

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

Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre completa por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores 121 y 122 del ADN del minicírculo del kinetoplasto

INFORME DE TESIS

Presentado por

ANA MYRIAM INDHIRA KARINA VARGAS GUDIEL

PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, Agosto del 2000

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

Decana: Licenciada Hada Marieta Alvarado Beteta

Secretario: Licenciado Oscar Federico Nave Herrera

Vocal I: Doctor Oscar Manuel Cobar Pinto

Vocal II: Doctor Rubén Dariel Velasqu ez Miranda

Vocal III: Licenciado Rodrigo Herrera San José

Vocal IV: Bachiller César Alfredo Flores López

Vocal V: Bachiller Manuel Aníbal Leal Gómez

DL  
06  
T(2058)

## DEDICATORIA

A Dios:  
Por guiar mis pasos y permitirme llegar a este momento.

A mi madre: Rosalinda Gudiel Pérez de Cardona  
Por motivarme, por que gracias a su esfuerzo y apoyo hoy alcanzo una meta más en mi vida.

A mi hermana: Mariela Rosalinda Vargas Gudiel de Custodio  
Por acompañarme en cada paso.

A mi cuñado: Delbert Francisco Custodio Méndez  
Con cariño.

A mis Sobrinos:  
Delbert Francisco, José Rodrigo y Aaron Estuardo  
Con todo mi amor.

A mis Abuelitos:  
Porfirio Gudiel Merlos  
María Herlinda Pérez Balcarcel de Gudiel y  
Fedora Urioste Estrada  
Por todo el amor que me brindaron.

A mi familia

Y en especial a:  
Marco Tulio Santos Seijas

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Licenciado Gerardo Arroyo Catalán

Licenciada María Eugenia Paredes de Sanchez

A mis padrinos:

Licenciado Herlindo Cardona Zacarías

Doctor Rene Gudiel Pérez

Al Licenciado:

Jorge Luis De León, por su asesoría en el área estadística.

Al Departamento de Citohistología, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A la señora María Eugenia Garzaro, por su apoyo.

## Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
1. Enfermedad de Chagas	5
2. Datos históricos	5
3. Distribución geográfica y epidemiológica	5
4. Transmisión	6
4.1. Vectores	6
4.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
4.2.1. Morfología	7
4.2.2. Ciclo de vida	7
4.2.3. Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i>	8
5. Sintomatología	14
6. Patología	14
7. Tratamiento	15
8. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	15
8.1. Diagnóstico clínico	15
8.2. Diagnóstico de laboratorio	16
8.2.1. Métodos directos	16
8.2.2. Métodos indirectos	16
8.3. Reacción en cadena de la polimerasa como técnica diagnóstica para <i>T. cruzi</i>	19
8.3.1. Parámetros críticos en la técnica PCR	20
8.3.2. Ciclos térmicos	22
9. Investigaciones realizadas por técnica de PCR para detección de ADN de <i>T. cruzi</i>	23
IV. Justificación	28
V. Objetivos	29
VI. Hipótesis	30
VII. Materiales y métodos	31
VIII. Procedimiento	34
IX. Resultados	41
X. Discusión	46
XI. Conclusiones	50
XII. Recomendaciones	51
XIII. Referencias	52
XIV. Anexos	57

## I. RESUMEN

En este estudio se evaluaron los cebadores 121 y 122 contenidos en el set de reactivos para PCR diseñado por el Instituto Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ), para determinar si los mismos permitían amplificar e identificar el ADN del *Trypanosoma cruzi*. Estos cebadores se escogieron por presentar la característica de ligarse a un segmento de las cuatro regiones constantes de los minicírculos de *T. cruzi* y promover la amplificación en dirección a la región variable.

Se utilizaron muestras de sangre completa, de 15 pacientes con enfermedad de Chagas (grupo 1), 15 muestras de pacientes de áreas no endémicas, sin historia clínica para enfermedad de Chagas y que no hubieran residido y/o emigrado de áreas endémicas (grupo 2) y 10 muestras de pacientes provenientes de áreas endémicas sin diagnóstico serológico e historia clínica para enfermedad de Chagas (grupo 3).

A todas las muestras se les realizaron tres pruebas serológicas. Tomándose como positivas todas aquellas muestras que presentaron al menos dos de estas pruebas positivas.

Posteriormente se extrajo ADN de las muestras y se amplificó utilizando el protocolo ya estandarizado

Se obtuvo los siguientes resultados:

- Grupo 1: De las 15 muestras analizadas, 15 (100 %) dieron un resultado positivo para el PCR.
- Grupo 2: De las 15 muestras analizadas, 15 (100 %) dieron un resultado negativo para serología y PCR.
- Grupo 3: De las 10 muestras analizadas, 1 muestra (10 %) resultó ser positiva para serología y PCR, 3 muestras (30 %) resultaron ser negativas para serología y positivas para PCR, y en 6 muestras (60 %) se obtuvo resultados negativos con ambas metodologías.

Los datos obtenidos por PCR y serología fueron analizados por medio de la prueba de concordancia de Kappa. Para los dos primeros grupos se obtuvo una concordancia de 1 por lo que se puede afirmar que existe una excelente concordancia entre serología y PCR.

En cuanto al tercer grupo de muestras se obtuvo un valor de concordancia de 0.286 que indica una pobre concordancia entre serología y PCR para área endémica.

Los valores obtenidos en este estudio para sensibilidad y especificidad para la técnica de PCR, fueron del 100 % y 87.5 % respectivamente, comparada con serología.

Al amplificar ADN de muestras de sangre de personas infectadas con *T. Cruzi* empleando el set diseñado por FIOCRUZ, Se observaron resultados inespecíficos por lo que hubo que sustituir la Taq polimerasa. Debido a esto, se puede concluir que este set como tal no funcionó, aunque en combinación con otros reactivos se pudo trabajar, teniendo especial cuidado en mantener las concentraciones adecuadas para su buen funcionamiento.

