíficas (64). Lo anterior pudo ser comprobado en la práctica pero se tuvo el inconveniente de que al momento de realizar la electroforesis los tips se taparon y el volumen que median las pipetas no fue siempre el mismo, por lo que se optó por no utilizarlo, ya que los resultados no fueron reproducibles.

Las muestras tanto del área de Zacapa como las de Sololá se comenzaron a procesar por PCR, obteniéndose buenos resultados reproducibles con la serología, pero esto se tuvo que suspender debido a presencia de contaminación. Las técnicas utilizadas para eliminar la contaminación (esterilización de todo el equipo con cloro y luz ultra violeta y probar reactivo por reactivo únicamente con controles) dieron buen resultado, ya que aunque no fue posible determinar el motivo exacto de la contaminación, ésta si fue eliminada.

Se corrieron las muestras de la población muestreada (40 muestras) tanto de las áreas endémicas (Zacapa y Santa María Ixhuatan), como del área no endémica (Sololá). Para considerarse como positivas serológicamente, las muestras debían ser positivas en dos de las tres pruebas que se utilizaron, las pruebas utilizadas fueron: aglutinación con partículas de látex, aglutinación con partículas de gelatina e inmunodifusión directa. De las 15 muestras de Zacapa, 15 (100 por ciento) fueron positivas para las pruebas serológicas, estas muestras también fueron corridas en PCR dando una correlación del 100 por ciento y un Kappa = 1 que es un resultado excelente.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las muestras del área no endémica de Sololá el 100 por ciento de las muestras serológicamente negativas, fueron también negativos para PCR, por lo que se obtuvo un resultado de Kappa = 1 que es un resultado excelente ya que la correlación entre las dos técnicas es del 100 por ciento.

Con los resultados del área endémica de Santa María Ixhuatán, los resultados fueron distintos ya que no se obtuvo ninguna muestra con serología positiva y PCR negativo y solo una de las muestras serológicamente positiva fue PCR positivo, 6 de las muestras con serología negativa fueron PCR negativo y 3 de las muestras con serología negativa presentaron resultados positivos para PCR. Con estos resultados se obtuvo un Kappa = 0.286

Con respecto a los tres casos de pacientes con serología negativa pero con PCR positivo, posiblemente hayan dado una reacción cruzada con alguna otra enfermedad parasitaria, además según la bibliografía, hay dos teorías que pueden explicar esto, la primera es que puede ser por una contaminación de ADN, la segunda es que estas personas viven en un área que es considerada como un área de transmisión activa para la enfermedad de Chagas, por lo que si la infección se adquirió recientemente, el tiempo necesario para montar una respuesta humoral detectable es de varios meses y durante este tiempo la serología siempre va a ser negativa (59).

IX. CONCLUSIONES

- La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue estandarizada en el departamento de Citohistología para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- En este estudio y en las condiciones estandarizadas la sensibilidad obtenida es de 0.115 parásitos en 5ml de sangre completa.
- El estudio demostró una sensibilidad en PCR mayor que la de serología.
- Una infección recientemente adquirida podrá ser demostrada más fácilmente por PCR ya que la respuesta humoral toma un tiempo para ser detectada por técnicas serológicas.
- Para establecer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una metodología confirmatoria, deben realizarse más estudios utilizando un área endémica de otras enfermedades parasitarias, en la que se estudien los falsos positivos con éstas.

X. RECOMENDACIONES

- Precipitar el ADN durante la noche y centrifugar en frío para obtener un mayor y mejor botón de ADN.
- Para secar el botón en menor tiempo, debe incluirse antes del secado un paso de precipitación con etanol 70°GL.
- Tratar en la medida de lo posible de producir en el laboratorio la Taq polimerasa para evitar su deterioro durante el transporte y reducir los gastos.
- Realizar más ensayos con la técnica de PCR, en una población mayor que permita detectar los falsos positivos con otras enfermedades parasitarias, antes de utilizar este método como referencia para confirmar el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.
- Estandarizar el uso de "Hot Start" para lograr mejores resultados.
- Incluir entre el certificado de salud de niños en edad escolar el examen serológico de Chagas, para poder diagnosticar la enfermedad en la fase aguda y así dar tratamiento oportuno, ya que en fase crónica la enfermedad no tiene cura.

GLOSARIO

- Amplificación: En PCR, es la replicación exponencial de un fragmento específico de ADN por ADN polimerasa, para producir múltiples copias.
- Buffer: Solución química que mantiene el pH de una solución. Un buffer de PCR es una formulación específica recomendada para una polimerasa particular para estabilizar el pH de la reacción durante la amplificación del ADN.
- Cebadores: Una pieza corta de ADN en forma de un oligonucleotido sintético que se hibridiza a la secuencia complementaria de ADN y es extendida por una polimerasa.
- Control: Una muestra conocida incluida en todas las amplificaciones, para verificar las condiciones de reacción.
- Ciclo: Durante la amplificación del PCR, cada ciclo consiste de una serie de tres diferentes temperaturas, en los cuales los ingredientes de la reacción sufren distintos procesos físicos y bioquímicos (desnaturalización, anillamiento y extensión), resultando en la replicación exponencial de una tarjeta molecular.
- ADN: Acido desoxirribonucleico. Formado por dos fragmentos complementarios de ADN que forman la doble hélice.
- dNTP(s): Desoxinucleotido trifosfato(s). Es el segmento de unión del ADN replicado durante el PCR.
- Electroforesis: La migración de partículas cargadas sobre una matriz con campo eléctrico. Este método es utilizado para separar fragmentos cargados negativamente de ADN de acuerdo a su tamaño. Los fragmentos más pequeños migran más rápidamente hacia el polo positivo que los fragmentos largos.
- Especificidad: La capacidad de identificar algo o los caracteres y particularidades peculiares del objeto de interés.
- Extracción: Tratamiento de una muestra con un solvente orgánico, para obtener ácido nucleico de variada purificación, dependiendo del método utilizado.
- Genoma: La base de información genética, guardada en el cromosoma de un organismo.
- Hot start: Es un método comúnmente utilizado para obtener especificidad en la reacción de PCR, en la que todos los reactivos interaccionen productivamente hasta después del primer paso de desnaturalización a aproximadamente 94°C.

- Hybridización: El segundo paso en el ciclo de amplificación, en el cual, a una temperatura particular, dos hebras simples de ADN complementario, se hibridizan para formar una doble hélice.
- Oligonucleotido: Una corta pieza sintética de ADN.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Un procedimiento patentado de amplificación exponencial de una pieza de ADN de un tamaño y secuencia específico.
- Plasma: Un fluido límpido obtenido por centrifugación de sangre no coagulada.
- Suero: Un fluido límpido obtenido por centrifugación de sangre coagulada.
- Sensibilidad: Capacidad de un examen diagnóstico de identificar como positivo aquello que posea la enfermedad de interés.
- Taq polimerasa: Enzima termoestable, originalmente aislada de una bacteria *Thermus aquaticus*, que es utilizada en la replicación de ADN en el PCR.
- Termociclador: Aparato programable para amplificación facilitada, con ciclos de temperatura automática.
- Transiluminación UV: Detección de ácido nucleico marcado, con un compuesto como el bromuro de etidio, que fluoresce bajo radiación ultravioleta.

Referencias

1. Marsden ER, *et al.* The transmission of *Trypanosoma cruzi*. Infection to man and its control. Doc. Tec. pp : 1-50
2. Avila H, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31: 2421-2426.
3. Segura EL. Xenodiagnosis; Chagas' disease vector. USA: CRC Press, Inc., Vol. 2, 1991. 99p. (p. 41-45).
4. Manson-Bahr P, Bell DR. Manson's tropical diseases. London: Bailliere Tindal, 1987. 120p. (p.74-86).
5. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. Transfusion. Journal of Medicine. 1991;31:547-557.
6. Aguilar FJ. Parasitología Médica. 2 ed. Guatemala: Litografía Delgado S.A., 1991. 363p. (p. 250-261).
7. Macedo V. Cecil Textbook of Medicine; Chagas' disease "American Trypanosomiasis". Philadelphia: WB Saunders, 1982. 2000p. (p. 1728-1731).
8. Atias A, Meghme E. Parasitología Clínica. 3 ed. Santiago, Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., 1991. 618p.
9. Rowen A, *et al.* Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Boletín Organización Mundial de la Salud, 1974;50:459-492.
10. Morales RE. Estudio Clínico-Serológico de la Enfermedad de Chagas en Donadores de Banco de Sangre del Hospital Nacional de Chiquimula. Guatemala: USAC, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1992. 49p.
11. Zeledón R, Rabinoch JE. Chagas' Disease; An Ecological Appraisal with Special Emphasis on Insects Vectors. An Rev Entomol 1989;26:101-337.
12. Minter DM. Effects on Transmission to man of the Presence of Domestic Animal in Infected Households. USA: PAHO Sci. Public., 1989. 318p.
13. Zeledón R. Los vectores de la Enfermedad de Chagas. Simposio Internacional sobre

- Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Parasitología, 1972. 400p. (p. 327-345).
14. Lent H, Wygodzinky L. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' Disease. Bull Am Mus Nat Hist 1989;163:125-520.
 15. Aguilera X, *et al.* Epidemiology of Chagas disease in northern Chile. Isoenzyme profile of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvan transmission cycle and their association with cardiopan J Trop Med Hyg 1990;37:302-307.
 16. Aguilar FJ. Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala 1932-1990. Ogata K. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 93: Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe anual # 2. Guatemala: Misión Japonesa. Doc. Tec. 1993. VIII+150p.
 17. Matta VL. Enfermedad de Chagas en Guatemala: Prevalencia y Transmisión. Rev Cientif 1993;9.1:2-6
 18. Peñalver LM. Estado Actual de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev. Col. Med. Guatemala 1953;4:294-308
 19. Matta VL, *et al.* Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. San José: VII Congreso Centroamericano y II Nacional de Microbiología. Memorias. 1985. 203p.
 20. Matta VL. La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Guatemala: III Congreso Nacional de Microbiología. Memorias. 1986. 127-132p.
 21. Matta VL, *et al.* Transmisión Congénita y Evolución Fisiopatológica de la Enfermedad de Chagas. Chiquimula, Guatemala: DIGI. 1991. 54p.
 22. Matta VL, *et al.* Avances en el Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Tabaru Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 94: Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe Anual # 3. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1994. VIII+207p.
 23. Paz M, *et al.* Valor Predictivo de las Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabaru Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 94: Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe anual # 3. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1994. VIII+207p.

24. Matta VL, *et al.* La Enfermedad de Chagas: Un Enfoque Integral. Guatemala: DIGI. 1995. 115p.
25. Loarca M, *et al.* Infección por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre en doce hospitales de Chile. Bol of Sanit Panam 1989;95:321-326.
26. Arribada A, Aguilera X, Sandoval J. Chagas cardiopathy and *Trypanosoma cruzi* zimodemes in Chile. Bull Pan Am Health Organ. 1988;21:358-368.
27. Arribada A, Apt W. Cardiopatías parasitarias. Santiago, Chile: Ediciones de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina Sur 1990. 250p.
28. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Clinical Parasitology. 9 ed. England: Lea & Febiger, 1986. 798p.
29. Goldsmisth RS, Heyneman D, eds. Tropical Medicine and Parasitology. England: Appleton & Lange, 1995. 420p.
30. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7 ed. USA: Sauders, 1992. 850p.
31. Tanowitz HB, *et al.* Chagas' disease. Clin Microbiol Rev 1992;5:400
32. Broks GF, Butel JS, Ornston LN. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15 ed. México: Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V., 1996. X+807p.
33. Reyes MB, *et al.* Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc Nalt Acad Sci USA 1990;87:2846-2850.
34. McKerrow J, Heyneman D. Parasitic Disease. In: Basic & Clinical Immunology. 8 ed. England: Stites Dt, Terr AL, Parslow TG. Eds., Appleton & Lange, 1994. 300p.
35. Brener Z, Krettli A. Immunology of Chagas' Disease. USA: Sauders, 1987. 360p.
36. Garcia LS, Buckner DA. Diagnosis Medical Parasitology. 2 ed. USA: American Society for Microbiology, 1993. 890p.
37. Gutierrez Y, Little MD, eds. Diagnosis of Important Parasitic Disease. Clin Lab Med 1991;11:811
38. Juárez S, *et al.* Método de Inmunodifusión Doble en el Serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabura Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 95': Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe Anual # 4. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1995. IV+215p.
39. Packchanian A. Agglutination and Precipitation test for diagnosis of *Trypanosoma*

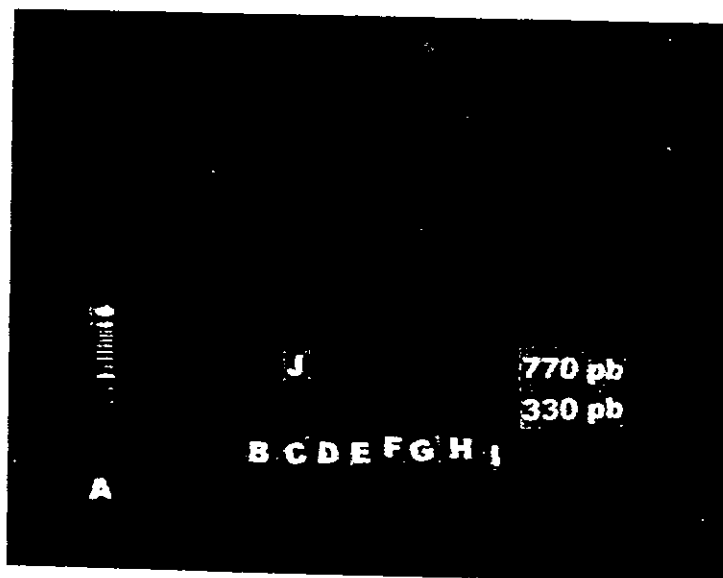
- cruzi* infection (Chagas Disease). J Immunol 1935;29:84-85.
40. Requejo H, *et al.* Diffusion in gel enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for Chagas' disease serodiagnosis. Brazilian J Med Biol Res 1991;24:471-483.
 41. Nilsson LA, Voller A. A Comparison of thin layer immunoassay (TLA) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *T. cruzi*. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene. 1982;76:95-97
 42. De León MP, *et al.* La Eficiencia del Método de Concentración de Capilar en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabara Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 95': Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe Anual # 4. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1995. IV+215p.
 43. Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. OMS, Trad. Ginebra: OMS, Doc Tec. No. 811, 1991. VI+102p.
 44. Chiari E, Parasitological diagnosis of Chagas' Disease. (p.153-64). [In Wendel S., *et al.* Chagas' Disease (American Tripanosomiasis); its impact of transfusion and Clinical Medicine. Brasil: International Society of Blood transfusion, 1992. X+270p.
 45. Saiki RK, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of ADN with a thermostable ADN polimerase. Science 1988;239:487-491
 46. Martinez SJP, *et al.* Detección de Abortos por *Brucella* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica Difusión Internacional. 1993;18:10-16
 47. Rolfs A, *et al.* PCR: Clinical Diagnostics and Resarch. Germany: Springer Laboratory. 1992. XIX+271 p.
 48. Gelfand DH, White TJ. Thermostable DNA polimerases. In PCR protocols A Guide to Methods and Applications; Germany: Eds. Innis MA, *et al.* Academic Press. 1990.
 49. Ruano G, Brash DE, Kidd KK. PCR: The first few cycles. Amplifications A forum for PCR Users 1991;7:1-4.
 50. Gelfand DH. Taq ADN polimerase. In PCR technology Principles and Applications for DNA Amplification. Germany: Ed Erlich HA, Stockton Press. 1989.
 51. Lawyer FC, *et al.* Isolation, characterization, and *Escherichia coli* of the ADN polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J Biol Chem 1989;264:6427-6437.
 52. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* ADN polymerase. Biochemistr 1988;27:6008-6013.