En conclusión, los cebadores 121 y 122 amplifican el ADN de las cepas guatemaltecas de *T. cruzi*. Existe una excelente concordancia entre serología y PCR para el grupo de muestras positivas confirmadas por serología y las muestras negativas serologicamente provenientes de área no endémica.

## II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una tripanosomiasis del continente americano, que en su fase aguda suele pasar inadvertida y sus manifestaciones crónicas son mucho más comunes, caracterizándose por lesiones cardíacas y gastrointestinales (1).

Para 1993 la Organización Mundial de la Salud estimó que 16 a 18 millones de habitantes estaban infectados por el parásito, con una incidencia de la enfermedad de un millón de casos anuales y una mortalidad de 45,000 (2).

En Guatemala la enfermedad fue notificada por primera vez en 1932 y hasta 1989 no fue una enfermedad de notificación obligatoria en el Ministerio de Salud Pública, aunque se estima una incidencia de 30,000 casos anuales (3,4).

Los departamentos identificados como zona endémica con casos clínicos y presencia de vector son: Guatemala, Baja Verapaz, Santa Rosa, Escuintla, El Progreso, Jalapa, Zacapa, Chiquimula y Jutiapa (4).

La detección de parásitos requiere de procedimientos como cultivo o xenodiagnóstico los cuales pueden tomar varias semanas o meses para obtener resultados. Debido a la baja parasitemia durante la fase crónica de la infección, el diagnóstico es realizado por métodos indirectos, es decir a través de la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* en suero. Una de las técnicas utilizadas es la hemaglutinación indirecta (IHA), que presenta una alta especificidad pero baja sensibilidad. La inmunofluorescencia indirecta (IFI), ha sido usada con éxito, pero la lectura es subjetiva ya que depende del observador, su especificidad no es muy alta y presenta reacciones cruzadas en títulos bajos con otras enfermedades, principalmente con leishmaniasis visceral (5).

Los métodos de aglutinación de partículas de látex, distribuidos comercialmente producen resultados poco confiables debido a su baja especificidad y sensibilidad. También se han descrito técnicas de radioinmunoensayo, pero no son accesibles a todos los laboratorios de rutina (5,6).

La detección de *T. cruzi* por amplificación bioquímica de las secuencias del ADN del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido demostrada y propuesta como una alternativa potencial para el diagnóstico y estudio epidemiológico de la enfermedad (7).

Se ha reportado una sensibilidad del 90 al 100 por ciento empleando esta técnica usando de 10 a 20 ml. de sangre de cada paciente. Únicamente un



estudio realizado en Bolivia, que utilizó 5 ml. de sangre reportó 93 por ciento de sensibilidad en comparación con pruebas serológicas de rutina (IFI, ELISA y IHA) (8).

En este estudio se evaluaron los cebadores 121 y 122 del ADN del minicirculo del kinetoplasto, de acuerdo con el protocolo de PCR estandarizado en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala., para determinar si los mismos permiten amplificar e identificar el ADN del parásito, en las distintas fases de la enfermedad. Estos cebadores se escogieron por presentar la característica de ligarse a un segmento de las cuatro regiones constantes de los minicírculos de *T. cruzi* y promover la amplificación en dirección a la región variable.

Se utilizaron muestras de sangre completa, de pacientes infectados confirmados por serología, como grupo control, pacientes provenientes de áreas endémicas y de áreas no endémicas.

Los resultados obtenidos por el PCR se compararon con tres métodos serológicos, inmunodifusión directa, aglutinación de partículas de látex y aglutinación con partículas de gelatina, a través de la prueba de concordancia de Kappa, observando que los cebadores 121 y 122 amplificaron el ADN del parásito de las cepas guatemaltecas. Así mismo éstos servirán de base para la realización del proyecto colaborativo que se está realizando con el patrocinio de la AIEA y la supervisión del Instituto Oswaldo Cruz.

Esta investigación forma parte del Proyecto Regional para América Latina para el Diagnóstico y Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. Los reactivos de PCR que se utilizaron son producidos en el Instituto Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ) y donados por la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA).

### III. ANTECEDENTES

#### 1. Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas es una zoonosis originaria de animales selváticos traída a la vivienda por insectos hematófagos y mantenida por el hombre y los animales domésticos. Entre los mamíferos que han sido reportados como reservorios están el perro, gato, ardilla, ratón, tacuazín, caballo, vaca, etc. (9).

Esta enfermedad es frecuente en Latinoamérica. Su frecuencia es máxima en distritos rurales y en clases más pobres que viven en casas de adobe con techo de paja, cuyas paredes brindan excelentes lugares para que se escondan los insectos vectores (1).

#### 2. Datos históricos:

Fue descrita en 1909 por Carlos Chagas en el estado brasileño de Minas-Gerais y en 1913 en El Salvador, siendo así el segundo país donde se diagnosticó *T. cruzi*. En 1932 Eduardo Reichenow de la Universidad de Hamburgo determinó la presencia de *T. cruzi* en redúvidos de los departamentos de Santa Rosa y Escuintla y culminó sus investigaciones con el diagnóstico de los dos primeros casos de la enfermedad en Guatemala. Diversos estudios realizados en Guatemala han demostrado la existencia de la enfermedad y se estima que la prevalencia general es del ocho por ciento, existiendo áreas donde ésta llega hasta el 46 por ciento (4,10,11).

#### 3. Distribución geográfica y epidemiología:

La distribución geográfica de los vectores va desde el sur de Estados Unidos, hasta la Patagonia, al extremo sur del continente. La naturaleza del vector es selvática, pero las precarias condiciones de la vivienda han determinado que los vectores vivan y se reproduzcan intra-domiciliariamente, favoreciendo la relación del hospedero-humano quien puede resultar infectado por *Trypanosoma cruzi* al ponerse en contacto con las heces del vector infectado (12).