53. Mezei LM. Effect of oil overlay on PCR amplification. A forum for PCR Users 1990;4:11-13.
54. Holland PM, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7276-7280.
55. Breniere SF, *et al.* Direct Identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. Am. J. Trop. Hyg. 1992;91:335-341
56. Russomando G, *et al.* Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiol. 1992;30:2864-2868
57. Avila HA, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic Chagasic Patients by Polimerase Chain Reaction Amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 1993;31:2421-2427
58. Avila HA, *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle ADN isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chaga's disease. Molec. Biochem. Paras. 1991;48:211-220
59. Wincker P, *et al.* High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiol, Lett. 1994;124:419-422
60. Buckner D, *et al.* Drugs of Parasitic Infection. Med Lett GrugsTher 1993;35:111
61. Stercorian Trypanosomiasis [http://Martin Parasitology Mogill, CA./Jimspage/Biol/Tcruzi](http://Martin.Parasitology.Mogill,CA./Jimspage/Biol/Tcruzi).
62. Brener Z, *et al.* An Experimental and Clinical Assay with Ketoconazole in the Treatment of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de J. 1993;88:149
63. Wyngaarden J, Smith L, Bennett J. Tratado de medicina Interna de Cecil. 20 ed. México: Interamericana Mc. Graw Hill. 1997. 2878p.
64. Birch D, *et al.* Simplified Hot Satart PCR. Nature. 1996;381:445-446

ANEXOS

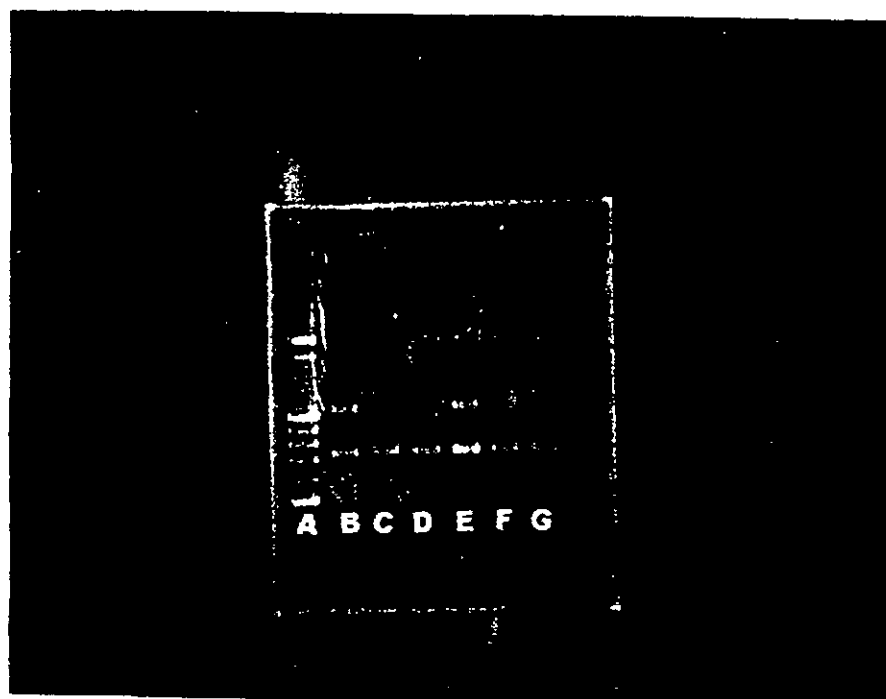
Anexo No. 1

Gel de agarosa de muestras positivas de área endémica.



- A - Se observa la escalera de 100 pb de tamaño
- B - 1 Muestras de pacientes
- J - Bandas inespecíficas.

Anexo No. 2
Gel de agarosa de muestras del estudio.

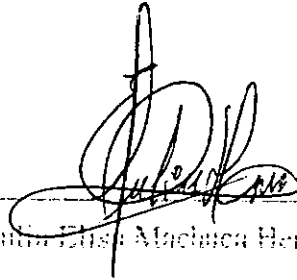


- A. Escalera de 100 pb de tamaño
- B. Control positivo
- C. Control negativo con presencia de banda
- D - G Muestras de pacientes

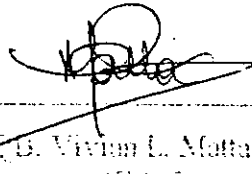
Figura No. 3
Gel de agarosa de las muestras en estado



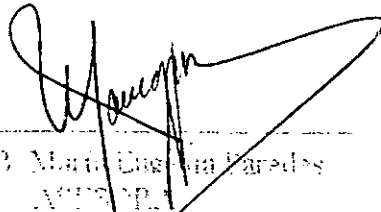
- A. Escalera de 100 pb de tamaño
- B. Control negativo
- C. Control positivo
- D. - 8 Muestras de pacientes



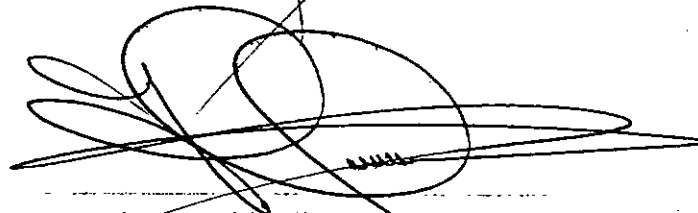
Juan Luis Machuca Hernandez



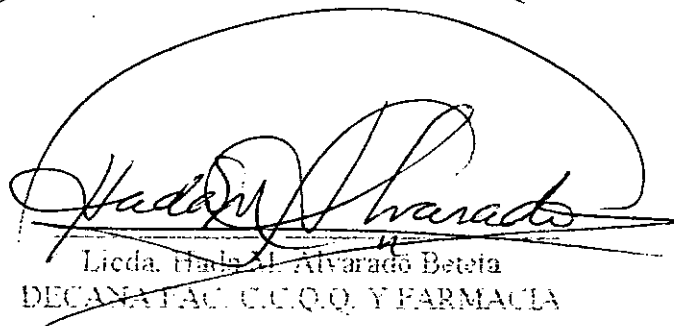
Licda. Q.B. Vivian L. Motta de Garcia
ASESORA



Licda. Q.B. Mari Eugenia Paredes
ASISTENTE



Licda. Heidi Elke Lourenson
DIRECTORA DE ESCUELA QUIMICA BIOLOGICA



Licda. Gladys M. Alvarado Beteta
DECANA FAC. C.C.Q.Q. Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de Sangre por medio de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como un Método Específico en el Diagnóstico Rápido de la Enfermedad de Chagas

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by various symbols including a cross, a book, and architectural elements. The text 'UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA' is inscribed around the perimeter of the seal.

INFORME DE TESIS

Presentado por

JULIA ELISA ANTONIETA MACHUCA HERNANDEZ

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, Agosto del 2000.

DL
06
T(2048)

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA:	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
SECRETARIO:	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I:	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
VOCAL II:	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
VOCAL III:	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV:	Br. César Alfredo Flores López
VOCAL V:	Br. Manuel Anibal Leal Gómez

DEDICATORIA

Dedico Esta Tesis a:

A Dios y a la Virgen Maria

Que me permitieron llegar hasta aqui

A mi patria Guatemala

A mis Padres

Lic. Leonel Machuca Quiroa
Olga Laura Hernández de Machuca
Gracias por su confianza y apoyo.

A mis Abuelos

Con mucho cariño

A mis Hermanos

Kilbert, Glenda, Brasil y Leonel
Que han sido mi ejemplo.

A mis Sobrinos

Con cariño

Al Dr. Julio Cesar Argueta

Por su colaboración incondicional

A mis Compañeras

Nancy Ayala Contreras
Ana Myriam Vargas Gudiel

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a todas las personas voluntarias que hicieron posible la realización de este trabajo.

Licda. María Eugenia Paredes Sánchez Por su asesoría en la investigación.
Licda. Vivian Matta

Lic. Gerardo Arroyo Por su apoyo y colaboración
Licda. María Paula De León
Lic. Rafael Pratdesabal
Dr. Carlos Mendoza

Sra. María Eugenia Garzaro Por su apoyo

Al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
	1. Agente etiológico	5
	2. Vector	6
	3. Epidemiología	8
	3.1 Prevalencia	8
	4. Transmisión	13
	5. Patología	14
	6. Sintomatología	16
	6.1 Enfermedad de Chagas adquirida	16
	a. Periodo agudo	16
	b. Período latente o indeterminado	17
	c. Periodo crónico	17
	6.2 Enfermedad de Chagas congénita	17
	6.3 Enfermedad de Chagas transfusional	18
	7. Inmunidad	18
	8. Diagnóstico Serológico	19
	9. Diagnóstico Parasitológico	20
	9.1 Examen microscópico	20
	9.2 Cultivo	20
	9.3 Inoculación en animales	21
	9.4 Xenodiagnóstico	21
	9.5 Diagnóstico diferencial	21
	10. Reacción en cadena de la polimerasa	22
	10.1 Temperatura y tiempo de ciclo térmico	24
	10.1.1 Desnaturalización inicial	24
	10.1.2 Hibridización de cebadores	24

10.1.3	Extensión del cebador	25
10.1.4	Desnaturalización	25
10.1.5	Número de ciclos	25
10.2	Extensión final	26
10.3	ADN polimerasa	26
10.4	Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)	26
10.5	Cebadores	27
10.5.1	Concentración de cebadores	27
10.6	Adición de aceite y volumen de reacción	27
10.7	Muestras de ADN	28
10.8	Utilización de PCR para Diagnóstico	28
11.	Tratamiento	31
12.	Pronóstico	32
IV.	Justificación	33
V.	Objetivos	34
VI.	Materiales y métodos	35
VII.	Resultados	48
VIII.	Discusión de Resultados	57
IX.	Conclusiones	60
X.	Recomendaciones	61
XI.	Glosario	62
XII.	Referencia	64

I. RESUMEN

Debido a que en Guatemala no se ha utilizado previamente la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas, este trabajo consistió en estandarizar este método en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología, para así lograr la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre completa de pacientes chagásicos.

Para ello se utilizaron los cebadores S35 y S36, los cuales permiten la amplificación de una región del minicirculo del kinetoplasto, la cual es altamente específica para cada especie y no presenta interferencia con el ADN humano. Como muestra se utilizó sangre completa heparinizada de 40 personas distribuidas en la siguiente forma: 15 muestras de personas que padecían la enfermedad y procedían de área endémica (Zacapa), 10 muestras de personas con o sin enfermedad de área endémica (Santa María Ixhuatán) y 15 muestras de personas de área no endémica (Sololá), a quienes se les realizó pruebas serológicas para la enfermedad.

En la estandarización se trabajó con diferentes programas en el termociclador, concentraciones de reactivos, así como reactivos de diferentes casas comerciales, volúmenes de reacción, etc. Los mejores resultados se obtuvieron con la Taq polimerasa de Sigma a una concentración de 1 Unidad que equivalía a 0.25ul para un volumen total de reacción de 25ul, además de una concentración de 4.5mM de MgCl₂. Otra Taq polimerasa que funcionó muy bien fue la preparada a partir de *E. coli* conteniendo el clon para Taq, en el Departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, con la técnica introducida por la Dra. Dorn de la Universidad de Loyola, la cual dió muy buenos resultados al utilizarse 1ul de ésta por volumen total de reacción de 25ul, en unión con un buffer elaborado en FIOCRUZ (Brasil), que posee una concentración de 3.5uM de MgCl₂.

Se evaluó también la técnica de "Hot Start" con la cual se observaron bandas mucho más claras y sin presencia de bandas inespecíficas, pero tuvo la desventaja de que la parafina que se utiliza en esta prueba puede constituirse en causa de error al colocar las

muestras para electroforesis, ya que requiere mucha destreza y mayor consumo de tiempo. Sin embargo constituye una buena alternativa para mejorar la especificidad.

A las muestras se les realizaron pruebas serológicas tales como: aglutinación con partículas de látex, aglutinación con partículas de gelatina e inmunodifusión directa, las cuales fueron comparadas con los resultados de PCR obteniéndose una correlación del 100 por ciento, tanto en las muestras del área endémica de Zacapa como en las del área no endémica de Sololá. Los resultados serológicos fueron comparados con PCR por medio de Kappa; en las muestras del área endémica de Zacapa y del área no endémica de Sololá se obtuvo un Kappa = 1 que demuestra una concordancia total y es un resultado excelente ya que se demostró que la técnica de PCR no detecta falsos positivos ni falsos negativos, mientras que en el área endémica de Santa María Ixhuatán el Kappa obtenido fue de 0.286, debido posiblemente a contaminación de las muestras.

Utilizando una curva de calibración realizada con la cepa H17, se determinó que el método es capaz de detectar hasta 0.115 parásitos (restos metabólicos) en una muestra de 5ml de sangre completa; y aunque se obtuvo una buena correlación entre la serología y el PCR, se recomienda realizar más ensayos con la técnica de PCR en una población mayor, en la que se estudien los falsos positivos con otras enfermedades parasitarias antes de utilizar este método como examen de rutina. En el futuro este método podrá ser utilizado como examen confirmatorio para todos aquellos casos con serología positiva, así como para monitorear a los pacientes bajo tratamiento ya que por estudios realizados en otros países se sabe que permite determinar la eficiencia del mismo.

II. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una de las causas de morbilidad y mortalidad en Latino América. El agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, que produce complicaciones clínicas que se desarrollan 10 a 20 años después de haber ocurrido el contacto, con el apareamiento progresivo de desórdenes cardíacos, digestivos y neurológicos (1). Es transmitido por un triatoma, por lo que está íntimamente relacionado con factores socioeconómicos, pues estos viven en grietas y agujeros de las paredes de adobe, bajareque, palo pique y otras estructuras de casas del área rural y urbana. Además el humano lo puede transmitir por otras rutas, como transfusiones de sangre o infección congénita. Durante la fase inicial, la detección directa del parásito en sangre es difícil debido a los bajos niveles de parasitemia. Igualmente, la detección del parásito en la fase crónica requiere la utilización de métodos biológicos como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, debido a que los niveles de parasitemia son mucho más bajos que en la fase aguda (2).

El xenodiagnóstico es uno de los ensayos más sensibles y específicos para la detección directa del *T. cruzi* en sangre de pacientes chagásicos en la fase crónica. Sin embargo diversos autores reportan positividad en el xenodiagnóstico en un rango desde 17 a 70 por ciento de pacientes serológicamente positivos (3). Los exámenes serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica poseen alta sensibilidad pero baja especificidad debido a reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania* sp. y *T. rangeli* (4,5). En ensayos serológicos, sólo se detectan anticuerpos contra el parásito y no la presencia del parásito en sí; por tanto es muy importante considerar el tipo de examen a utilizar en el seguimiento de pacientes bajo tratamiento de esta enfermedad (2).

Debido a lo anterior, se ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas más sensibles que permitan realizar un mejor diagnóstico. Entre estas técnicas se encuentra la búsqueda de antígenos, fracciones antigénicas o del ADN del parásito en fluidos corporales. En este estudio se estandarizó el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para demostrar la presencia de ADN de *T. cruzi* en sangre completa como una nueva alternativa

de diagnóstico, que ofrece varias ventajas, entre ellas alta sensibilidad y especificidad de resultados.

III. ANTECEDENTES

En 1909, Carlos Chagas se desempeñaba como médico de Minas Gerais, Brasil cuando fue informado que en las paredes y techos de las viviendas de los trabajadores habían ciertos insectos que de noche picaban y succionaban sangre. En el intestino de estos insectos encontró unos protozoos flagelados que llamó *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz. Al inocular el parásito en un grupo de monos a las tres semanas recuperó los tripanosomas circulantes de la sangre de éstos. Posteriormente, aisló el parásito de la sangre de un niño con fiebre, anemia y linfadenopatía generalizada. Con ello demostró que este tripanosoma es el agente patógeno de una enfermedad endémica de ciertas regiones de Brasil, a la que le llamó "Tripanosomiasis Americana". Es con toda justicia que esta enfermedad tiene como epónimo Enfermedad de Chagas (6,7). El segundo país en donde se diagnosticó la Tripanosomiasis Americana, fue El Salvador, por Segovia en 1913 (6).

1. Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protozoo mastigóforo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos y un insecto vector. Los huéspedes mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos (el perro o el gato) o silvestres (diversos mamíferos, especialmente los roedores y los carnívoros) (8).

En sus diversos huéspedes y en medios de cultivo, *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos fundamentales: amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote.

El amastigote es la forma leishmanoide de Wenyon. Se trata de un elemento redondeado de unos dos micrómetros de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el kinetoplasto, al microscopio de luz aparentemente es aflagelado, pero en la ultraestructura se observa que posee un corto flagelo no emergente; es la forma de multiplicación del parásito y lo hace en el interior de las células del mamífero.

El promastigote también se encarga de la división celular y se diferencia del anterior

en que se encuentra en el intestino del vector.

El epimastigote corresponde a la crithidia de la antigua clasificación. Es de aspecto fusiforme, de unos veinte micrómetros de largo, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo o a su nivel, y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Predomina en los cultivos libres de células.

El tripomastigote es de aspecto fusiforme, de unos 20 micrómetros de largo, con kinetoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso; posee un kinetoplasto subterminal, posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. No se multiplica, se le encuentra en la sangre de los mamíferos siendo el diseminador de la infección por vía sanguínea (8,9).

T. cruzi puede crecer en casi todas las células del huésped vertebrado; fibroblastos, células adiposas, células de médula ósea, células del músculo estriado, del bazo, de los nódulos linfáticos, del hígado, riñón o células nerviosas, pero tienen mayor afinidad por las células nerviosas que se encuentran en el músculo liso (10).

2. Vector

Los insectos vectores son reduvídeos, de la familia de los triatomíneos, y están representados por diversos géneros de triatomas. Estos insectos se infectan al ingerir la sangre de los mamíferos que contiene tripomastigotes. En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican muy activamente como epimastigotes por fisión binaria y al cabo de quince a treinta días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma (8).

Es de hábito exclusivamente nocturno que produce una picadura completamente indolora. Tiene especial predilección por la cara o los sitios al descubierto (11). Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes metacíclicos, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas, cuando el mamífero se rasca (8).

Los animales domésticos, mamíferos, aves, etc., así como animales silvestres (armadillo, murciélago, tacuazín, etc.) son igualmente atacados. Además sirven de reservorio ya que no presentan la enfermedad y están asociados a falta de higiene y salubridad (6, 10, 12)

Estos se adaptan mejor a los climas secos, generalmente habitan en casas rurales y suburbanas donde existen condiciones favorables para su desarrollo. Se les encuentra en ranchos techados de zacate o de cualquier clase de paja, en las paredes de palo pique, de barro no cocido o bajareque. Durante el día se ocultan entre el techo pajizo, grietas de las paredes, entre la madera de catres, gallineros, en lugares en donde duermen animales domésticos, etc. (11).