Los estudios realizados indican que los vectores presentes en Guatemala son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. Se han identificado

varios departamentos como zona endémica de la enfermedad de Chagas, en los cuales se han reportado presencia de vectores, siendo: Guatemala, Baja Verapaz, Escuintla, El Progreso, Jalapa, Zacapa, Chiquimula y Jutiapa (12,13).

La enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud endémicos en América. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado que existen aproximadamente 65 millones de personas a riesgo de sufrir esta infección y que 20 millones de habitantes en áreas urbanas y rurales padecen de la enfermedad (12).

Según el reporte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) de los 205 millones de personas del cono sur de América Latina, el cuatro o cinco por ciento están infectados con la enfermedad. La OPS estima que de 16 a 18 millones de habitantes de Latinoamérica puede infectarse, otros dos a tres millones pueden desarrollar complicaciones crónicas y cerca de 43,000 personas mueren anualmente. En la mayoría de las personas la infección pasa desapercibida y, 10 a 20 años después desarrollan lesiones incurables cardiacas, intestinales o del sistema nervioso (14).

#### **4. Transmisión:**

El hombre se infecta con los tripomastigotes metacíclicos del *T. cruzi* presentes en las deyecciones del vector depositadas en la piel o mucosas durante la picadura. Otros mecanismos por los cuales se puede infectar el hombre son las transfusiones sanguíneas o la infección congénita. Hoy en día la sangre del donador es evaluada para esta enfermedad en Centro y Sudamérica, reportando la OPS una prevalencia en los donadores abajo del 1.2 por ciento (14,15).

#### **4.1. Vectores:**

Cada especie de insecto tiene sus propias características de comportamiento, distribución geográfica, hábitats, lugares de reposo, preferencias alimenticias, patrones de defecación, etc. (16).

Los vectores encontrados en Guatemala para esta enfermedad son: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida*.

*Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida* están circunscritos a ciertas áreas que pueden definirse concretamente, mientras que *Triatoma dimidiata* es de amplia distribución. Cada uno de ellos tiene preferencias cuanto a sus hábitats y de acuerdo a estas características se pueden encontrar dentro de las viviendas en sitios determinados. *T. dimidiata* es el principal vector en Centro América y del 30 al 40 por ciento se encuentran infectados por *T. cruzi* (16,17).

#### **4.2. Trypanosoma cruzi:**

##### **4.2.1. Morfología:**

Es un protozoo que circula en la sangre como un hemoflagelado delgado, fusiforme, de 15 a 20 micras de largo, con el extremo superior terminado en punta.

En frote teñido con Giemsa aparece con un flagelo libre que mide el tercio de la longitud total, citoplasma granuloso, núcleo central bien coloreado, kinetoplasto grande (cuerpo parabasal y blefaroblasto) y gránulos de volutina. En las células tiene la forma redondeada, de amastigote sin flagelo, localizándose de preferencia en el tejido nervioso y músculos (13).

##### **4.2.2. Ciclo de vida:**

Los reducidos transmisores se infectan al picar al hombre o animales reservorios infectados, puede hacerlo en estadio de larva, ninfa o imago. Los tripanosomas ingeridos por el insecto se convierten en epimastigotes cortos, los cuales se multiplican por división binaria y evolucionan a formas largas que se encuentran en la parte posterior del intestino medio. Después de ocho a diez días aparecen en el recto, pequeños tripanosomas que son las formas metacíclicas que salen con las heces y son infectantes para los mamíferos (13,18).

Los tripanosomas metacíclicos son depositados en la piel del hospedero durante la succión de la sangre por el vector. El hospedero se infecta al rascarse e introducir al parásito por el canal de punción. Los tripanosomas entran por las células subcutáneas de la piel y pasan al torrente sanguíneo, infectando una variedad de células incluyendo células reticuloendoteliales del bazo, linfáticas y de músculo esquelético, cardíaco y liso. El mecanismo de entrada aún es incierto,

no se ha determinado si lo hace por vía receptor-ligando a las bandas de proteínas, por medio de pseudópodos o por alteraciones de la membrana celular. Algunas investigaciones sugieren que el *T. cruzi* sustituye a los lisosomas del hospero con movimiento y con una fusión gradual de la membrana celular en el sitio de entrada del parásito. La membrana forma una vacuola que protege al parásito que es muy similar a la de los lisosomas (18).

Una vez dentro de la célula, el parásito cambia a forma de amastigote la que es necesaria para la reproducción. El amastigote se divide muchas veces formando pseudoquistes que eventualmente se rompen. Los amastigotes libres se transforman en el espacio intersticial en promastigotes, epimastigotes y tripomastigotes antes de entrar de nuevo al torrente sanguíneo (18). La proteasa-cisteína ha sido identificada en los tres estadios de desarrollo de *T. cruzi* y se sugiere que puede ser un factor determinante en la patogenicidad de la enfermedad entre otros por facilitar la invasión, proteger de la fagocitosis o inducir la respuesta inmune del hospedero (19).

#### **4.2.3. Caracterización de las cepas de *T. cruzi*:**

Las células de *T. cruzi* como otras kinetoplastides contienen una compleja red de ADN circular encadenada (ADN del kinetoplasto o kADN) dentro de su mitocondria, organelo de la célula que produce energía. *T. cruzi* es llamado kinetoplastides por la presencia de un granulo pequeño o kinetoplasto observado en la fase del flagelo cuando es coloreado con ciertas tinciones. El kinetoplasto representa un complejo mitocondrial de la célula que contiene una masa compacta de ADN que básicamente consiste en una red de 5-20 x10<sup>3</sup> minicírculos de 1.42 kb y de 20-50 maxicírculos de 36 kb (20).

Degrave y colaboradores describen secuencias de 3 minicírculos aislados de las cepas CL y Y, estas cepas representan la diversidad biológica del organismo las cuales son usadas ampliamente como sistema modelo en muchos laboratorios (21). Las secuencias de la región variable cambian rápidamente, mientras que el minicírculo del kinetoplasto contiene otra región constante, cuya secuencia es perfectamente bien conservada a través de las especies (22).