Manifiestan cierto grado de canibalismo, mediante el cual insectos en ayunas que no han podido satisfacer su apetito, se arrojan sobre sus congéneres llenos de sangre y los succionan por punción abdominal (10).

Para que la fecundación de los huevos tenga lugar debe preceder una punción de sangre, en caso contrario los huevos son estériles. Las larvas que salen de los huevos sufren diferentes mudas pasando por el periodo de ninfa antes de transformarse en adultas (11, 13).

Tres son los factores de principal importancia en la eficiencia del vector: 1) grado de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, 2) Tiempo de intervalo entre alimentación y defecación y 3) grado de contacto con el huésped humano (14).

Los vectores más importantes son: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*. *Rhodnius prolixus*. (10).

3. Epidemiología

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos.

De acuerdo con la OMS existirían alrededor de 24 millones de personas infectadas en el continente. Los triatomas que transmiten la infección por *T. cruzi*, se distribuyen en un área que se extiende desde el paralelo 43° de latitud norte (sur de California), hasta el paralelo 49° latitud sur (región central de la Argentina). En esta extensa región, prevalecen las condiciones ecológicas favorables para la transmisión y la manutención de la parasitosis (8, 15).

La severidad e irreversibilidad de las lesiones cardíacas y de otros órganos, provocan invalidez y mortalidad entre los grupos económicamente activos. Sin embargo, las estadísticas sanitarias no reflejan la verdadera magnitud del problema, porque la enfermedad prevalece en zonas suburbanas o rurales donde la atención médica no capta, en su integridad, la importancia de la infección (15).

El conocimiento de la magnitud de la infección chagásica y su repercusión sobre la salud y la economía de los países latinoamericanos varía grandemente, ya que la falta de recursos para el diagnóstico y la ausencia de estudios anatomopatológicos dificultan el conocimiento de las diversas formas clínicas, por lo que muchos casos son registrados como muerte súbita, especialmente en el área rural. (8, 15).

3.1. Prevalencia

La primera publicación referente a la existencia de tripanosomas en el país, la debemos a la inquietud científica del maestro Dr. Rafael Morales, quien aún siendo estudiante presentó en la revista "La Juventud Médica" (Tomo XIV, No. 3, marzo 1914), su comunicación: "Los Tripanosomas en Guatemala" (*Trypanosoma lewisi*), que encontró en algunos roedores en la ciudad capital (16).

La historia de la enfermedad de Chagas se inicia en Guatemala en 1932, cuando invitado por los señores Nottebom vino el Profesor Dr. Edward Reichenow, del Instituto de Medicina Tropical y de la Universidad de Hamburgo, con el propósito de efectuar investigaciones científicas en fincas cafetaleras en los departamentos de Santa Rosa y Escuintla. En un folleto, de 24 páginas publicado por la Dirección General de Sanidad, Reichenow nos refiere con amplitud de detalles el resultado de sus estudios efectuados en la finca "Las Viñas", del municipio de Barberena, departamento de Santa Rosa y luego en "San Andrés Osuna" y "Concepción", del Departamento de Escuintla. Obtuvo numerosos ejemplares e hizo cuidadosas observaciones de un redúvido que por sus características morfológicas supuso que se trataba de *Triatoma dimidiata*, del que presentó tres fotografías: cara dorsal, perfil y estadios ninfales en quienes encontró un 40 por ciento de infección por *Trypanosoma cruzi*. Igual proporción halló en ejemplares de redúvidos procedentes de las fincas "Sabanetas" y "Cerro Redondo" y algunos de Cuilapa que le diera el Dr. Augusto González y uno de San Miguel Chicaj, municipio del departamento de Baja Verapaz, proporcionado por el Sr. Carlos Lehnhoff. En la finca "Las Viñas", practicó exámenes de sangre a noventa perros, quince menores de cuatro meses, en los que encontró tres infectados con *T. cruzi*. En parte de su trabajo nos dice: "He inyectado el contenido del recto de chinchorras infectadas a algunos cuyos, a un conejo joven y a dos perritos, habiendo apreciado sin excepción, en la sangre de estos animales, después de un intervalo de doce a veintinueve días, flagelados del aspecto característico del *T. cruzi*" (16, 17).

La culminación de las investigaciones de Reichenow fue el diagnóstico de los dos primeros casos de enfermedad de Chagas en Guatemala. "En el primer caso se trata de un niño indígena que, cuando se encontraron los tripanosomas, tenía un año y seis semanas de edad, estando bien desarrollado y dando la impresión de completa salud". "En el segundo caso en el que comprobé la infección, se trataba de un niño hijo de ladinos. Tenía un año y siete meses de edad, estando igualmente bien desarrollado". En ambos casos sólo se pudo observar algunos ganglios axilares e inguinales aumentados de volumen. Por esos años aun se afirmaba que el mixedema, bocio y cretinismo eran secuelas de enfermedad de Chagas; al no encontrar esos síntomas en los adultos que examinó en "Las Viñas" hicieron que Reichenow diera como conclusión de sus investigaciones: "Por lo

tanto, si por una parte pude identificar la existencia de la enfermedad de Chagas en Guatemala, por otra parte estoy persuadido de que esta enfermedad no tiene la gran importancia que se le ha querido dar". Fue lamentable que después de acuciosas observaciones sobre vectores y reservorios, el investigador alemán, en base a dos casos asintomáticos en niños y a la ausencia de trastornos bociógenos en adultos, estuviese convencido de la poca importancia clínica de la enfermedad de Chagas. Afirmación que contribuyó a detener por una década su investigación en nuestro país (16).

En 1935, el Dr. Romeo de León inicia el estudio de esta enfermedad reportando la existencia de nuevos casos humanos, y el descubrimiento del TSP (*Trypanosoma* no clasificado) en los monos. Un año más tarde identificó un tripanosoma con marcas diferentes a *T. cruzi* y al que denominó *Trypanosoma guatemalensis*. Comunicó estos hallazgos en el primer Congreso Interamericano de Medicina, celebrado en Río de Janeiro, en 1946, luego en el Congreso Médico Estudiantil, en México 1947 y en el primer congreso de Malariología en Maracay, también en 1947. En este último quedó establecido que el flagelado denominado por De León *T. guatemalensis*, ya había sido descrito con anterioridad por Tejera como *T. rangeli*. Por ley de prioridad fue el último nombre el aceptado y quedó que De León fue el primero en descubrirlo en casos humanos ya que Tejera lo identificó en reduvidos, transmisores invertebrados. *T. rangeli* es considerado como el agente etiológico de la tripanosomiasis americana en forma benigna, ya que hasta la fecha no se ha podido demostrar su valor patológico (16 - 20).

Autores sudamericanos como Maza y Talice descartan definitivamente la relación entre trastornos tiroideos (bocio y cretinismo) y enfermedad de Chagas (16).

En julio de 1947, El Dr. Jorge A. Fernández observa en el tercer servicio de mujeres del Hospital General "San Juan de Dios", de la ciudad capital, el primer caso de cardiopatía chagásica con comprobación histológica (necrópsica), trabajo que es continuado y completado más tarde por Tejada. Por motivos que indica el autor, la publicación se hizo cinco años después, en la revista La Escuela de Medicina, en su sexta época. El diagnóstico microscópico se hizo en el Laboratorio de Histopatología que entonces estaba a cargo del

Dr. Francisco J. Aguilar. Durante 1952 - 1954, el intenso trabajo de Peñalver y col., permitió la descripción de la enfermedad en diversas zonas rurales del país, y la realización de las primeras acciones del gobierno con el objeto de iniciar las campañas de erradicación (16 - 20).

Este y otros trabajos permitieron establecer que los principales vectores de *T. cruzi* en el país eran *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*, siendo los tres hematófagos, con hábitos domiciliarios, así como describir la zona endémica del país que incluyó a los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa (17 - 20).

Los nuevos conocimientos aportados por estos trabajos al describir la enfermedad en zonas rurales, permitieron que a nivel de gobierno se realizaran las acciones con el fin de erradicar esta enfermedad. Desafortunadamente a partir de estos trabajos (1954) es poco lo que a nivel nacional se sabe de la enfermedad ya que los datos obtenidos, especialmente desde 1980, corresponden a trabajos de investigación aislados y realizados por las Universidades. En la sección de Tripanosomiasis de la Dirección General de Servicios de Salud, el diagnóstico se realiza temporalmente y los casos remitidos a esta sección se realizan en forma voluntaria ya que no se realiza una vigilancia epidemiológica (17, 18, 21).

De 1960 a 1983 es poca la información que se tiene, ya que con el tiempo se fue dejando de producir los reactivos y por lo consiguiente no se realizó el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En el Departamento de Citohistología de la Fac. de CCQQ y Farmacia se realizó un estudio de 1984 a 1987, el cual permitió determinar que la prevalencia general es del 9.24 por ciento, encontrándose que los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa presentaban las prevalencias más altas, así también se determinó que el área endémica abarcaba más departamentos, lo que parecería indicar una migración de la enfermedad (22).

Hasta 1989 no era una enfermedad de notificación obligatoria en el Ministerio de Salud Pública, el cual creó el Departamento de Chagas adscrito al Servicio Nacional de Erradicación de malaria SNEM, por la cantidad de casos acaecidos. Para la creación del centro de referencias Clínicas se logró algunos contactos con organizaciones internacionales como el convenio de cooperación entre el gobierno de Guatemala y Japón, con la colaboración muy estrecha de la Universidad de San Carlos de Guatemala de 1991 a 1996, y el convenio en 1994 con la División de Malaria con el apoyo de la O.P.S. los cuales colaboraron en investigaciones con las que se avanzó y se obtuvieron mayores logros acerca de la enfermedad de Chagas, entre las cuales se citan algunas a continuación (22).

Matta y colaboradores a fin de evaluar la presencia de la infección congénita, de 1989 - 1991 llevaron a cabo en el hospital de Chiquimula un estudio con una muestra de 600 parejas madres/neonatos donde se detectaron cinco niños con infección congénita, de los cuales únicamente tres presentaron sintomatología sugestiva. En este caso se utilizó la técnica de IHA-Hoechst y reactivos de ELISA (antígeno soluble) e IFI preparados en el Departamento de Citohistología con la cepa Y. Los resultados demostraron que esta transmisión existe en Guatemala. Debido a lo anterior el Departamento de Citohistología en 1992 realizó un estudio con 32 recién nacidos de madres chagásicas que visitaron el Hospital Nacional de Zacapa y que tenían títulos de anticuerpos IgM específicos a *T. cruzi* pero con hemocultivos y parasitemia negativa, lo cual hacía dudar el diagnóstico de infección chagásica congénita. Se les realizó un seguimiento por un año con determinaciones sucesivas de IgM (ELISA) y de IgG (ELISA, IHA), observándose que la IgM se negativizó aproximadamente a los 6 meses, mientras que la IgG aumentó progresivamente (22).

En 1994, Paz y colaboradores realizaron un estudio con 30 sueros de pacientes adultos originarios de Santa María Ixhuatán y Santa Rosa, que presentaron positividad en por lo menos dos métodos serológicos de rutina (IHA, ELISA y/o IFI) en los que se quería confirmar la enfermedad por medio de técnicas inmunoquímicas y con los cuales se obtuvo una buena correlación (23).

En 1995, Matta y colaboradores realizaron un estudio con 544 muestras de la población de Santa María Ixhuatan, observándose una mayor seroprevalencia en el sexo femenino (64 por ciento), así como una tendencia al incremento progresivo de la seropositividad con el aumento de edad, ya que los rangos de edad más afectados fueron: mayores de 40 años con 44 por ciento de los casos positivos y 31 a 39 años con 18 por ciento. La población adulta con la que se trabajó fue de 314 personas, de ellos 37 (13.35 por ciento) fueron positivos para la enfermedad de Chagas, siendo mayor para el sexo femenino con 25 personas (13 por ciento) de positividad y 12 (9.8 por ciento) para el sexo masculino, probablemente esto se debió a la mayor afluencia del sexo femenino. De los 37 seropositivos, 7 pacientes presentaron hallazgos anormales electrocardiográficos como bloqueo completo de rama derecha (BCRD) y eje desviado a la izquierda (EDI); en el sexo femenino el hallazgo más frecuente fue BCRD mientras que en el sexo masculino fue EDI. Se llegó a la conclusión de que este porcentaje bajo observado nos indica que estas anomalías no son signos patognomónicos de la enfermedad de Chagas, lo que hace necesario realizar el diagnóstico en base a los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio (24).

4. Transmisión

El hombre puede infectarse por *T. cruzi* mediante diversos mecanismos:

- El más importante es por las deyecciones de triatomíneos. El insecto, al picar en zonas descubiertas de la piel del hombre durante el sueño, elimina sus heces con los tripomastigotes metacíclicos que penetran por el sitio de la picadura o por las mucosas.
- Vía transplacentaria. Una madre infectada puede transmitir los *Tripanosoma cruzi* circulantes en la sangre durante la segunda mitad de la gestación. Esto ocasiona una infección congénita.
- Vía transfusional. Esta constituye un peligro real, puesto que *T. cruzi* mantiene su viabilidad en las bolsas de sangre refrigeradas hasta por dos meses.
- Por trasplante de órganos. Esto ocurre principalmente en trasplantes renales, de donadores infectados cuyos receptores son seronegativos para la enfermedad de Chagas.

- Por lactancia materna. Es una remota posibilidad de infección. En la literatura se refieren varios casos bien documentados de este mecanismo de transmisión.
- Por la manipulación de sangre y animales infectados, como ocurre en las infecciones accidentales que se producen en los laboratorios que trabajan en la enfermedad de Chagas experimental, o en los individuos que descueran animales silvestres o semidomésticos infectados (25).

En forma experimental, se ha demostrado la transmisión de *T. cruzi* por vía oral, sea por infección directa con el flagelado o mediada por moscas (*Musca domestica*), que previamente han digerido deyecciones de triatomas infectados con el parásito. Probablemente, este mecanismo de transmisión tenga poca o ninguna significancia para la infección directa del hombre.

Es más frecuente que la infección chagásica ocurra en la niñez, aunque la sintomatología suele aparecer muchos años después de la primoinfección. Por causas no determinadas, el compromiso visceral miocárdico o del tubo digestivo es más frecuente en el sexo masculino (25).

5. Patología

En el hombre se han detectado autoanticuerpos que reaccionan contra el endotelio, los vasos y las células musculares del corazón (anticuerpos EVI). Estos anticuerpos están presentes en el 95 por ciento de los pacientes con miocarditis chagásica crónica activa y en el 45 por ciento de los individuos infectados asintomáticos. El rol patógeno de los anticuerpos no está claro. Se piensa que existirían determinantes antigénicos comunes a las células cardíacas y a *T. cruzi*, lo que induciría la producción del daño por parte de los linfocitos sensibilizados por el parásito (26, 27).

En el huésped vertebrado, *T. cruzi* produce una destrucción de células y de tejidos que resulta proporcional a su velocidad de multiplicación. Como es un protozoo que se multiplica en el interior de las células, se forman los pseudoquistes, que antes se conocían como "Nidos de Leishmanoides". Al inicio de la infección, el organismo reacciona con una

inflamación predominantemente polimorfonuclear y con la aparición de anticuerpos séricos aglutinantes y precipitantes. A medida que continúa la multiplicación endocelular del tripanosoma, los componentes antigénicos, constituidos por los parásitos muertos y el material proteico de las células destruidas, determinan una inflamación predominantemente linfoplasmocitaria y un ascenso de los títulos serológicos. La parasitemia, al inicio muy elevada, se va haciendo escasa. La inflamación va aumentando progresivamente, lo que contrasta con la disminución, y casi desaparición, de los pseudoquistes de los tejidos (26, 27).

En la enfermedad de Chagas existe compromiso de los órganos ricos en sistema fagocítico mononuclear (ganglios linfáticos, hígado y bazo), sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos, especialmente el tubo digestivo. En la fase aguda de la infección se observa un aumento de volumen de los ganglios, esplenomegalia y hepatomegalia, meningoencefalitis y cardiomegalia por la dilatación de las cavidades del corazón. En la fase crónica, el compromiso se centra fundamentalmente en el miocardio y en el tubo digestivo. En estos casos se desarrollan enormes cardiomegalias por la dilatación e hipertrofia del miocardio, con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que puede ocasionar un verdadero aneurisma, sobre todo en la punta del corazón. El tubo digestivo, principalmente el esófago y el colon, aparecen elongados y muy dilatados, con importante hipertrofia de la capa muscular, son megas digestivos tan característicos de la fase crónica de la tripanosomiasis (26, 27).

El desarrollo de un mega depende del número de neuronas comprometidas. Después de años, se produce la hipertrofia muscular, la dilatación y la elongación del órgano hueco. En el corazón, al producirse la despoblación neuronal de los ganglios parasimpáticos cardíacos, se establece un desequilibrio neurovegetativo, con un predominio relativo del sistema simpático. Así, se produciría un trabajo cardíaco desgastante que da como resultado una cardiopatía chagásica (26, 27).