Estas regiones conservadas en las especies han sido denominadas "minirepeticiones" y poseen tres veces más alta la concentración de los residuos de citosina y una organización peculiar. Cada minicírculo contiene 4 minirepeticiones de 120 pb situadas a intervalos de 90° en comparación con la región variable y contiene la secuencia universal 12-mer GGGGTTGGTGTA que está relacionada con la replicación del ADN, y 4 secuencias no repetitivas de la región variable (20 - 24). (ver anexo 1)

La secuencia universal ha presentado una remarcada preservación en diferentes poblaciones de *T. cruzi*. Bajos niveles de secuencias similares intraminicírculo se han observado entre la región variable, pero esta similaridad no se extiende entre poblaciones. Las minirepeticiones conservadas contienen sitios no variantes de restricción en la célula de *T. cruzi* lo que puede ser utilizado en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de la enfermedad basados en la tecnología de ADN (22,24).

El mecanismo preciso de la generación de la diversidad de las secuencias del minicírculo no ha sido bien comprendido y probablemente envuelve puntos de imitaciones y recombinaciones entre diferentes círculos, así como una posible selección de secuencias en las diferentes clases de minicírculos en las múltiples líneas clonales que se presentan en las poblaciones naturales de *T. cruzi*. Cualquiera que sea el mecanismo de generación de la diversidad de secuencias del minicírculo, esta molécula ha demostrado ser el marcador propio de las especies centroamericana y suramericana, y cadenas variables del kinetoplasto (22). Las variantes cortas subsecuentes entre la región conservada es actualmente conservada entre la familia de kinetoplastides y se piensa que esta envuelta en la iniciación de la replicación del ADN (22).

Debido a la heterogeneidad del *T. cruzi* en la naturaleza, el método de esquizodemos es mayormente usado para la determinación de la relación cercana de cadenas y la huella de cadenas individuales. Se ha limitado el uso del términos esquizodemos para subgrupos homogéneos de cadenas relacionadas,

aunque se ha extendido y más grupos heterogéneos pueden ser observados con comparación del kADN total (22).

Debido a la variabilidad de las secuencias de ADN del kinetoplasto se sugirió que podrían ser utilizado para identificar las diferentes cepas de *T. cruzi* y así proporcionar importante información epidemiológica y correlacionarla con datos clínicos. Las diferentes secuencias del minicírculo entre las distintas cepas del parásito son el resultado de la acumulación de mutaciones las cuales no afectan el proceso de transcripción (20).

Las endonucleasas de digestión del kADN han sido utilizadas como base de análisis de esquizodemos, un método bioquímico utilizado para la caracterización genotípica de tripanosomatides, para comprender mejor la organización estructural, la evolución del kADN e investigar la posibilidad de desarrollar un nuevo medio de diagnóstico parasitológico directo de la enfermedad de Chagas (21).

La técnica de PCR puede ser utilizada para la amplificación de especie-específica y posiblemente cadena específica de fragmentos de ADN del minicírculo, permitiendo la detección directa y clasificación de un número pequeño de parásitos de pacientes o animales infectados (22).

La caracterización de cepas basadas en marcadores genotípicos se realiza por análisis de perfiles de electroforesis en gel, la técnica de RAPD-PCR (por sus siglas en inglés), basada en la amplificación al azar de secuencias con un mínimo de contenido de 50 por ciento de guanidina-citosina usando secuencias de 10 oligonucleotidos como cebador en la reacción de PCR, para amplificar fragmentos localizados a lo largo del genoma (25-27).

Esta técnica puede ser aplicada a cualquier especie, a grupos de mismos individuos como a grupos mixtos encontrados en estadio silvestre. Además no requiere clonación o información de secuencia de ADN para diseñar los cebadores, no emplea marcadores radioactivos y el polimorfismo genético puede ser visualizado dentro de las 24 horas de la extracción del ADN genómico (27).

Los métodos comúnmente usados para la detección directa y clasificación de *T. cruzi* como el xenodiagnóstico, análisis de isoenzimas, análisis de zimodemos de kADN total, requieren de una amplificación celular por pasos para obtener bastante material, de este modo posiblemente conduce hacia la selección particular del parásito en una infección mixta (22).

En el cultivo celular es necesario una cantidad suficiente de parásitos de *T. cruzi* para la tipificación de isoenzimas o análisis de esquizodemos, mientras que la técnica de PCR puede amplificar una población de parásitos en sangre que puede ser usada con éxito para propósito de tipificación (28).

Los análisis por PCR de esquizodemos superan estas limitaciones para el análisis directo de pequeñas cantidades de ADN del minicírculo del kinetoplasto del parásito obtenido sin crecimiento celular previo a partir de pequeñas muestras de sangre o tejido del hospedero. En general dependen de las frecuentes diferencias de clase de kADN del minicírculo determinadas por las secuencias de la región variable, entre una sola red y en el rápido cambio de grado de las secuencias del minicírculo en la naturaleza, produciendo mayores diferencias entre cadenas especialmente en el caso de *T. cruzi* (22).

La sensibilidad de la diferenciación de las cadenas de *T. cruzi* usando la amplificación del ADN del minicírculo, puede permitir el estudio de patrones de transmisión dentro de este parásito y entre la localización geográfica (22).

La detección directa de *T. cruzi* y de *Leishmania* sp. en la enfermedad de Chagas y leishmaniasis posee una importante relevancia clínica y epidemiológica.

El ADN mitocondrial del parásito representa cerca del 20 por ciento del ADN total de la célula y se organiza en redes en forma de disco con miles de minicírculos internos que representan el 95 por ciento de la estructura. Estas moléculas presentan tal semejanza que son ideales como moléculas blanco ya que se presentan en el kinetoplasto en un gran número de copias y contiene regiones constantes de un mínimo de 120 pb (29).