6. Sintomatología

6.1 Enfermedad de Chagas Adquirida

Después de un período de incubación, estimado entre cuatro y catorce días se desarrolla la enfermedad en la cual se distinguen los periodos agudos, latente o indeterminado y crónico (8, 28).

a. Período Agudo

La inmensa mayoría de los pacientes adquieren la infección sin manifestaciones clínicas evidentes y sólo alrededor del 5 por ciento de los infectados tienen una fase aguda sintomática. Si bien el período agudo se puede presentar a cualquier edad, es mucho más frecuente en el niño.

- Chagoma de inoculación: La primoinfección o "chagoma de inoculación" habitualmente se produce en la cara, pero también puede afectar otros sitios. Cuando los tripomastigotes invaden la piel periorbital o conjuntival, se produce el complejo oftalmoganglionar o "signo de Romaña-Mazza" caracterizado por un edema periocular unilateral, bipalpebral, elástico, duro de color violáceo (ojo en tinta) e indoloro, que puede dificultar la apertura palpebral. Se presenta además hiperemia de la conjuntiva, escasa secreción conjuntival, dacriocistitis y adenopatía satélite, destacándose un ganglio sobre los demás.
- Compromiso visceral: Es más frecuente observarlo en niños. En un menor de 2 años, se presenta como un cuadro grave, caracterizado por fiebre de intensidad variable, habitualmente no más elevada de 38°C, hepatoesplenomegalia y poliadenopatías generalizadas, anasarca, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia y meningoencefalitis. En el niño mayor, el cuadro es semejante, pero más atenuado y en el adulto es de rara observación. El compromiso cardíaco se debe a una miocarditis de intensidad variable. Se describen formas de aumento moderado del corazón, con escasa sintomatología y ligeras alteraciones del ECG; pero también se

observan casos severos y graves, con gran cardiomegalia.

La meningoencefalitis suele observarse en el niño menor, se caracteriza por trastornos motores, convulsiones, vómitos y compromiso sensorial, con discretas alteraciones del LCR que son de mal pronóstico (8, 28 - 30).

b. Período Latente o Indeterminado

Transcurrido el período agudo, la sintomatología desaparece y se entra en un estado de latencia, caracterizado por una lenta multiplicación intracelular de los parásitos y oligoparasitemias, sin signos clínicos. La curación espontánea con eliminación del parásito, es rara. Este período puede durar indefinidamente durante toda la vida o pasar a la forma crónica de la enfermedad (8).

c. Período Crónico

Aparece usualmente en forma habitual después de diez o más años de una primoinfección. Se caracteriza por el daño irreversible de algunos parénquimas, especialmente del corazón y de los órganos huecos, además de presentar niveles mucho más bajos de parásitos que en la fase aguda (8, 28).

6.2 Enfermedad de Chagas Congénita

El paso de *T. cruzi* al feto, durante la gestación, determina un cuadro clínico caracterizado por prematurez, hepato, esplenomegalia y compromiso variable del sistema nervioso central y el miocardio (8, 28, 30).

El peso del niño al nacer suele ser inferior a 2,500 gr. El aumento del volumen del hígado y del bazo constituyen los signos principales de la infección. Habitualmente el cuadro clínico evoluciona sin fiebre. En alrededor del 50 por ciento de los casos se observan signos y síntomas de meningoencefalitis, con alteraciones del LCR (hiperalbuminorraquia y elevado número de linfocitos). El compromiso cardíaco, aunque

con menor frecuencia, suele desencadenar una insuficiencia cardiaca congénita, con el ECG alterado (8, 28, 29, 31).

Además suele observarse una anemia leve, a veces con caracteres hemolíticos e ictericia. En la piel aparecen chagomas, con placas eritematosas y pústula central, localizados en las extremidades inferiores. Sin embargo, no todos los niños con infección chagásica congénita presentan una sintomatología; puede ocurrir que el peso del niño al nacer sea normal y el hallazgo de hepato y esplenomegalia haga sospechar de la enfermedad. La enfermedad de Chagas congénita debe ser considerada como grave, porque produce una elevada mortalidad, especialmente en aquellos niños que presentan sintomatología al nacer (8, 28, 30).

6.3 Enfermedad de Chagas Transfusional

La infección por *T. cruzi* a través de transfusión sanguínea puede producir un cuadro clínico de acuerdo con el estado inmunológico del receptor. En inmunocompetentes (pacientes previamente sanos o con hemorragias), la infección pasa habitualmente inadvertida y si aparece sintomatología (fiebre prolongada por meses, adenopatía, hepatomegalia, etc.), es tardía, raramente se le asocia con la transfusión, y la detección de *T. cruzi* es dificultosa. En cambio en el paciente inmunocomprometido el cuadro clínico generalmente es agudo y se manifiesta por fiebre alta y mantenida, con compromiso progresivo del estado general. En estos casos la detección de *T. cruzi* en la sangre es relativamente fácil (8, 28, 29, 31).

7. Inmunidad

El hombre presenta algunas variaciones individuales en lo que respecta a la resistencia natural a los tripanosomas. En el plasma se pueden encontrar anticuerpos protectores y fijadores del complemento específico a cada cepa, los que presumiblemente causan la desaparición de las formas sanguíneas (32 - 34).

La resistencia natural del humano al *T. cruzi* no ha sido bien demostrada. Algunos pacientes durante la fase aguda de la enfermedad experimentan algunos síntomas como la depresión de linfocitos T, que contrastan con los de otros pacientes también en fase aguda pero con síntomas más comunes, sin embargo se ha observado que en ratones infectados experimentalmente con *T. cruzi* existe un incremento en la actividad celular de células accinas (NK), este aumento sugiere una resistencia natural, aunque no se está bien seguro (35).

Los controles para la proliferación del *T. cruzi* tanto en la fase aguda como en la crónica no son conocidos, pero se sabe que son diferentes dependiendo del estado. Los anticuerpos específicos juegan un papel central muy importante en la fase crónica y esta razonablemente establecido, pero tal papel en la fase aguda no está bien definida. El mecanismo de defensa en la fase aguda se está investigando por medio de adaptaciones del *T. cruzi* en el laboratorio, produciendo intensa parasitemia en ratones, en la que se ha observado severa inmunosupresión de la actividad policlonal y alta mortalidad (35).

8. Diagnóstico Serológico

Las pruebas serológicas están basadas en la reacción antígeno - anticuerpo, y son las más utilizadas para el diagnóstico, entre estas están: Fijación del Complemento (prueba de Machado), ELISA, látex, inmunohemaaglutinación e inmunofluorescencia indirecta, esta última proporciona un apoyo confirmatorio en la infección por *T. cruzi*. Pruebas de ELISA, con el uso de antígenos recombinantes desarrolladas recientemente, proporcionan ahora un instrumento serodiagnóstico muy específico y sensible para la detección de *T. cruzi*. Estas pruebas son útiles sobre todo para estudios de detección en bancos de sangre. La aglutinación directa en una prueba de tarjeta es valiosa para usar en el campo o instalaciones médicas rurales, usando antígeno tripanosómico liofilizado (32, 36 - 37).

La prueba de inmunodifusión doble no se recomienda para ser utilizada como prueba de tamizaje ya que su sensibilidad para detectar pacientes en fase aguda es baja y con respecto a especificidad, existen reacciones cruzadas con sueros positivos para

Leishmania. Esta prueba tiene como ventajas que es simple y práctica de realizar, de bajo costo y no necesita de equipo sofisticado. Este método es útil para el serodiagnóstico de los pacientes en fase indeterminada de la enfermedad, siempre y cuando se utilice como antígeno el estadio de tripomastigote del parásito (38 - 41).

9. Diagnóstico Parasitológico

Para la demostración del parásito se utiliza sangre, de preferencia tomada durante el ascenso de la temperatura. También pueden obtenerse muestras de líquido cefalorraquídeo, aspirados de ganglios linfáticos o de la lesión primaria, o muestras obtenidas por punción de la cresta iliaca, médula ósea esternal o bazo (36).

9.1 Examen Microscópico

La sangre fresca o los tejidos extraídos en solución salina se deben conservar calientes y examinarlos inmediatamente para observar a los tripanosomas moviéndose activamente. Las películas gruesas se pueden tefir con el colorante de Giemsa. Sin embargo, para confirmación se requieren películas delgadas. A veces es necesario centrifugar. Deben tefirse los frotis de tejidos para identificar las formas pretripanosómicas. El centrifugado de líquido cefalorraquídeo se debe examinar de la misma manera, pero rara vez hay más de un tripanosoma por mililitro (32, 36 - 37).

El método de concentración por capilar para el diagnóstico parasitológico es efectivo sólo cuando la parasitemia es alta, es decir, la densidad de parásitos en sangre del paciente es mayor a cuatro células/ul de sangre. En esta técnica el EDTA no debe ser utilizado como preservante de la muestra sanguínea ya que el mismo podría inhibir la movilidad del parásito (42 - 44).

9.2 Cultivo

Todas las muestras pueden ser sembradas en medios de cultivo, entre ellos Tobie, el

semisólido de Wenyon, el NNN, LIT, u otros medios de cultivo para *T. cruzi* o *T. rangeli*. Los microorganismos crecen a temperaturas de 22 a 24°C y se hacen resiembras cada 1 a 2 semanas. El material centrifugado se examina microscópicamente para obtener tripanosomas. El medio de cultivo para las formas africanas no es satisfactorio (32, 36 - 37).

9.3 Inoculación en Animales

T. cruzi y *T. rangeli* se pueden demostrar por inoculación intraperitoneal de la sangre a cierto número de ratones (cuando se pueden conseguir perros o gatos estos son los animales de elección). Los tripanosomas aparecen en la sangre pocos días después de una inoculación satisfactoria (32, 36 - 37).

9.4 Xenodiagnóstico

Es el método de elección cuando se sospecha que existe enfermedad de Chagas y las otras pruebas fueron negativas, especialmente durante la fase temprana de la enfermedad. Como la infección de laboratorio producida por *T. cruzi* es un peligro definido, sólo personas capacitadas en el procedimiento deben efectuar la prueba. Alrededor de seis triatomas sanas, criadas en laboratorio, son alimentadas en el paciente y sus excreciones se estudian de siete a diez días después para buscar las formas de desarrollo. La defecación ocurre inmediatamente después de la alimentación reciente, o se le puede forzar sondeando suavemente al ano del insecto y presionando su abdomen (32, 36 - 37).

9.5 Diagnóstico Diferencial

La diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* es muy importante. Se ha descrito un procedimiento, que permite distinguir las dos especies basado en la electroforesis del ADN total de los parásitos en geles de agarosa los cuales son teñidos con bromuro de etidio (36).

10. Reacción en cadena de la polimerasa

Recientemente se ha diseñado y perfeccionado una metodología, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la amplificación *in vitro* de una región selectiva de ADN al imitar el fenómeno de replicación de ADN *in vivo*. Esta técnica es sumamente específica en la detección y relativamente rápida (45).

La técnica puede resumirse en tres importantes pasos: desnaturalización de la doble hélice de ADN a 95-96°C, hibridización de los cebadores a un sitio complementario del templado a 45-72°C y extensión del cebador en la terminal 3'OH por adición sucesiva de dNTPs. La desnaturalización consiste en la separación de las cadenas de ADN, para formar cadenas sencillas, por medio de altas temperaturas. La hibridización es la restauración de la condición de doble cadena por reducción de temperatura, en presencia de un par de oligonucleótidos sintéticos que tienen afinidad específica por la región del ADN en cuestión, siendo uno de ellos complementario al extremo 5' del gen o fragmento del ADN que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta. La extensión es lograda por la polimerización del ADN llevada a cabo por una enzima termoestable a partir de los oligonucleótidos apareados en el paso anterior. Este ciclo se repite de 30 a 50 veces, lográndose multiplicar la secuencia original en una progresión geométrica, de tal forma que al final del proceso, la cantidad del ADN amplificado es de 10^6 a 10^7 veces la cantidad original (46).

El esquema de desnaturalización, hibridización y extensión con cada paso definido por un periodo fijo de tiempo es llamado ciclo. La repetición de tal ciclo lleva a la amplificación del ADN (47).

Los componentes que se requieren para la reacción son:

- ADN templado de hebra única o plantilla de ADN
- Cebadores (secuencias de oligonucleótidos complementarias a las terminales de una secuencia definida de ADN templado)
- Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)

- Enzima ADN polimerasa termoestable

Una nueva hebra de ADN complementaria puede obtenerse por síntesis enzimática bajo condiciones apropiadas. La plantilla de ADN de hebra única es fácilmente generada por desnaturalización caliente de ADN de hebra doble. Los cebadores pueden ser sintetizados en el laboratorio o comprados comercialmente. Los buffers utilizados comúnmente en la reacción de PCR contienen Mg^{+2} , cationes monovalentes y cosolventes, los cuales ayudan a estabilizar la enzima e influyen en el proceso enzimático de desnaturalización de ADN. La introducción de ADN polimerasa estable al calor brinda un gran significado en el mejoramiento del PCR y la automatización, además de ayudar a futuros métodos de PCR (45).

En principio cada componente físico y químico de un ensayo de PCR puede ser considerado como un factor variable. Como se demostrará, estos factores no son independientes uno de otro y únicamente por razones didácticas, serán descritos en secciones separadas. Estos factores incluyen:

- Temperatura y tiempo del ciclo térmico
- Desnaturalización inicial
- Extensión del cebador
- Desnaturalización
- Número de ciclos
- Extensión final
- ADN polimerasa
- Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)
- Cebadores
- Concentración de cebadores
- Adición de aceite y volumen de la reacción
- Muestras de ADN
- Utilización de PCR para el diagnóstico

10.1 Temperatura y Tiempo del Ciclo Térmico

Los siguientes parámetros son útiles para termocicladores con bloque metálico (DNA Thermal Cycler, DNA Thermal Cycler 480, Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus Instruments, USA; Polychain I, Polychain II, Poligen, FRG) o con circulación de agua (Thermocycler 60/1, Thermocycler 60/2, Biomed, FRG) utilizando tubos de reacción de 500 ul (Eppendorf Safelock, Perkin-Elmer Gene Amp) y un volumen de reacción final de 25-100ul. (47).

9.1.1 Desnaturalización Inicial

Antes de iniciar la PCR se pueden remover impurezas de las muestras de ADN tales como proteasas o cloroformo calentando a 95°C por 10 min. Durante la realización del PCR la mezcla de reacción puede ser desnaturalizada completamente con un ciclo inicial de calentamiento a 95°C durante 3-5 minutos para que los cebadores puedan hibridarse después del enfriamiento. El ADN genómico no podrá renaturalizarse completamente bajo las condiciones utilizadas en los ciclos subsiguientes (48).

10.1.2 Hibridización de Cebadores

Durante la PCR, el paso de hibridación del cebador es la fase con temperatura más baja. Probablemente el componente más crítico para la optimización de la especificidad del ensayo de PCR es la elección de la temperatura de hibridación (47).

Durante los primeros ciclos de una PCR analítica utilizando una plantilla de ADN genómico, los cebadores deben realizar un tamizaje genómico hasta encontrar los sitios complementarios de hibridación. La probabilidad y especificidad de la hibridación de los cebadores depende de la temperatura, tiempo y de la concentración de los productos utilizados como blanco (plantilla de hebra única) y del cebador mismo. Bajo las condiciones adecuadas, en los primeros ciclos la concentración del blanco se duplica con cada ciclo y la disminución relativa de los cebadores es intangible. La probabilidad de una

hibridización exitosa durante los primeros ciclos está determinada principalmente por el número de copias del blanco y de que se cuente con suficiente tiempo para el tamizaje genómico que le permita a los cebadores encontrar el blanco lo cual depende exclusivamente de la temperatura de hibridización. Si la temperatura es muy alta no ocurre la hibridización pero si la temperatura es muy baja se incrementa dramáticamente la hibridización inespecífica (47,49).

10.1.3. Extensión del Cebador

La elongación a 72°C por 20 segundos para fragmentos menores de 500pares de bases y de 40 segundos para fragmentos mayores de 1.2 kilobases siempre da resultados satisfactorios. Si se sospecha que están presentes estructuras secundarias de los productos de amplificación debe tratarse con tiempos más largos (47).

10.1.4 Desnaturalización

La desnaturalización a 95°C por 20 a 30 segundos es usualmente suficiente, pero es esencial que se adapte el tiempo de desnaturalización, a los tubos y máquinas de PCR que se están utilizando. En los últimos ciclos, las temperaturas de desnaturalización bajas son mejores para conservar la actividad enzimática. Fragmentos relativamente cortos son más fácilmente separados que el ADN compuesto. Si la temperatura de desnaturalización es muy baja, el ADN incompletamente separado se vuelve a unir inmediatamente durante el enfriamiento, y esto no da acceso al cebador (47).

10.1.5 Número de ciclos

En una PCR analítica, el número de ciclos no debe exceder de 40ciclos. Aunque se han establecido amplificaciones producidas originalmente de menos de 10 moléculas en una reacción óptima que puede generalmente detectarse en un gel de agarosa bromuro de etidio con menos de 40 ciclos. El número de ciclos más apropiado va de 25 a 35. Muchas veces, al incrementar el número de ciclos se producen amplificaciones no deseadas y productos no

deseados. Una molécula de polimerasa bacteriana no cataliza la extensión de más de un cebador por ciclo (47).