Las cepas de *T. cruzi* han sido caracterizadas de acuerdo a su morfología, inducción de parasitemia, velocidad de multiplicación, patogenicidad, tropismo



celular, comportamiento biológico, análisis de proteínas, isoenzimas y ADN. Matta y colaboradores caracterizaron en base a curvas de crecimiento *in vivo* siete cepas obtenidas de material fecal de chinches infectadas (*T. dimidiata*) encontrándose mortalidad únicamente en la cepa ITD/GT/93/DD14 y el resto mostraron parasitemia variable. Estos resultados indican que la variedad intraespecie existe y se hace necesario determinar su relación con la presentación clínica de la enfermedad y respuesta al tratamiento (30).

Se ha realizado la caracterización bioquímica de los aislamientos de *T. cruzi* obtenidos de la sangre de humanos y de mamíferos, por medio de electroforesis SDS-PAGE y la posterior identificación de las bandas de proteínas a través de la técnica de Western Blot (31).

En la actualidad se ha determinado la heterogeneidad de las distintas especies de *T. cruzi* en base a la electroforesis de isoenzimas (análisis de Zimodemos), mapa de restricción del kinetoplasto, análisis de esquizodemo, cariotipo, polimorfismo del fragmento largo de restricción del ADN total, huella del ADN, amplificación por random del ADN polimorfico (RAPD), análisis por reacción en cadena de la polimerasa. Algunos estudios genéticos en poblaciones de *T. cruzi* revelaron una variación izosímica substancial en al menos tres grupos grandes de zimodemos definidos. Los parásitos protozoarios dentro del taxón *T. cruzi* están considerados derivados de múltiples líneas clonales como resultado de la propagación o no de pequeños cambios genéticos (25,32).

La electroforesis en gel ha permitido la detección entre las cepas de *T. cruzi* de isoenzimas que tienen actividad catalítica similar y pueden diferir en otros aspectos, por lo que se han diferenciado grupos de cepas en zimodemos, que significa, grupos con perfiles idénticos de isoenzimas (25).

Estudios iniciales realizados por Miles *et al.* en cepas aisladas de diferentes hospederos y diferentes áreas endémicas clasificaron las poblaciones de *T. cruzi* en grupos de zimodemos, Z1, Z2 y Z3. Las cepas clasificadas como Z2 fueron aisladas de pacientes crónicos y animales domésticos. Las cepas

clasificadas como Z1 y Z3 se encontraron en vectores y reservorios selváticos (27, 33).

Estudios genéticos realizados en poblaciones de *T. cruzi* revelan una variación isoenzímica substancial entre los grupos de zimodemos. La enfermedad presenta diferentes manifestaciones clínicas que van desde miocarditis severa y/o alteraciones en el sistema digestivo (megacolon, megaesófago) hasta una forma indeterminada. Este espectro de síntomas ligados al complejo ciclo de vida del parásito que envuelve hospederos intermediarios y tres estadios distintos de desarrollo se relaciona fuertemente con la alta heterogeneidad reportada entre los *T. cruzi* aislados (32).

Investigaciones previas de isoenzimas y cariotipo molecular están de acuerdo con la diploidia en los tripanosomatides y también suponen que en general el genoma de este parásito es marcadamente modificable. Sin embargo, la meiosis no ha sido demostrada y los análisis genéticos de las poblaciones sugieren que en las cepas silvestres de *T. cruzi* la reproducción es predominante o enteramente un proceso asexual (32,34).

Existe mayor probabilidad de detectar cambios genéticos en ciclos silvestres inalterados de transmisión, entre cadenas que no están separadas por largas distancias genéticas y dentro del mismo zimodemo principal, tal como Z1 que predomina en la cuenca del Amazonas (33).

Se supone que los cambios genéticos ocurren durante el ciclo selvático de *T. cruzi* y esto es lo que contribuye a la generación de fenotipos y genotipos diversos en este organismo. Los cambios genéticos podrían confirmar la capacidad de transmitir a la progenie resistencia a drogas, cambios en la patogenicidad y resistencia a la defensa del hospedero (33).

Un estudio genético comparativo de análisis de zimodemos se llevó a cabo en 30 cepas de *T. cruzi* aisladas en Guatemala y seis de Sudamérica. En esta investigación se obtuvieron nueve zimodemos incluyendo el grupo de zimodemo 1 que fue mayor en las poblaciones guatemaltecas y las muestras de Brasil y Colombia. El zimodemo 9 fue encontrado en las muestras provenientes de

Sudamérica pero no en las cepas de Guatemala. Esta diferencia en la estructura genética puede explicar las diferentes características clínicas de la enfermedad de Chagas en cada área (35).

### **5. Sintomatología:**

Se han determinado tres fases en la patología en la enfermedad de Chagas, la fase aguda en la cual se presenta una inflamación local en el sitio de la picadura del vector, con formación de un pequeño nódulo rojo (chagoma) o un complejo oftalmoganglionar que produce conjuntivitis unilateral y edema bipalpebral (Signo de Romaña). Otros síntomas que se presentan son desórdenes nerviosos, escalofríos, dolor muscular y óseo, generalmente esta fase suele pasar inadvertida (13,18).

La fase indeterminada aparece con frecuencia variable y se caracteriza por hepatoesplenomegalia, linfadenopatía generalizada, miocarditis, edema generalizado, manifestaciones dérmicas y alteraciones digestivas (10).

La fase crónica se observa en adultos, presenta síntomas principalmente asociados con desórdenes neurológicos y con el paso del tiempo, la pérdida y muerte del tono muscular cardíaco que resulta en un crecimiento del corazón provocando la muerte del paciente por falla cardíaca (18).

### **6. Patología:**

Las características biológicas de daño de *T. cruzi* y los factores genéticos relacionados al HLA del hospedero son lo que contribuye a variar el curso clínico de la enfermedad de Chagas crónica (36).