10.2 Extensión Final

Generalmente después del último ciclo, se realiza un tiempo de espera de 5-15 minutos a 72° para promover la total extensión de los productos parcialmente extendidos y completar la hibridización de productos complementarios en una hebra. Después de completar la PCR los tubos pueden ser almacenados a -20° hasta que sean necesarios para analizar los productos (48).

10.3 ADN polimerasa

La cantidad de polimerasa es uno de los factores más importantes a ser optimizados para una prueba en particular. Para la mayoría de pruebas, la cantidad óptima de enzima será entre 0.5 y 2.5 U en un volumen de reacción de 50µl. Concentraciones altas de enzima algunas veces llevan a disminuir la especificidad, pero es esencial para pruebas diagnósticas de muestras de diferentes pacientes utilizar cierto exceso de polimerasa debido a la potencial actividad inhibitoria de las muestras (50 - 52).

10.4 Trifosfato desoxinucleótidos (dNTPs)

Generalmente, una solución stock 10mM con cantidades equimolares de las cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) es apropiado para ensayos con tubos múltiples. Para experimentos menores deben prepararse soluciones stock 1-2 mM y almacenarse a -20°. Mezclas no equimolares de dNTP reducen la fidelidad de la polimerasa. Se ha observado una disminución significativa de la intensidad de la señal cuando se utilizan soluciones almacenadas por más de 2 meses. Las concentraciones óptimas de dNTP dependen de:

- Longitud de los productos de amplificación
- Concentraciones de MgCl₂
- Concentración del cebador

- Astringencia de la reacción

En otras ocasiones el dNTP reduce la concentración de Mg^{2+} libre, interfiriendo con la actividad de la polimerasa y disminuyendo el anillamiento del cebador. La ADN polimerasa cataliza la polimerización de dNTP con alta fidelidad en bajas concentraciones de dNTP (menor de 10 μ M) las cuales son utilizadas correctamente para obtener una óptima sensibilidad de una PCR analítica de 100 a 200 μ M. Pero en una preparación de PCR, en la que los productos son reamplificados en las hebras únicas o dobles para secuenciar o sintetizar pruebas, podría ser esencial la disminución de la concentración de dNTP a 20-40 μ M (47).

10.5 Cebadores

En la mayoría de aplicaciones, es la secuencia y la combinación de los cebadores lo que determina el éxito de los ensayos. Los tamaños útiles de cebadores son de 14 a 40 bases de longitud con el 40 y 75 por ciento de uniones G-C (Guanidina-Citocina). Existe una fórmula que permite calcular el contenido de uniones G-C en los oligonucleótidos de los cebadores. La utilización del cebador depende del propósito del experimento. Las reglas generales para el diseño de cebadores fueron enumeradas por Rappolee 1990 (47).

10.5.1 Concentración de cebadores

Deben prepararse, soluciones stock acuosas de los cebadores. No son necesarias cantidades equimolares si se va a realizar amplificación de ADN de hebra sencilla. La concentración de los cebadores debe calcularse y ajustarse para reflejar un número real de moléculas, preferiblemente nanogramos/ml o alguna otra forma de expresar concentración (47).

10.6 Adición de Aceite y Volumen de Reacción

La mayoría de termocicladores no calientan las tapaderas de los tubos de reacción,

por lo que es necesario aplicar una capa de aceite mineral sobre la mezcla de reacción para prevenir la evaporación y la contaminación a lo largo del ensayo. La evaporación eleva la concentración de los reactivos y disminuye la temperatura. Sin embargo altas concentraciones de aceite disminuyen el entorno térmico, por lo que es necesaria la estandarización de la cantidad de aceite a agregar para minimizar estos factores. En la mayoría de reacciones se agregan 70ul de aceite por 100ul de reactivo, 40ul de aceite por 50ul de reactivo y 30ul de aceite por 25ul de reactivo que es probablemente suficiente. Si es necesario el aceite puede ser removido con cloroformo pero es mejor evitarlo cuando se hace electroforesis (53, 54).

10.7 Muestras de ADN

Una muestra para PCR puede estar contaminada, inhibida por la reacción o no contener ADN. Esto es crucial para el ensayo diagnóstico y se necesita incluir controles que verifiquen todas estas posibilidades (47).

Además del ADN, pueden haber otras sustancias en las muestras que interfieran con el proceso de PCR. Algunas veces es la pureza de la muestra la que limita la sensibilidad del ensayo. En algunos casos la congelación de las muestras puede afectar la reproducibilidad (47).

Para muestras clínicas, es importante que se esté consciente del potencial de inhibición por parte de compuestos como EDTA, heparina y compuestos relacionados con H_2PO_4 etc. El EDTA presente en las muestras de sangre como anticoagulante, puede ser removido de la sangre simultáneamente con la hemoglobina de eritrocitos hemolizados antes de la lisis de los leucocitos lavados (47).

10.8 Utilización de PCR para el Diagnóstico

Se han realizado muchos estudios acerca de la utilidad de la reacción de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en los que se han obtenido resultados

satisfactorios.

La mayor aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa es el diagnóstico de la infección de *T. cruzi* y simultáneamente la identificación directa de los diferentes clones naturales circulantes en vectores y sangre de mamíferos. La PCR amplifica la región variable del minicirculo del kinetoplasto de *T. cruzi* directamente de muestras biológicas (heces de conejo infectado con triatomas, muestras de sangre de ratones infectados experimentalmente y muestra de sangre humana infectada artificialmente). Aunque la utilidad de esta técnica para estudios epidemiológicos es todavía discutida (55).

En 1992, Russomando y colaboradores obtuvieron ADN de pacientes chagásicos, el cual fue amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando cebadores y oligonucleótidos con hibridación específica para una secuencia altamente repetitiva de ADN nuclear de *T. cruzi*. Muestras de pacientes infectados en fase aguda y crónica dieron resultados positivos en este método y no se observó diferencias significativas cuando se utilizaron muestras de sangre completa o suero (56).

Avila y colaboradores evaluaron un panel de 114 muestras de sangre de pacientes chagásicos en fase crónica y pacientes no chagásicos, los que fueron evaluados para *T. cruzi* por el método de xenodiagnóstico, serología y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras de sangre fueron preservadas en buffer de guanidina-EDTA, el ADN total de sangre fue aislado con el ion cobre 1,10-phenanthrolina y se utilizó una plantilla para amplificación por PCR de las regiones variable y conservada de las moléculas del minicirculo de *T. cruzi*. Los productos de PCR fueron tamizados por hibridación con Southern blot con una sonda de oligonucleótido marcado con digoxigenina específica para la región conservada del minicirculo. El método mostró una sensibilidad de 100 por ciento comparada con la serología. Todas las muestras positivas para serología y negativas por xenodiagnóstico fueron positivas en PCR. Esto demuestra que la amplificación por PCR de ADN de minicirculo del kinetoplasto de *T. cruzi* reemplaza al xenodiagnóstico en evaluación de parasitemia en pacientes chagásicos en fase crónica y sirve como complemento de la serología, y en tamizaje de donadores en bancos

de sangre (57).

Una solución de guanidina 6M HCl/ EDTA 0.2M fue utilizada para lisis y almacenamiento de especímenes de sangre. El ADN almacenado en sangre lisada con guanidina-EDTA (GEB) estableció que no se degradaba después de un mes de incubación a 37°. Sugiriendo que este reactivo es apropiado para el transporte de muestras de sangre del campo hacia el laboratorio para su análisis. El ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en GEB puede ser extraído con nucleasas químicas, ion cobre 1,10 phenanthrolina. Este procedimiento libera moléculas del minicírculo linearizadas por catenación y permite que una pequeña alícuota del lisado original sea utilizado para el análisis por amplificación con PCR. Esto incrementa la sensibilidad del método dramáticamente por la detección de un pequeño número de parásitos en un volumen grande de sangre. Se realizó aislamiento de ADN de alícuotas de GEB positivas para *T. cruzi* por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con 3 sets de cebadores del minicírculo de kADN específicos para *T. cruzi* produciendo bandas de 83 pares de bases y 122 pares de bases de fragmentos de la región conservada y de 330 pares de bases de la región variable. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel y 7^o hibridización. Los resultados indican que una célula de *T. cruzi* en 20 ml de sangre puede ser detectada por este método. Muestras de sangre de pacientes chagásicos en fase crónica fueron utilizadas y amplificaciones de secuencias del minicírculo del ADNk de *T. cruzi* fueron detectadas en todos los casos aunque los resultados del xenodiagnóstico hayan sido negativos. El método de PCR muestra que puede ser utilizado para reemplazar o complementar al xenodiagnóstico o serología en estudios clínicos o epidemiológicos de la enfermedad de Chagas durante la fase crónica (58).

La detección del ADN del kinetoplasto del *T. cruzi* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta poderosa para el diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas. En Bolivia se ha aplicado esta técnica en 45 niños de primaria con exámenes serológicos sugestivos de presencia de la enfermedad. 26 de las 28 serologías positivas resultaron positivas por PCR. Adicionado a esto, 2 niños serológicamente negativos tuvieron un resultado positivo por PCR. Este resultado sugiere que la detección

de ADN de *T. cruzi* en sangre por PCR puede ser un útil complemento de la serología en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Bolivia (59).

11. Tratamiento

No hay tratamiento eficaz para la tripanosomiasis americana en la fase crónica, ya que las drogas utilizadas eliminan únicamente los parásitos extra celulares. El tratamiento es eficaz únicamente en la fase aguda, sin embargo el Nifurtimox (Bayer 2502) más interferón gamma pueden acortar la fase aguda y pueden aliviar por una temporada a algunos pacientes con tripomastigotes aún presentes en la sangre. El Benzonidazol (Rochagan) y el Nifurtimox son las drogas de elección y requieren un tratamiento largo de aproximadamente 60 días o más, por lo que muchos pacientes requieren hospitalización debido a los efectos adversos frecuentemente asociados. No se han desarrollado vacunas debido a una posible asociación de estas con enfermedades autoinmunes; el único control efectivo es a través de fumigación de las áreas afectadas por el vector (32, 60-61).

Las drogas utilizadas en las últimas tres décadas, Nitrofurán (Nifurtimox) y Nitroimidazole (Benzonidazol) para el tratamiento en pacientes chagásicos, son potencialmente tóxicas por sus compuestos heterocíclicos, los cuales deben ser administrados en bajas cantidades, aunque producen un alto rango de cura en la fase aguda y un pequeño porcentaje en la fase crónica. Debido a esto se quiere introducir nuevos compuestos farmacéuticos con estrategias alternativas (62).

Brener y colaboradores, realizaron estudios con el ketoconazol, que es una droga antifúngica, de la que demostraron la actividad en infecciones experimentales de *T. cruzi* y confirmaron el efecto de la droga y el rango de actividad con diferentes cepas de *T. cruzi* resistentes o susceptibles a ambas drogas Nifurtimox y Benzonidazol. El resultado obtenido fue que la administración de ketoconazol en pacientes chagásicos en fase crónica en dosis utilizadas en el tratamiento de micosis profundas induce la cura demostrada por exámenes serológicos y parasitológicos (62).

12. Pronóstico

En la fase aguda, sólo el 10 por ciento de los pacientes mueren por miocarditis o meningoencefalitis (niños menores de 1 año). La fase indeterminada puede durar toda la vida. La cardiomiopatía comienza entre los 20 y 50 años de edad y la insuficiencia cardíaca en estas edades produce la muerte de uno a cinco años después de su aparición inicial (10).

Múltiples pruebas indican que si se trata a los pacientes con enfermedad de Chagas con Nifurtimox o Benznidazol, disminuye la posibilidad de una futura afección crónica. Aunque no hay acuerdo general en cuanto a la posibilidad de que el tratamiento farmacológico de casos indeterminados, es decir, pacientes asintomáticos con serología positiva, evitara el desarrollo de la afección crónica posteriormente. Muchos que se tratan en la fase aguda nunca desarrollan anticuerpos a *T. cruzi* o solo de manera pasajera. Debido a esto, se supone que es posible eliminar los microorganismos y curar al paciente si se trata en la fase aguda. Sin embargo, no siempre se obtienen estos resultados con nifurtimox y al parecer las cepas del parásito de ciertas áreas geográficas (Brasil) responden menos al tratamiento que las de otros países (Argentina y Chile).

Los marcapasos cardíacos pueden prolongar la supervivencia en casos de bloqueo cardíaco completo. La insuficiencia congestiva de la cardiomiopatía chagásica es desalentadoramente resistente a los medicamentos cardiotrópicos usuales.

Existen varias opciones para la atención y tratamiento de la afección mega. En las etapas iniciales del megaesófago, quizá es más eficaz la dilatación neumática del esfínter que el uso de bujías. En casos más avanzados se requiere diversos procedimientos quirúrgicos como miotomía o resección parcial del esfínter. Las etapas iniciales de megacolon se tratan con dietas y laxantes y en ocasiones enemas. A veces en los casos más graves puede researse una sección aperistáltica del colon (63).

IV. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase aguda es difícil debido a los bajos niveles de parasitemia. Igualmente, la detección del parásito en la fase crónica requiere la utilización de métodos biológicos, como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, debido a que los niveles de parasitemia son mucho más bajos que en la fase aguda.

Debido a esto, se ha hecho necesaria la búsqueda de técnicas más sensibles que permitan realizar un mejor diagnóstico. Entre estas técnicas se encuentra la búsqueda de antígenos, fracciones antigénicas o del ADN del parásito en fluidos corporales, como la demostración del ADN de *T. cruzi* en sangre completa y suero, a través de la técnica de PCR la que ofrece varias ventajas como alta sensibilidad y especificidad de resultados.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores S35 - S36 lo que permitió la demostración de pequeñas cantidades de ADN del parásito en sangre completa y realizar más oportunamente el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes tanto en fase crónica como aguda. De esta manera, en un futuro se podrá dar una mayor información al médico, para que la administración del tratamiento específico sea antes de que la enfermedad progrese y el daño sea mayor.

Al estandarizar la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Citohistología, se puede disponer de una nueva metodología confirmatoria para el servicio de diagnóstico de la enfermedad de Chagas que ofrece el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR) y el departamento de Citohistología.

V. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como un método de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en el departamento de Citohistología.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* en sangre de pacientes chagásicos, por medio de los cebadores S35 y S36.
- Comparar los resultados obtenidos con la técnica de PCR con los obtenidos por métodos serológicos.
- Establecer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una metodología confirmatoria, y un servicio de referencia que para el diagnóstico de Chagas brinda el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR).

VI. Materiales y Métodos

5.1. Universo de Trabajo

Diferentes metodologías para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

5.1.1. Muestra

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serología (aglutinación con partículas de latex, aglutinación con partículas de gelatina GPAT e inmunodifusión directa IDD).

5.2. Recursos

5.2.1. Recursos Humanos:

Investigadora: Julia Elisa Antonieta Machuca Hernández

Asesoras: Licda. María Eugenia Paredes Sánchez y

Licda. Vivian L. Matta de García

Colaboradores: Dr. Julio Cesar Argueta (M.S.P.A.S.)

Dr. Carlos Mendoza (Universidad del Valle de Guatemala)

Dra. Claude Pirmes (FIOCRUZ, Brasil)

5.2.2. Institucionales

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Departamento de Citohistología

Asociación Internacional de Energía Atómica

5.2.3. Materiales

5.2.3.1 Equipo:

Estufa

Baño de María

Termociclador PTC-100™ Peltier-Effect Cyclin MJ Reserch Reserch
INC. Programmable Thermal Controller

Equipo horizontal para electroforesis

Accesorios para electroforesis

- Placas de vidrio

- Peines

- Micropipetas graduadas

- Tips de punta larga

Fuente de poder

Fuente de luz ultravioleta

Cámara fotográfica

Centrífuga para eppendorf Biofuge Heraeus Step Sept Tech

Centrífuga refrigerada para eppendorf

Baño de agua con agitación

Bloque térmico a temperatura baja

Bloque térmico a temperatura alta

Campana para PCR MJ Reserch INC.

Refrigeradora a 4°C

Refrigeradora a -70°C

Refrigeradora a -20°C

5.2.3.2 Reactivos

Solución de Guanidina-HCl 6M, 200 mM EDTA

Fenol-cloroformo

Cloroformo

Agua desionizada

Taq polimerasa (Sigma, Perkin Elmer, del Kit de FIOCRUZ, una producida en la Universidad de Loyola y una producida por la Dra. Dorn de la Universidad de Loyola en el Depto. de Biología de la Facultad de CCQQ y Farmacia.).

MgCl₂ 25 mM

Cebadores S35 y S36

dNTP's

BSA

Buffer para PCR

Buffer TBE 1X

Bromuro de etidio

Acetato de sodio 3M

Etanol al 80%

Agarosa

Escalera de peso molecular de ADN

5.2.3.3 Cristalería

Tubos vacutainer con EDTA

Probetas de 100ml, 500ml y 1000ml

Erlenmeyers de 500ml y 1000ml

Beakers de 25ml, 100ml, 500ml y 1000ml

Pipetas de 5ml y 10ml

Pipetas pasteur

5.2.4. Procedimiento de la Estandarización

Para la estandarización del método se prepararon muestras de sangre con diferentes concentraciones de parásitos de la cepa H17 (Tabla No.1), a manera de curva de calibración para garantizar que cada uno de los pasos del procedimiento estuviera funcionando bien.