Por estudios patológicos de infecciones experimentales, se ha demostrado que existen diferencias en las lesiones tisulares, particularmente en lo que se refiere a la distribución, intensidad, tipo de infiltrado inflamatorio y involucramiento de las neuronas y se ha propuesto que estas diferencias en patología están asociadas a las diferencias antigénicas y/o bioquímicas de las cepas de *T. cruzi* y/o ciclos de transmisión (30). Existen cepas cardiotropas (miocardio) y viscerotropas (plexos nerviosos de órganos huecos: esófago, estómago, intestinos) (13).

## **7. Tratamiento:**

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. Las drogas desarrolladas eliminan únicamente los parásitos extracelulares, por esta razón es probable que el tratamiento sea más efectivo en la fase aguda. El Benznidazol® y el Nifurtinox® son las drogas corrientes de elección y requieren un tratamiento largo, de 60 días o más, muchos pacientes requieren hospitalización por los efectos adversos frecuentemente asociados con el tratamiento (11).

El desarrollo de vacunas se ha visto impedido debido a la posible asociación de éstas con enfermedades autoinmunes (11).

El único control efectivo es a través de fumigación de las áreas habitadas por el vector (11).

## **8. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas:**

El diagnóstico de la enfermedad es usualmente realizado por la identificación microscópica del parásito en sangre, tejido y por la presencia de anticuerpos específicos en suero. La detección del parásito en tejido no es siempre posible en pacientes infectados, y especialmente en pacientes crónicos es difícil su identificación. Los exámenes en suero pueden detectar casos positivos siempre y cuando se tome en cuenta que los niveles bajos de parasitemia limitan la detección microscópica (37).

### **8.1. Diagnóstico clínico:**

Se realiza principalmente por electrocardiograma convencional que presenta un bloqueo en la rama derecha y radiografía del tórax, que muestra un agrandamiento del corazón (cardiomegalia), causada por la reproducción del parásito dentro del tejido, esta puede ser discreta, moderada o severa, dependiendo del grado de hipertrofia existente. Más de la mitad de los pacientes presenta un adelgazamiento focal típico del miocardio o aneurisma en la punta del ventrículo izquierdo que se considera un signo patognomónico de la cardiopatía chagásica crónica (38).

## **8.2. Diagnóstico de laboratorio:**

### **8.2.1. Métodos directos:**

Las técnicas directas más utilizadas son los frotis sanguíneos coloreados con la tinción de Giemsa observando la morfología del parásito, o el examen de sangre fresca donde se detecta al *T. cruzi* por su movilidad. Los métodos de concentración del parásito, como la técnica de Strout, en la que la sangre se colecta en un tubo capilar y se centrifuga para observar en la interfase de células rojas y blancas el parásito. El método de Hoff que utiliza cloruro de amonio al 0.87 % PV, para lisar eritrocitos de sangre con EDTA y facilitar la observación del *T. cruzi*. Estas técnicas son útiles en la fase aguda de la enfermedad debido a la alta parasitemia que existe en dicha fase (38).

Debido a la baja cantidad de tripomastigotes circulantes en sangre el método parasitológico directo más confiable para detección de infecciones crónicas es el xenodiagnóstico, el cual es específico pero con una baja sensibilidad ya que solo alcanza de 17 a 70 por ciento de sensibilidad comparado con los métodos serológicos (24, 39).

El hemocultivo del tripanosoma en medios como LIT (triptosa de infusión de hígado) o BHI (infusión de cerebro-corazón) es muy útil en el aislamiento del parásito durante las fases aguda y crónica de la enfermedad. Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo son procedimientos largos y complicados, los cuales toman semanas completas para obtener los resultados (6, 7, 38).

### **8.2.2. Métodos indirectos:**

Los exámenes serológicos han sido ampliamente utilizados para la confirmación de la infección por *T. cruzi* a pesar de poseer una baja especificidad debido a las reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos. La mayor limitación de las técnicas serológicas, es causada principalmente por fracciones antigénicas de *T. cruzi* que poseen epitopos semejantes a otros tripanosomatides presentes en la misma área endémica, en particular con *Leishmania* sp.. No se ha demostrado casos de resolución (autocura) de la enfermedad de Chagas y por

lo tanto siempre que una persona presente serología positiva es considerada infectada (23, 39).

Debido a la baja concentración del parásito en sangre, principalmente durante la fase crónica, el diagnóstico es realizado por métodos indirectos buscando anticuerpos contra *T. cruzi* en suero. Estos métodos son sensibles, pero su especificidad generalmente insatisfactoria, debido a las reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos (5, 23, 28, 40).

Los exámenes serológicos han sido ampliamente utilizados para la confirmación de la infección por *T. cruzi* a pesar de poseer una baja especificidad debido a las reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos. La mayor limitación de las técnicas serológicas, es causada principalmente por fracciones antigénicas de *T. cruzi* que poseen epitopos semejantes a otros tripanosomatidos presentes en la misma área endémica, en particular con *Leishmania* sp.. No se ha demostrado casos de resolución (autocura) de la enfermedad de Chagas y por lo tanto siempre que una persona presente serología positiva es considerada infectada (23, 39).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas fue descrito justo después del descubrimiento de la enfermedad, Guerrerio y Machado en 1913 describieron la reacción de fijación del complemento usada rutinariamente en algunos laboratorios, este es un examen tedioso que envuelve un control de calidad estricto de los reactivos y es difícil de implementar en laboratorios de rutina. En 1966 Keirin y Saavedra y Cerisola *et al.* en 1967 implementaron el examen de hemaglutinación indirecta (HAI), el cual es de fácil aplicación con alta especificidad pero baja sensibilidad, lo que no la hace apropiada como prueba diagnóstica única (5).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha sido usada para el diagnóstico serológico de la enfermedad desde 1966, y aun sigue siendo empleada con éxito. Entre otras ventaja de la IFI sobre la HAI es que permite realizar simultáneamente un gran número de muestras. Sin embargo la lectura es subjetiva, su

especificidad no es muy alta y da reacciones cruzadas en títulos bajos con varias enfermedades, principalmente leishmaniasis visceral (5).