Tabla No. 1

Concentración de parásitos en diferentes diluciones de la curva de calibración.

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN (parásitos / ml)
1:10	1.15×10^8
1:100	1.15×10^7
1:1000	1.15×10^6
$1:10^3$	1.15×10^5
$1:10^4$	1.15×10^4
$1:10^5$	1.15×10^3
$1:10^6$	115
$1:10^7$	11.5
$1:10^8$	0.115

5.2.4.1. Extracción del ADN

- Se colectaron 5 ml de sangre por punción venosa y se transfirieron a un tubo de polipropileno, conteniendo igual volumen de solución de guanidina HCl/EDTA. Se agitaron los tubos, se sumergieron parcialmente en agua y se hirvieron durante 15 minutos.
- A 100µl de sangre se agregó igual volumen de fenol-cloroformo, se mezcló y centrifugó por 3 minutos a 12 gravedades.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo rotulado.
- Se agregaron 150ul de agua tridestilada estéril al tubo que contenía el precipitado, se mezcló, centrifugó y transfirió el sobrenadante al mismo tubo rotulado.
- Al tubo conteniendo el sobrenadante acuoso, se le agregó un volumen de 150µl de cloroformo, se mezcló, centrifugó y pasó el sobrenadante a otro tubo.
- Se midió cuidadosamente el total de sobrenadante y se agregó acetato de sodio 3M formando una dilución 1:10 y posteriormente se agregó el doble del volúmenes de etanol, para precipitar el ADN.
- Para la precipitación se probaron dos métodos, durante 15 minutos a -20°C y

- también durante toda la noche a -20°C , posteriormente se centrifugó 15 minutos a 1200rpm en frío o 60 minutos a temperatura ambiente.
- h. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1ml de etanol 70°GL, se centrifugó por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el botón en un bloque caliente a 70°C por 5 minutos.
 - i. Se resuspendió el ADN en 50ul de agua desionizada y se almacenó a -20°C

5.2.4.2 Extracción Comercial con el Kit de Wako:

- a. Se agregó 0.5ml de sangre con EDTA- Na_2 (anticoagulante), dentro de un tubo eppendorf de 1.5ml y se mantuvo en hielo.
- b. Se agregó 0.5ml de solución de lisis, se invirtió el tubo varias veces para mezclar la solución.
- c. Se centrifugó a 10,000 gravedades, 20 segundos a 4°C , cuidadosamente se removió el sobrenadante, manteniendo intacto el precipitado rojo oscuro.
- d. Se agregó 1ml de solución de lisis al tubo y mezcló 30 segundos a una velocidad moderada.
- e. Se centrifugó a 10,000g por 20 seg. a 4°C y posteriormente se removió el sobrenadante del tubo.
- f. Se repitió la operación "d" y "e"
- g. Se suspendió el precipitado en 200ul de solución de reacción enzimática. Se agregó 10ul de solución de proteasa y mezcló por inversión.
- h. Se incubó a 37°C por 1 hora. (durante la incubación, se mezcló la solución varias veces por inversión).
- i. Se agregó 0.3ml de solución de NaI y mezcló bien por inversión.
- j. Se agregó 0.5 ml de alcohol isopropílico hasta que apareció un material blancuzco (DNA).
- k. Se centrifugó a 10,000g por 10 minutos a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y colocó el tubo boca abajo para remover el sobrenadante que había quedado.
- l. Se lavó el precipitado en el tubo con 1ml de solución de lavado(A), se centrifugó a

- 10,000g por 5 minutos, luego se mezcló el tubo hasta que el precipitado se desprendió de la pared del tubo.
- m. Se repitió la operación del inciso "l" utilizando solución de lavado (B) en lugar de la solución de lavado (A).
- n. El precipitado se secó al vacío por 3 minutos (el ADN no debe secarse completamente debido a que es difícil disolverlo).

5.2.4.3 Amplificación del ADN Extraído:

A. Condiciones del Termociclador

Se ensayaron diferentes temperaturas y ciclos, tomando como base un esquema utilizado en la mayoría de artículos consultados, el cual se fue cambiando conforme se fue estandarizando el método, por otros programas utilizados en diferentes laboratorios.

Programa inicial, el cual es utilizado en la mayoría de laboratorios en los que se realiza PCR para la enfermedad de Chagas.

1.	1 ciclo	94°C	1 minuto
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		55°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa utilizado en el instituto FIOCRUZ (Brasil).

1.	2 ciclos	98°C	1 minuto
		64°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		64°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa recomendado en los insertos de la casa comercial Sigma, el cual difiere del programa inicial en que en el paso de desnaturalización, lleva el doble del tiempo.

1.	1 ciclo	94°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		55°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

Programa utilizado por la Universidad de Loyola

1.	1 ciclo	94°C	2 minutos
2.	33 ciclos	94°C	1 minuto
		60°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	10 minutos

B. Reactivos

Se iniciaron los experimentos con un volumen de 50ul, debido a que la máquina que se utilizó tiene capacidad para tubos de 60ul, pero durante la estandarización se determinó que funciona bien un volumen menor, por lo que se disminuyó el volumen de todos los reactivos a la mitad es decir que el volumen total de reacción fue de 25ul, lo que permitió economizar reactivos. Se agregaron las muestras en tubos adecuados conteniendo los siguientes reactivos que forman la mezcla maestra para PCR: Buffer 10X, dNTPs, cebadores (S35 y S36), Taq polimerasa, Agua.

El buffer de la enzima normalmente contiene cierta cantidad de magnesio estandarizada para cada lote de enzima; si el buffer no indica que contiene magnesio (como en el caso de la de la casa comercial Perkin Elmer) se debe estandarizar la cantidad a agregar.

B1. Cebadores

- a. Para mejorar el rendimiento de los reactivos se experimentó la actividad de los cebadores en volúmenes de 0.5 y 1 μ l.
- b. Se adicionó al método de PCR la técnica de "Hot Start", para la cual se formaron perlas de parafina en la campana de flujo laminar del Departamento de Citohistología, las cuales además fueron autoclaveadas para poderlas utilizar en el mezcla maestra. Se dividió la mezcla maestra en dos partes (Tabla No.2), se agregó la bolita de parafina en el eppendorf, encima de la mezcla maestra 1 (MM1) y se calentó a 80°C por 5 minutos en el termociclador para que la parafina se fundiera, luego se enfrió a 4°C por 5 minutos para que se formara una tapa, posteriormente se sacó del termociclador se agregó la mezcla maestra 2 (MM2) y se pusieron los eppendorfs de nuevo en el termociclador para que la tapa de parafina se derritiera y se mezclara el master mix 1 con el 2 y la hibridización se diera a la temperatura optima y no antes. A los tubos con "hot start" se les agregó solo una gota de aceite, para que la parafina no quede muy suave a diferencia de los que no tienen hot start, a los que se les adiciona dos gotas de aceite mineral para evitar evaporación de reactivos debido a las altas temperaturas.

Tabla No. 2

Mezcla maestra para PCR utilizando "Hot Start" en el que se utilizan mezcla maestra 1 (MM1) y mezcla maestra 2 (MM2).

REACTIVOS	MM1 X 1 tubo	MM2 X 1 tubo
Buffer	2.5	2.5
25mM MgCl ₂	9	0
2mM dNTPs	5	0
S35	1	0
S36	1	0
Taq	0	0.5
Agua	4.5	19

Se realizaron ensayos con reactivos de distintas casas comerciales, para evaluar especificidad y sensibilidad de éstos y así obtener mejores resultados.

B2. Taq Polimerasa

Para estandarizar la concentración de Taq que debía agregarse por volumen de reacción se realizaron varios experimentos como la comparación de 5 tipos de Taq (Sigma, Perkin Elmer, una donada por el Departamento de Biología la cual fue preparada en el Instituto Loyola, una preparada por la Dra. Patricia Dorn del Instituto Loyola en el Departamento de Biología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y una del Kit de FIOCRUZ), de las cuales se probaron lotes diferentes.

Además se experimentó con diferentes concentraciones de estas desde 1 Unidad hasta 5 Unidades. Se corrió PCR con reactivos de diferentes casas comerciales (Sigma, Perkin Elmer y el Kit de FIOCRUZ) para definir cuales daban mejores resultados, además de probar diferentes concentraciones de cada uno.

Para descartar la posibilidad de que los cebadores de *T. cruzi* interfirieran con el buen funcionamiento de la Taq polimerasa y que debido a esto no obtuviéramos bandas, se realizaron experimentos en los que se probó con ADN extraído de sangre infectada con *Leishmania mexicana* en diluciones de 1:10 y 1:100 con cebadores específicos para *Leishmania* (HM1, HM2, HM3), y así observar si con éstos teníamos el mismo problema.

Una de las Taq fue donada por el Departamento de Biología, pero debido a que se desconocía la concentración, se evaluaron diferentes volúmenes (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0ul), además de ser evaluada también para *Leishmania* y de realizar la extracción de ADN por dos métodos, un Kit comercial y el método convencional de guanidina.

La Taq polimerasa preparada en el departamento de Biología con la metodología de la Dra. Dorn, fue evaluada para determinar su actividad en diferentes volúmenes (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0ul), y debido a que no había un buffer específico para ésta Taq se probó con el buffer de Brasil, buffer de Sigma y buffer ajustado a la concentración que poseía el de

Brasil (3.5uM MgCl₂), para ver con cual se obtenia mejores resultados. Las cinco Taq fueron probadas también, con y sin "Hot Start".

B3. MgCl₂

Para cada lote de Taq se utilizaron buffers con diferentes concentraciones de MgCl₂ que variaron de 1.5mM hasta 4.5mM de MgCl₂.

B4. dNTPs

Se realizaron varios experimentos en los que se evaluaron dNTPs Perkin Elmer en unión con los reactivos de Sigma y el Kit de FIOCRUZ; los dNTPs debían poseer un pH de 7.

C. Curva

Posteriormente se realizó la curva de parásitos con la Taq producida en el departamento de Biología, ya que ésta fue una de las que mejores resultados proporcionó, y la concentración de la polimerasa fue de 1ul de reactivo / 25ul de reacción.

D. Procesamiento de las Muestras

Con la técnica de PCR ya estandarizada se comenzó a evaluar las muestras positivas de pacientes provenientes de área endémica (Zacapa y Santa María Ixhuatán), y las muestras negativas de pacientes provenientes de área no endémica (Sololá). Estas se relacionaron con la serología, pero debido a contaminación se suspendió esto hasta encontrar la fuente de la misma.

Se esterilizó todo el equipo con cloro y luz Ultra Violeta, desde los tips, pipetas, etc. hasta el termociclador; además toda el área del laboratorio fue lavada con cloro. Se extrajo nuevo ADN de las muestras y se le realizó también el procedimiento de extracción de ADN a la Guanidina, debido a que se pensó que la guanidina era la que podía haber estado contaminada, y se realizó PCR para cerciorarnos. Además se extrajo ADN de las muestras con un nuevo acetato de sodio. Y se comenzó a realizar PCR solo con controles, cambiando reactivo por reactivo, hasta que se encontró la causa de la contaminación.

Luego de eliminar la contaminación y las bandas inespecíficas, para determinar si había algún problema en la extracción de ADN se probó extraerlo por medio del Kit de Wako y simultáneamente por el método experimental de Guanidina. Se trabajó con una muestra conocida de sangre infectada con 500ul de epimastigotes de *T. cruzi* lavados y suspendidos en PBS. Luego se realizó PCR de los ADN extraídos para observar cual daba mejores resultados.

5.2.4.4 Electroforesis:

- a. Se preparó un gel de agarosa de 1.5 por ciento (electroforesis horizontal) con el número de pozos (9 ó 17 pozos) de acuerdo al número de muestras que se utilizaron, para una gel pequeña se agregó al molde 18 ml de agarosa y para una gel grande 30 ml para que el mismo no fuera muy grueso y las bandas corrieran más rápido y se observaran mejor. Se utilizó un marcador (escalera de peso molecular de ADN de 100 pb) y de este se agregó 1ul con 1ul de buffer de carga y 9ul de agua.
- b. Se mezclaron las muestras con una solución (buffer de carga) compuesta por 30 por ciento de glicerol, 0.25 por ciento de azul de bromofenol y 0.25 por ciento de xilencianol en una proporción de 1ul para cada 10ul de muestra. Se probó también en proporciones de 0.5ul de buffer de carga por 5ul de muestra y 1.5ul de buffer de carga por 15ul de muestra para observar con que volumen nos da un mejor resultado.
- c. Se corrieron las muestras por aproximadamente 2 horas a 50V o 35 minutos a 100V.

5.2.4.5 Revelado:

- a. Se colocó el gel en una solución conteniendo 5ug/ul de bromuro de etidio diluido en buffer TBE, durante 15 minutos y luego se decoloró por 15 minutos más en agua destilada.
- b. Se observó por transiluminación UV y se fotografió (8 minutos y 4.5 de amplitud).

5.2.4.6 Interpretación:

La observación de una banda de 330pb de longitud, indicó la presencia de kADN de *T. cruzi*, y consecuentemente resultado positivo para el PCR.

5.2.4.7 Aglutinación con partículas de látex

El método es una técnica basada en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia con antígenos de *T. cruzi*. Se mezclaron 3ul de reactivo con 3ul de plasma en una placa, se colocaron en un rotor y se leyó el resultado a los 5 minutos. Si se observó aglutinación el resultado fue positivo, de no observarse la misma, el resultado se consideró negativo.

5.2.4.8 Aglutinación con Partículas de Gelatina (GPAT), Fujirebio

El método es una técnica comercial basada en la aglutinación de partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos de *T. cruzi*.

Se efectuó en placas en forma de U llevando a cabo primero un tamizaje, y si la muestra presentó un tamizaje positivo se tituló. Para el tamizaje en el pozo número uno de la placa se colocaron 175ul de diluyente de muestra, 25ul de suero o plasma para obtener una dilución 1:8. Previamente las partículas sensibilizadas se reconstituyeron con la solución diluyente y se dejaron reposar al menos 30 minutos. Luego se mezclaron las partículas sensibilizadas, se agregaron a cada pozo 25ul de partículas de gelatina, se mezcló, se tapó con papel adhesivo para placas y se dejó reposar a temperatura ambiente por dos horas. Se tomaron positivas las muestras que presentaron aglutinación en un título igual o mayor a 1:32, si no se observó aglutinación el resultado se consideró negativo.

5.2.4.9 Inmuno difusión directa (IDD)

Se prepararon las láminas de agar con azida de sodio y PBS dispensando en cada una de ellas aproximadamente 5ml de la mezcla. Se perforaron los agujeros utilizando como guía una hoja de papel milimetrado preparada para el efecto. Se centrifugó a 3000rpm por 5min el antígeno de *T. cruzi* y cada uno de los sueros evaluados. Se colocaron cuidadosamente 10ul del antígeno en el pozo central y 10ul de cada suero en los pozos externos teniendo cuidado de no estropear el agar y no rebasar los pozos. Incubar en cámara húmeda de 48 a 72 horas a temperatura ambiente.

Se colocó cada una de las láminas en un recipiente que contenía NaCl al 0.85% para desproteinizarlas (remover cualquier proteína sérica que no sea complejo antígeno anticuerpo) durante 24 horas con agitación constante, se colocó un pedazo de papel filtro humedecido con la solución anterior sobre cada una de las láminas y se secaron con aire caliente completamente.

Se separó el papel de la lámina con cuidado de no romper el agar, se coloreó por una o dos horas con azul de Coomasie y se destiñó con cuidado de no perder las bandas de precipitación teñidas, se secaron al aire y se montaron de nuevo en la lámina. Las muestras que presentan bandas de precipitación se consideraron positivas.

5.3. Análisis de Investigación

5.3.1. Diseño Estadístico

Se empleó un nivel de investigación de tipo descriptivo usando una escala binomial de medida.

5.3.4. Análisis de Datos

- a. Los resultados se obtuvieron como respuesta binomial y de estos se analizó la concordancia PCR – serología por medio del índice de Kappa.

VII. RESULTADOS

Para la estandarización de la técnica se realizó una serie de experimentos hasta obtener los mejores resultados positivos.

La extracción de ADN se realizó por dos diferentes métodos, uno en el que se dejó precipitar el ADN toda la noche y luego se centrifugó en frío y el otro donde se dejó precipitar 30 minutos y se centrifugó a temperatura ambiente. Se observó que precipitando durante toda la noche se obtienen mejores resultados.

Para que el precipitado de ADN se seque más rápido y sin el peligro de que se dañe debido a periodos muy largos a alta temperatura, se le agregó 1ml de etanol a 70° GL se centrifugó durante 3 minutos, luego se decantó el etanol y se colocó en el bloque caliente a 70°C por aproximadamente 3 a 5 minutos.

Se extrajo el ADN por dos métodos diferentes, el método convencional de guanidina y el del kit comercial de Wako, y al comparar por PCR se observó que las bandas que se obtuvieron fueron de la misma intensidad y peso molecular.