Se ha usado HAI e IFI combinados para compensar la relativa baja sensibilidad del HAI con la alta sensibilidad de IFI y la baja especificidad de IFI con la alta especificidad de HAI (5).

La aglutinación directa (AD) ha sido una técnica exitosa principalmente después del tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol (2MEAD) que incrementa su especificidad, no se emplea de esta forma en los laboratorios porque incrementa demasiado el costo de la prueba. Otras técnicas de aglutinación, como partículas de látex, que produce pobres resultados, principalmente por su baja especificidad y sensibilidad. El análisis por RIA ha sido descrito pero no es accesible a laboratorios de rutina (5).

En 1975 se introdujo la técnica de ELISA mejorando el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Otra técnica como la lisis mediada por complemento que a parte de consumir tiempo requiere el uso de parásitos vivos y los resultados que se obtienen son similares a los de las técnicas convencionales (5).

En el presente, el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas se realiza por medio de las técnicas de IFI, Hemaglutinación pasiva y ELISA. La clásica reacción de fijación del complemento (FC) de Guerreiro y Machado ha caído en desuso debido a la difícil estandarización y la falta de una preparación confiable del antígeno (41).

Los antígenos comúnmente utilizados en las técnicas serológicas convencionales son extraídos de epimastigotes o un complejo de mezclas de componentes de estadíos no infectivos del parásito. La especificidad de la cepa de *T. cruzi* usada y las diferentes técnicas empleadas para extracción del antígeno introduce una variabilidad en la preparación del reactivo. Finalmente estos reactivos pueden elevar las reacciones falso-positivas principalmente por reacciones cruzadas con anticuerpos desarrollados contra otras enfermedades (41).

Para detectar anticuerpos IgM presente en las fase temprana de la enfermedad la prueba recomendada es IFI seguida por AD y 2MEAD. Para detectar anticuerpos IgG presentes en las fases indeterminada y crónica son recomendadas HAI, ELISA, IFI y FC. La especificidad de las pruebas puede variar de manera considerable por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el empleo de al menos dos pruebas serológicas para confirmar el diagnóstico de la infección (5, 38, 41).

### **8.3. Reacción en cadena de la polimerasa como técnica diagnóstica para *T. cruzi*.**

La constitución molecular de *T. cruzi* es compleja, se han encontrado compuestos altamente antigénicos y altamente específicos del mismo como lípidos, glucoproteínas, polisacáridos, etc. a través de patrones electroforéticos (38).

Anteriormente, el xenodiagnóstico se empleaba como método diagnóstico para la enfermedad de Chagas, en el cual la persona infectada era sometida a piquetes de un vector no infectado, que después de varias semanas era disectada y examinada para observar la presencia de *T. cruzi*, lo cual indicaba que el paciente estaba infectado. Actualmente el análisis en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el diagnóstico de la enfermedad de chagas, siendo una técnica rápida, sensible y específica (22).

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento rápido de amplificación de segmentos de ADN. Incluye desde análisis forenses, análisis para detectar agentes infecciones, diagnósticos prenatales de enfermedades genéticas y otras. El PCR es usado frecuentemente debido a que es una técnica sensible para diversas secuencias utilizando los cebadores específicos. Para optimizar la técnica, el primer paso es simple tener la plantilla de ADN, dos cebadores apropiados, *taq* ADN polimerasa, desoxirribunucleotidos trifosfato (dNTPs) y buffer. Una vez mezclados, son colocados en el termociclador y ciclados a temperaturas que permiten la desnaturalización, hibridación y síntesis (42).



### **8.3.1. Parámetros críticos en la técnica de PCR:**

La técnica de PCR puede amplificar un ADN blanco, seleccionando fracciones de ADN por la propia especificidad de los cebadores. Es claro que el diagnóstico de infección por *T. cruzi* basado en PCR es altamente específico y sensible, sin embargo se necesitan varios factores para una amplificación: 1) una secuencia blanco, 2) cebadores específicos, 3) la selección de las condiciones óptimas para la amplificación. La selección de los cebadores es un elemento determinante en la realización de la amplificación de los ácidos nucleicos como base del sistema de diagnóstico (37).

#### **8.3.1.1. Cebadores:**

Un cebador óptimo debe, hibridizar eficientemente la secuencia de interés omitiendo otras secuencias presentes en la muestra, ser exactamente complementarios a la plantilla de ADN debe tener un contenido similar de G-C (42).

Las diversas condiciones para diseñar un cebador son: 1) la longitud de un oligonucleótido cebador para usar en la amplificación que es determinada por la conservación, tamaño y composición de la secuencia blanco, 2) la temperatura de fusión de un oligonucleótido que es la temperatura en la cual el 50 por ciento de las hebras de ADN que están unidas se separan y el oligonucleótido se liga a la secuencia de ácidos nucleicos blanco, 3) la composición de nucleótidos del oligonucleótido cebador usado en una amplificación estará determinada directamente por la temperatura de la plantilla de ADN usada y 4) debe evitarse la autohibridización de los cebadores, que da como resultado la formación de una horquilla de amarre o asa (37).

#### **8.3.1.2. Plantilla de ADN:**

Las dos condiciones principales que hay que recordar del templado son la pureza y la cantidad. El número de contaminantes en la preparación del ADN pueden disminuir la eficiencia del PCR. Estos incluyen urea, detergentes como Nonidet P-40, Tween 20, Triton-X-100, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de

sodio, etc., y algunos componentes acarreados en el proceso de purificación del ADN en los geles de agarosa (42).

### 8.3.1.3. Extracción de ADN:

La red del kinetoplasto debe abrirse en un orden específico para liberar los minicírculos encadenados y distribuir las secuencias blanco homogéneamente en las muestras de sangre. Este proceso puede realizarse por separación química del ADN mediante uso de una nucleasa cóprica que aumenta la sensibilidad de la detección de *T. cruzi* haciendo este proceso más exitoso en el análisis por PCR, pero introduce la necesidad de una manipulación adicional de la muestra de sangre lo cual incrementa la posibilidad de una contaminación cruzada y el resultado falso positivo en los protocolos de diagnóstico basados en PCR. Puede realizarse también el proceso de separación física del kADN, en el cual, las muestras son mezcladas con Guanidina/EDTA 6 M en proporción uno a uno, y luego son calentadas a 100° C por 5 minutos, este es un proceso simple, rápido y confiable que permite la linearización de la mayoría de los minicírculos, al aumentar el tiempo de calentamiento induce mayor fragmentación de los mismos (7).