En la estandarización de la amplificación del ADN, se utilizaron cuatro métodos: el programa inicial, el utilizado en FIOCRUZ (Brasil), el de la casa comercial SIGMA y el utilizado por la Dra. Patricia Dorn de la Universidad de Loyola, USA. Se encontró que el programa del termociclador que mejor funcionó fue el recomendado por la Dra. Patricia Dorn (Tabla No. 3), y que con la Taq polimerasa producida por la misma Universidad también se obtuvo un buen resultado.

Tabla No.3
Programa para termociclador utilizado por la Dra. Dorn de la Universidad de
Loyola, USA

CICLOS	TEMPERATURAS °C	TIEMPO (min.)
1	94	2
33	94	1
	60	1
	72	1
1	72	10

Se determinó que el volumen de cebadores que debía utilizarse era de 0.5ul de cada uno, por 25ul de volumen total de reacción, ya que con un volumen menor no se detectaban bandas cuando la concentración de ADN era baja (Tabla No.4).

Tabla No. 4
Comparación entre la intensidad de las bandas al utilizar dos diferentes volúmenes de cebadores con dos diferentes concentraciones de ADN en controles positivos.

Controles Positivos	Volúmenes de Cebadores (ul)	
	0.5	0.25
Control positivo 1:1	+++	+
Control positivo 1:6	++	-

Al comparar la eficiencia de diferentes Taq polimerasa se obtuvieron resultados positivos con una de las Taq polimerasa comerciales (Sigma) con concentración de 1 Unidad y un volumen de 0.25ul por volumen total de reacción de 25ul, además de una

concentración de 4.5mM de $MgCl_2$. Otra Taq polimerasa con la que se obtuvieron buenos resultados fue la producida por la Dra. Patricia Dorn en el Departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, la cual dió resultados positivos al utilizarse 1.5ul de ésta por 25ul de volumen total de reacción, en unión con un buffer elaborado en FIOCRUZ (Brasil), que posee una concentración de 3.5uM de $MgCl_2$. Para esta Taq polimerasa se experimentó con volúmenes de 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 pero las bandas no fueron claras en estas concentraciones.

Con la Taq polimerasa de Perkin Elmer no se pudo obtener resultados positivos, aun aumentando o disminuyendo la concentración de $MgCl_2$. Se realizaron experimentos para probar la actividad de dNTPs, de la misma casa comercial obteniendo buenos resultados tanto con los reactivos del kit de FIOCRUZ (Brasil) como con el de Sigma.

Para descartar la posibilidad de que los cebadores de *T. cruzi* interfirieran con el buen funcionamiento de la Taq polimerasa y que debido a esto no se obtuvieran bandas se realizó un ensayo en el que se probó la Taq polimerasa con ADN extraído de sangre infectada con *Leishmania mexicana* en diluciones de 1:10 y 1:100 y cebadores específicos para *Leishmania* (HM1, HM2, HM3), pero con estos tampoco se obtuvieron bandas.

Posteriormente se realizó un experimento para probar la Taq polimerasa que fue donada por el departamento de Biología de la Facultad de CC.QQ. y Farmacia, y como no se conocía la concentración ni la actividad que ésta poseía, se utilizaron diferentes volúmenes de ésta (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0ul) pero no se obtuvieron bandas. Esta misma Taq polimerasa se utilizó con muestras de *Leishmania* y muestras de ADN extraído de pacientes por medio del Kit comercial y con Guanidina, pero no se obtuvieron resultados positivos con ninguno de los cambios que se realizaron.

Las cinco Taq polimerasa fueron probadas también utilizando "Hot Start", método que se ha reportado produce bandas más claras y específicas (64), pero las únicas que dieron buenos resultados fueron las de Sigma y la de la Universidad de Loyola, ya que con las otras Taq polimerasa no se obtuvo bandas.

La curva de parásitos realizada con la cepa H17 determinó el número mínimo de parásitos que el PCR puede detectar, esta curva se realizó con y sin "Hot Start", encontrándose que el mínimo detectado es de 0.115 parásitos en una muestra de 5ml de sangre completa. Utilizando "Hot Start" en la elaboración de esta curva las bandas fueron más claras y sin tantas bandas inespecíficas (Tabla No. 5).

Tabla No. 5

Resultados obtenidos en la curva de calibración con y sin "Hot Start".

Dilución de parásitos	# de Parásitos	Con Hot Start	Sin Hot Start
1:10	1.15×10^8	++	-
1:100	1.15×10^7	++	-
1:1000	1.15×10^6	+++	+++
$1:10^3$	1.15×10^5	+++	+++
$1:10^4$	1.15×10^4	+++	+++
$1:10^5$	1.15×10^3	++	+++
$1:10^6$	115	++	+++
$1:10^7$	11.5	+	+++
$1:10^8$	0.115	+	++

En base a los resultados obtenidos se determinó que el protocolo a seguir fue el siguiente (Tabla No. 6)

Tabla No. 6

Mezcla maestra de PCR estandarizada a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia.

Reactivos	Concentraciones (ul)
Buffer 10X	2.5
dNTP's	4.0
S35	0.5
S36	0.5
Taq polimerasa	1.5
Agua	13.5

Teniendo la técnica estandarizada (Tabla No.3 y 6) se procesaron las muestras del área endémica (Zacapa), y de área no endémica (Sololá). Se obtuvo buenos resultados, ya que las muestras con serología positiva presentaron resultados positivos en PCR, bandas claras y de peso molecular esperado y las muestras con serología negativa fueron también negativas en PCR. Esto se tuvo que suspender debido a presencia de contaminación.

Eliminada la contaminación se inició nuevamente el proceso de las muestras de pacientes. La población evaluada para el estudio comprendió 40 muestras de sangre completa de personas distribuidas de la siguiente forma: 15 muestras de personas procedentes de área endémica (Zacapa), 15 muestras de personas procedentes de área no endémica (Sololá), y 10 muestras de personas procedentes de área endémica (Santa María Ixhuitán). Las muestras se sometieron a exámenes serológicos tanto como a PCR (Tabla No. 7, 8); para lo cual se extrajo 5ml de sangre heparinizada a cada persona, se tomó 1ml de plasma para la serología y el resto de la sangre completa se utilizó para extracción de ADN al que posteriormente se le realizó el PCR.

Las pruebas serológicas realizadas a los sueros fueron: aglutinación con partículas de gelatina, aglutinación con partículas de látex e inmunodifusión directa, las cuales fueron comparadas con PCR. Con los datos obtenidos se compararon ambas técnicas utilizando el

estadístico Kappa. Debido a que tanto la serología como el PCR de las muestras de Sololá fueron negativos no se incluye tabla de resultados.

Tabla No. 7

Resultados de PCR y serología de 15 muestras de pacientes de área endémica (Zacapa)

Muestra	PCR S35 y S36	PCR 121 y 122	Latex	IDD	GPAT
1	+	+	+	+	+ ≥1:256
2	+	+	+	+	+ ≥1:256
3	+	+	+	+	+ ≥1:256
4	+	+	+	+	+ ≥1:256
5	+	+	+	+	+ ≥1:256
6	+	+	+	+	+ ≥1:256
7	+	+	+	+	+ ≥1:256
8	+	+	+	+	+ ≥1:256
9	+	+	+	+	+ ≥1:256
10	+	+	+	+	+ ≥1:256
11	+	+	+	+	+ ≥1:256
12	+	+	+	+	+ ≥1:256
13	+	+	+	+	+ ≥1:256
14	+	+	+	+	+ ≥1:256
15	+	+	+	+	+ ≥1:256

IDD: Inmuno difusión directa. GPAT: Aglutinación con partículas de gelatina

Tabla No. 8

Resultados de PCR y serología de 10 muestras de pacientes de área endémica (Santa María Ixhuatan)

Muestra	PCR S35 y S36	PCR 121 y 122	Latex	IDD	GPAT
1	+	+	+	+	+ 1:128
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

IDD: Inmuno difusión directa. GPAT: Aglutinación con partículas de gelatina

Con los resultados obtenidos del área endémica de Zacapa el 100% de las muestras serológicamente positivas, fueron PCR positivo, con lo que se obtuvo un resultado de Kappa = 1. (Tabla No.9)

En el gel se pudo observar perfectamente las bandas de 330 pares de bases en los pozos del 6 al 13 y los controles positivo y negativo que se ponían en cada gel, además pueden observarse unas bandas adicionales de 100 y 700 pb las cuales son inespecíficas (Anexo No.1)

Puede observarse perfectamente que cuando hay contaminación los controles negativos también presentan banda. (Anexo No. 2) mientras que en uno donde no hay contaminación los controles se diferencian claramente (Anexo No. 3)

Tabla No. 9

Comparación de resultados de muestras de área endémica (Zacapa) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	15	0
	-	0	0

Con las muestras del área no endémica se observó una relación entre serología y PCR de 100%, ya que todas las muestras serológicamente negativas fueron negativas también para PCR, obteniendo como resultado un Kappa = 1. (Tabla No. 10)

Tabla No. 10

Comparación de resultados de muestras de área no endémica (Sololá) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	0	0
	-	0	15

Con las muestras de Santa María Ixhuatán se observó que una de las muestras serológicamente positivas presentó PCR positivo, 6 de las muestras con serología negativa

presentan también PCR negativo, pero 3 de las muestras con serología negativa presentaron resultados positivos para PCR, con estos resultados se obtuvo un Kappa = 0.286

(Tabla No. 11)

Tabla No. 11

Comparación de resultados de muestras de área endémica (Santa María Ixhuatán) obtenidos por medio de serología y PCR utilizando Kappa.

		SEROLOGIA	
		+	-
PCR	+	1	3
	-	0	6

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a que en Guatemala no se había utilizado previamente la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como herramienta diagnóstica para la enfermedad de Chagas, este trabajo consistió en estandarizar el método, para así lograr la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre completa de pacientes chagásicos, el cual se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Citohistología.

En la estandarización de la extracción de ADN se hicieron muy pocos cambios ya que el método convencional de Guanidina (2,59) utilizado en la mayoría de laboratorios que trabajan con PCR demostró ser bueno y acoplarse muy bien a las condiciones del laboratorio donde se trabajó, debe tenerse mucho cuidado que el fenol-cloroformo tenga un pH de 8 ya que si es más ácido se extrae ARN y no ADN que es el necesario para PCR. Además debe dejarse precipitar el ADN el tiempo necesario (toda la noche) a -20°C y centrifugarse al otro día en frío para que el botón obtenido sea mejor.

Se observó que para secar el precipitado conteniendo el ADN en menor tiempo era necesario decantar el sobrenadante donde se dejó precipitar, agregar en el tubo 1 ml de etanol 70° , centrifugarlo por 3 minutos, posteriormente decantar el etanol y secar en el bloque caliente a 70°C por aproximadamente 3 a 5 minutos. Al principio se omitía el paso del etanol 70° por lo que el secado en el bloque caliente tardaba demasiado y la dilución del ADN en el agua era difícil.

Se utilizaron varios programas en el termociclador de los cuales, uno se descartó por ser para tipificación de especies y se eligió para trabajar el utilizado por la Dra. Patricia Dorn de la Universidad de Loyola, el cual dió muy buenos resultados en unión con la Taq polimerasa producida con el método de la misma Universidad, los cuales se acoplaron muy bien a las condiciones que se tenían en el laboratorio.

En la estandarización de la amplificación del ADN se observó que la Taq polimerasa comercial (Taq Perkin Elmer), no dió resultados positivos al aumentarse ni disminuirse la

concentración de $MgCl_2$, además no funcionó en unión de ningún otro reactivo tales como Sigma ni los del Kit de FIOCRUZ (Brasil). Se probó además con "Hot Start" y no se obtuvieron bandas, por lo que se descartó de los reactivos utilizados en este trabajo.

Se observó que en el transporte de la enzima (Taq polimerasa) debe conservarse la cadena de frío, ya que una de las principales causas de los problemas encontrados se debió a que varias de las enzimas recibidas habían perdido su actividad.

El "Hot Start" es una técnica utilizada para obtener bandas más claras y sin presencia de bandas inespecíficas (64). Lo anterior pudo ser comprobado en la práctica pero se tuvo el inconveniente de que al momento de realizar la electroforesis los tips se taparon y el volumen que median las pipetas no fue siempre el mismo, por lo que se optó por no utilizarlo, ya que los resultados no fueron reproducibles.

Las muestras tanto del área de Zacapa como las de Sololá se comenzaron a procesar por PCR, obteniéndose buenos resultados reproducibles con la serología, pero esto se tuvo que suspender debido a presencia de contaminación. Las técnicas utilizadas para eliminar la contaminación (esterilización de todo el equipo con cloro y luz ultra violeta y probar reactivo por reactivo únicamente con controles) dieron buen resultado, ya que aunque no fue posible determinar el motivo exacto de la contaminación, ésta si fue eliminada.

Se corrieron las muestras de la población muestreada (40 muestras) tanto de las áreas endémicas (Zacapa y Santa María Ixhuatan), como del área no endémica (Sololá). Para considerarse como positivas serológicamente, las muestras debían ser positivas en dos de las tres pruebas que se utilizaron, las pruebas utilizadas fueron: aglutinación con partículas de látex, aglutinación con partículas de gelatina e inmunodifusión directa. De las 15 muestras de Zacapa, 15 (100 por ciento) fueron positivas para las pruebas serológicas, estas muestras también fueron corridas en PCR dando una correlación del 100 por ciento y un Kappa = 1 que es un resultado excelente.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las muestras del área no endémica de Sololá el 100 por ciento de las muestras serológicamente negativas, fueron también negativos para PCR, por lo que se obtuvo un resultado de Kappa = 1 que es un resultado excelente ya que la correlación entre las dos técnicas es del 100 por ciento.

Con los resultados del área endémica de Santa María Ixhuatán, los resultados fueron distintos ya que no se obtuvo ninguna muestra con serología positiva y PCR negativo y solo una de las muestras serológicamente positiva fue PCR positivo, 6 de las muestras con serología negativa fueron PCR negativo y 3 de las muestras con serología negativa presentaron resultados positivos para PCR. Con estos resultados se obtuvo un Kappa = 0.286

Con respecto a los tres casos de pacientes con serología negativa pero con PCR positivo, posiblemente hayan dado una reacción cruzada con alguna otra enfermedad parasitaria, además según la bibliografía, hay dos teorías que pueden explicar esto, la primera es que puede ser por una contaminación de ADN, la segunda es que estas personas viven en un área que es considerada como un área de transmisión activa para la enfermedad de Chagas, por lo que si la infección se adquirió recientemente, el tiempo necesario para montar una respuesta humoral detectable es de varios meses y durante este tiempo la serología siempre va a ser negativa (59).

IX. CONCLUSIONES

- La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue estandarizada en el departamento de Citohistología para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- En este estudio y en las condiciones estandarizadas la sensibilidad obtenida es de 0.115 parásitos en 5ml de sangre completa.
- El estudio demostró una sensibilidad en PCR mayor que la de serología.
- Una infección recientemente adquirida podrá ser demostrada más fácilmente por PCR ya que la respuesta humoral toma un tiempo para ser detectada por técnicas serológicas.
- Para establecer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una metodología confirmatoria, deben realizarse más estudios utilizando un área endémica de otras enfermedades parasitarias, en la que se estudien los falsos positivos con éstas.

X. RECOMENDACIONES

- Precipitar el ADN durante la noche y centrifugar en frío para obtener un mayor y mejor botón de ADN.
- Para secar el botón en menor tiempo, debe incluirse antes del secado un paso de precipitación con etanol 70°GL.
- Tratar en la medida de lo posible de producir en el laboratorio la Taq polimerasa para evitar su deterioro durante el transporte y reducir los gastos.
- Realizar más ensayos con la técnica de PCR, en una población mayor que permita detectar los falsos positivos con otras enfermedades parasitarias, antes de utilizar este método como referencia para confirmar el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.
- Estandarizar el uso de "Hot Start" para lograr mejores resultados.
- Incluir entre el certificado de salud de niños en edad escolar el examen serológico de Chagas, para poder diagnosticar la enfermedad en la fase aguda y así dar tratamiento oportuno, ya que en fase crónica la enfermedad no tiene cura.

GLOSARIO

- Amplificación: En PCR, es la replicación exponencial de un fragmento específico de ADN por ADN polimerasa, para producir múltiples copias.
- Buffer: Solución química que mantiene el pH de una solución. Un buffer de PCR es una formulación específica recomendada para una polimerasa particular para estabilizar el pH de la reacción durante la amplificación del ADN.
- Cebadores: Una pieza corta de ADN en forma de un oligonucleotido sintético que se hibridiza a la secuencia complementaria de ADN y es extendida por una polimerasa.
- Control: Una muestra conocida incluida en todas las amplificaciones, para verificar las condiciones de reacción.
- Ciclo: Durante la amplificación del PCR, cada ciclo consiste de una serie de tres diferentes temperaturas, en los cuales los ingredientes de la reacción sufren distintos procesos físicos y bioquímicos (desnaturalización, anillamiento y extensión), resultando en la replicación exponencial de una tarjeta molecular.
- ADN: Acido desoxirribonucleico. Formado por dos fragmentos complementarios de ADN que forman la doble hélice.
- dNTP(s): Desoxinucleotido trifosfato(s). Es el segmento de unión del ADN replicado durante el PCR.
- Electroforesis: La migración de partículas cargadas sobre una matriz con campo eléctrico. Este método es utilizado para separar fragmentos cargados negativamente de ADN de acuerdo a su tamaño. Los fragmentos más pequeños migran más rápidamente hacia el polo positivo que los fragmentos largos.
- Especificidad: La capacidad de identificar algo o los caracteres y particularidades peculiares del objeto de interés.
- Extracción: Tratamiento de una muestra con un solvente orgánico, para obtener ácido nucleico de variada purificación, dependiendo del método utilizado.
- Genoma: La base de información genética, guardada en el cromosoma de un organismo.
- Hot start: Es un método comúnmente utilizado para obtener especificidad en la reacción de PCR, en la que todos los reactivos interaccionen productivamente hasta después del primer paso de desnaturalización a aproximadamente 94°C.

- Hybridización: El segundo paso en el ciclo de amplificación, en el cual, a una temperatura particular, dos hebras simples de ADN complementario, se hibridizan para formar una doble hélice.
- Oligonucleotido: Una corta pieza sintética de ADN.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Un procedimiento patentado de amplificación exponencial de una pieza de ADN de un tamaño y secuencia específico.
- Plasma: Un fluido límpido obtenido por centrifugación de sangre no coagulada.
- Suero: Un fluido límpido obtenido por centrifugación de sangre coagulada.
- Sensibilidad: Capacidad de un examen diagnóstico de identificar como positivo aquello que posea la enfermedad de interés.
- Taq polimerasa: Enzima termoestable, originalmente aislada de una bacteria *Thermus aquaticus*, que es utilizada en la replicación de ADN en el PCR.
- Termociclador: Aparato programable para amplificación facilitada, con ciclos de temperatura automática.
- Transiluminación UV: Detección de ácido nucleico marcado, con un compuesto como el bromuro de etidio, que fluoresce bajo radiación ultravioleta.

Referencias

1. Marsden ER, *et al.* The transmission of *Trypanosoma cruzi*. Infection to man and its control. Doc. Tec. pp : 1-50
2. Avila H, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31: 2421-2426.
3. Segura EL. Xenodiagnosis; Chagas' disease vector. USA: CRC Press, Inc., Vol. 2, 1991. 99p. (p. 41-45).
4. Manson-Bahr P, Bell DR. Manson's tropical diseases. London: Bailliere Tindal, 1987. 120p. (p.74-86).
5. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. Transfusion. Journal of Medicine. 1991;31:547-557.
6. Aguilar FJ. Parasitología Médica. 2 ed. Guatemala: Litografía Delgado S.A., 1991. 363p. (p. 250-261).
7. Macedo V. Cecil Textbook of Medicine; Chagas' disease "American Trypanosomiasis". Philadelphia: WB Saunders, 1982. 2000p. (p. 1728-1731).
8. Atias A, Meghme E. Parasitología Clínica. 3 ed. Santiago, Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., 1991. 618p.
9. Rowen A, *et al.* Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Boletín Organización Mundial de la Salud, 1974;50:459-492.
10. Morales RE. Estudio Clínico-Serológico de la Enfermedad de Chagas en Donadores de Banco de Sangre del Hospital Nacional de Chiquimula. Guatemala: USAC, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1992. 49p.
11. Zeledón R, Rabinoch JE. Chagas' Disease; An Ecological Appraisal with Special Emphasis on Insects Vectors. An Rev Entomol 1989;26:101-337.
12. Minter DM. Effects on Transmission to man of the Presence of Domestic Animal in Infected Households. USA: PAHO Sci. Public., 1989. 318p.
13. Zeledón R. Los vectores de la Enfermedad de Chagas. Simposio Internacional sobre

- Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Parasitología, 1972. 400p. (p. 327-345).
14. Lent H, Wygodzinky L. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' Disease. Bull Am Mus Nat Hist 1989;163:125-520.
 15. Aguilera X, *et al.* Epidemiology of Chagas disease in northern Chile. Isoenzyme profile of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvan transmission cycle and their association with cardiopan J Trop Med Hyg 1990;37:302-307.
 16. Aguilar FJ. Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala 1932-1990. Ogata K. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 93': Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe anual # 2. Guatemala: Misión Japonesa. Doc. Tec. 1993. VIII+150p.
 17. Matta VL. Enfermedad de Chagas en Guatemala: Prevalencia y Transmisión. Rev Cientif 1993;9.1:2-6
 18. Peñalver LM. Estado Actual de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev. Col. Med. Guatemala 1953;4:294-308
 19. Matta VL, *et al.* Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. San José: VII Congreso Centroamericano y II Nacional de Microbiología. Memorias. 1985. 203p.
 20. Matta VL. La Enfermedad de Chagas en Guatemala. Guatemala: III Congreso Nacional de Microbiología. Memorias. 1986. 127-132p.
 21. Matta VL, *et al.* Transmisión Congénita y Evolución Fisiopatológica de la Enfermedad de Chagas. Chiquimula, Guatemala: DIGI. 1991. 54p.
 22. Matta VL, *et al.* Avances en el Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Tabaru Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 94': Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe Anual # 3. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1994. VIII+207p.
 23. Paz M, *et al.* Valor Predictivo de las Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabaru Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 94': Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe anual # 3. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1994. VIII+207p.

24. Matta VL, *et al.* La Enfermedad de Chagas: Un Enfoque Integral. Guatemala: DIGI. 1995. 115p.
25. Loarca M, *et al.* Infección por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre en doce hospitales de Chile. Bol of Sanit Panam 1989;95:321-326.
26. Arribada A, Aguilera X, Sandoval J. Chagas cardiopathy and *Trypanosoma cruzi* zimodemes in Chile. Bull Pan Am Health Organ. 1988;21:358-368.
27. Arribada A, Apt W. Cardiopatías parasitarias. Santiago, Chile: Ediciones de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina Sur 1990. 250p.
28. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Clinical Parasitology. 9 ed. England: Lea & Febiger, 1986. 798p.
29. Goldsmisth RS, Heyneman D, eds. Tropical Medicine and Parasitology. England: Appleton & Lange, 1995. 420p.
30. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7 ed. USA: Sauders, 1992. 850p.
31. Tanowitz HB, *et al.* Chagas' disease. Clin Microbiol Rev 1992;5:400
32. Broks GF, Butel JS, Ornston LN. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15 ed. México: Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V., 1996. X+807p.
33. Reyes MB, *et al.* Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc Nalt Acad Sci USA 1990;87:2846-2850.
34. McKerrow J, Heyneman D. Parasitic Disease. In: Basic & Clinical Immunology. 8 ed. England: Stites Dt, Terr AL, Parslow TG. Eds., Appleton & Lange, 1994. 300p.
35. Brener Z, Krettli A. Immunology of Chagas' Disease. USA: Sauders, 1987. 360p.
36. Garcia LS, Buckner DA. Diagnosis Medical Parasitology. 2 ed. USA: American Society for Microbiology, 1993. 890p.
37. Gutierrez Y, Little MD, eds. Diagnosis of Important Parasitic Disease. Clin Lab Med 1991;11:811
38. Juárez S, *et al.* Método de Inmunodifusión Doble en el Serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabura Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 95': Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Informe Anual # 4. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1995. IV+215p.
39. Packchanian A. Agglutination and Precipitation test for diagnosis of *Trypanosoma*

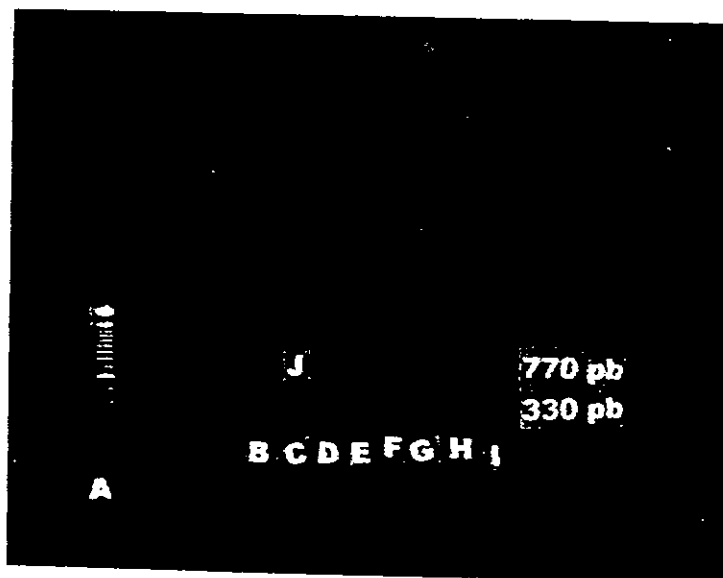
- cruzi* infection (Chagas Disease). J Immunol 1935;29:84-85.
40. Requejo H, *et al.* Diffusion in gel enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for Chagas' disease serodiagnosis. Brazilian J Med Biol Res 1991;24:471-483.
 41. Nilsson LA, Voller A. A Comparison of thin layer immunoassay (TLA) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *T. cruzi*. Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene. 1982;76:95-97
 42. De León MP, *et al.* La Eficiencia del Método de Concentración de Capilar en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Tabara Y. Ed. Enfermedades Tropicales de Guatemala 95': Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe Anual # 4. Guatemala: Misión Japonesa, Doc. Tec. 1995. IV+215p.
 43. Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. OMS, Trad. Ginebra: OMS, Doc Tec. No. 811, 1991. VI+102p.
 44. Chiari E, Parasitological diagnosis of Chagas' Disease. (p.153-64). [In Wendel S., *et al.* Chagas' Disease (American Tripanosomiasis); its impact of transfusion and Clinical Medicine. Brasil: International Society of Blood transfusion, 1992. X+270p.
 45. Saiki RK, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of ADN with a thermostable ADN polimerase. Science 1988;239:487-491
 46. Martinez SJP, *et al.* Detección de Abortos por *Brucella* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica Difusión Internacional. 1993;18:10-16
 47. Rolfs A, *et al.* PCR: Clinical Diagnostics and Resarch. Germany: Springer Laboratory. 1992. XIX+271 p.
 48. Gelfand DH, White TJ. Thermostable DNA polimerases. In PCR protocols A Guide to Methods and Applications; Germany: Eds. Innis MA, *et al.* Academic Press. 1990.
 49. Ruano G, Brash DE, Kidd KK. PCR: The first few cycles. Amplifications A forum for PCR Users 1991;7:1-4.
 50. Gelfand DH. Taq ADN polimerase. In PCR technology Principles and Applications for DNA Amplification. Germany: Ed Erlich HA, Stockton Press. 1989.
 51. Lawyer FC, *et al.* Isolation, characterization, and *Escherichia coli* of the ADN polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J Biol Chem 1989;264:6427-6437.
 52. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* ADN polymerase. Biochemistr 1988;27:6008-6013.

53. Mezei LM. Effect of oil overlay on PCR amplification. A forum for PCR Users 1990;4:11-13.
54. Holland PM, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7276-7280.
55. Breniere SF, *et al.* Direct Identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. Am. J. Trop. Hyg. 1992;91:335-341
56. Russomando G, *et al.* Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiol. 1992;30:2864-2868
57. Avila HA, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic Chagasic Patients by Polimerase Chain Reaction Amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 1993;31:2421-2427
58. Avila HA, *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle ADN isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chaga's disease. Molec. Biochem. Paras. 1991;48:211-220
59. Wincker P, *et al.* High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiol, Lett. 1994;124:419-422
60. Buckner D, *et al.* Drugs of Parasitic Infection. Med Lett GrugsTher 1993;35:111
61. Stercorian Trypanosomiasis [http://Martin Parasitology Mogill, CA./Jimspage/Biol/Tcruzi](http://Martin.Parasitology.Mogill,CA./Jimspage/Biol/Tcruzi).
62. Brener Z, *et al.* An Experimental and Clinical Assay with Ketoconazole in the Treatment of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de J. 1993;88:149
63. Wyngaarden J, Smith L, Bennett J. Tratado de medicina Interna de Cecil. 20 ed. México: Interamericana Mc. Graw Hill. 1997. 2878p.
64. Birch D, *et al.* Simplified Hot Satart PCR. Nature. 1996;381:445-446

ANEXOS

Anexo No. 1

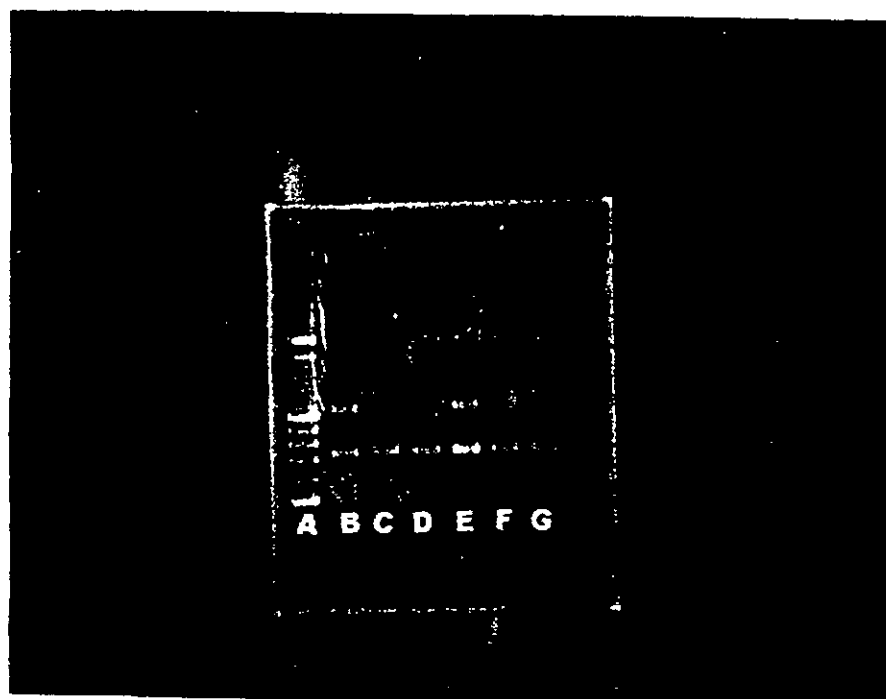
Gel de agarosa de muestras positivas de área endémica.



4" 45A

- A - Se observa la escalera de 100 pb de tamaño
- B - 1 Muestras de pacientes
- J - Bandas inespecíficas.

Anexo No. 2
Gel de agarosa de muestras del estudio.

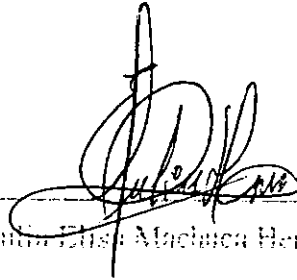


- A. Escalera de 100 pb de tamaño
- B. Control positivo
- C. Control negativo con presencia de banda
- D - G Muestras de pacientes

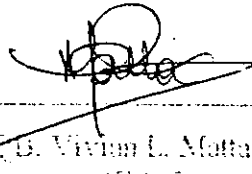
Figura No. 3
Gel de agarosa de las muestras en estado



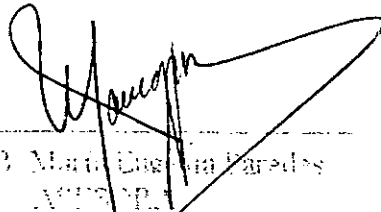
- A. Escalera de 100 pb de tamaño
- B. Control negativo
- C. Control positivo
- D. - 8 Muestras de pacientes



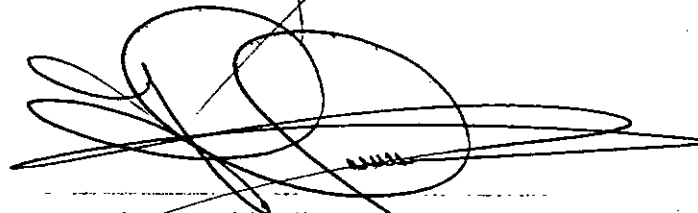
Juan Luis Machuca Hernandez



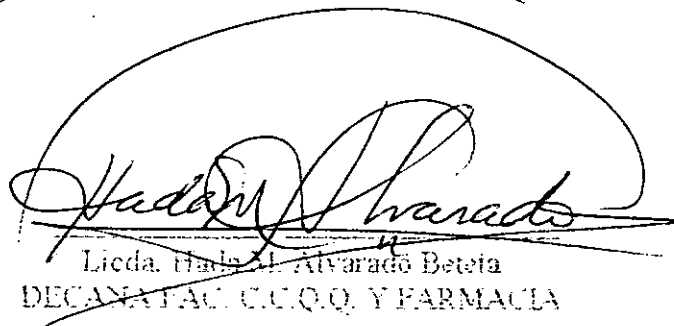
Licda. Q.B. Vivian L. Motta de Garcia
ASESORA



Licda. Q.B. Mari Eugenia Paredes
ASISTENTE



Licda. Heidi Elke Lourenson
DIRECTORA DE ESCUELA QUIMICA BIOLÓGICA



Licda. Gladys M. Alvarado Beteta
DECANA FAC. C.C.Q.Q. Y FARMACIA