Una célula contiene alrededor de  $2 \times 10^4$  minicírculos individuales con lo cual se concluye que este procedimiento de extracción de ADN puede detectar un parásito en 20 ml. de sangre. Esta sensibilidad es adecuada para un diagnóstico preciso de la forma crónica de la enfermedad, cuando los niveles de tripomastigotes circulantes son usualmente bajos (7).

Cien microlitros de muestra son utilizados para la preparación de ADN. Las extracciones orgánicas (fenol-cloroformo), precipitaciones con etanol pueden ser beneficiosas. El paso siguiente a la extracción el sedimento es resuspendido en 50  $\mu$ l agua destilada y almacenados a -20 °C (42,43).

Los productos de PCR son visualizados con bromuro de etidio. 100 ng de ADN es suficiente para detectar un producto de una sola copia, sin embargo el uso de una cantidad excesiva de templado puede disminuir la eficiencia (42).

#### 8.3.1.4. ADN polimerasas:

Existen varias enzimas del género *Thermus* que han sido caracterizadas como *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus* y *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa). Así mismo se han caracterizado enzimas del géneros *Archabacterial* de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus* y otras (44).

Entre las ventajas de la *Taq* polimerasa es su termoestabilidad ya que cuenta con la habilidad de soportar calentamientos a altas temperaturas y el cambio a temperaturas menores, inherentes a la técnica de PCR, así como su habilidad para sintetizar ADN. Otra cualidad importante de la *Taq* ADN polimerasa es su tendencia a adicionar nucleótidos no templados al extremo 3' terminal de las cadenas de ADN.

Una propiedad muy importante de la enzima es su rango de error, el cual se estima inicialmente en  $2 \times 10^{-4}$  nucleótidos/ciclo (42).

#### 8.3.1.5. Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs):

En un esfuerzo por incrementar la eficiencia del PCR, se eleva la concentración de dNTPs. La concentración de los mismos es de 200  $\mu$ M, cuando la mitad de dNTPs es incorporada estimula la síntesis de 12.5  $\mu$ g de ADN, sin embargo concentraciones mayores de 200  $\mu$ M incrementan el rango de error de la polimerasa (42).

#### 8.3.2. Ciclos térmicos:

El protocolo de "principio caliente" (Hot Start) para la técnica de PCR incrementa su sensibilidad, especificidad y rendimiento. El PCR es de gran utilidad por su habilidad para aumentar múltiples secuencias blanco, estos ejemplos incluyen identificación de patógenos en muestras biológicas y análisis mitocondrial de múltiples genes del exón (45).

##### 8.3.2.1. Desnaturalización (94 °C):

Ocurre la separación completa de la cadena, si el contenido de G-C es extremadamente alto, es necesaria altas temperaturas (98° C) de

desnaturalización, sin embargo la actividad de la *Taq* ADN polimerasa puede reducirse rápidamente (42).

#### **8.3.2.2. Hibridación ( 37° - 64° C):**

Los cebadores se hibridan a la plantilla de ADN. Los cebadores con un contenido bajo de G-C menor de 50 por ciento requieren temperaturas menores que 55 °C para una hibridación completa, por otro lado esto puede incrementar productos inespecíficos. Para cebadores con alto contenido de G-C, las altas temperaturas de hibridación pueden ser necesarias, como en el caso de la desnaturalización. El tiempo en este paso se encuentra basado principalmente, en el tiempo que toma encontrar la temperatura apropiada. Debido a que los cebadores se encuentran en exceso, esta reacción ocurre rápidamente (42).

#### **8.3.2.3. Extensión (72 °C):**

La temperatura de extensión de 72° C se encuentra cercana a la temperatura óptima de la *Taq* ADN polimerasa (~ 75° C), a esta temperatura los cebadores aseguran el proceso de extensión que en realidad comienza durante la hibridación, desde que la *Taq* ADN polimerasa es parcialmente activada a 55 °C. El tiempo de extensión depende principalmente de la longitud de la secuencia a amplificar (42). (ver anexo 2)

### **9. Investigaciones realizadas por técnica de PCR para la detección de ADN de *T. cruzi*:**

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es complicado por el hecho de que en algunas áreas es encubierta por la infección de *T. rangeli*. Morfológicamente la identificación de ambos parásitos es confusa. Las técnicas moleculares se han usado para diferenciarlos por medio de la cisteín-proteinasa. Esta enzima se encuentra extensamente distribuida entre los eucariotas y es retenida en la secuencia conservada de aminoácidos. Esta secuencia puede identificarse por la técnica de PCR a través de los sitios activos de la enzima. Por medio del Southern Blot de los patrones de aminoácidos obtenidos por electroforesis de campo pulsado, se ha observado que *T. rangeli* posee 69 por ciento de identidad con 166 aminoácidos de *T. cruzi*. En experimentos

realizados con ADN de *T. rangeli*, las diferencias entre las bandas de ADN hibridadas de los dos parásitos, realmente visibles. Estos resultados indican que los dos parásitos pueden diferenciarse entre si usando fragmentos de ADN. El valor de los métodos de PCR depende grandemente de los cebadores utilizados para la amplificación (37).

Al realizar inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* se obtuvo reacción cruzada con anticuerpos contra *T. rangeli*, la confirmación de la identidad del parásito se determinó por la tipificación molecular, lo cual mostró que pueden diferenciarse ambos parásitos por análisis de PCR (46).

Una de las ventajas de la amplificación por PCR de secuencias específicas de ADN del parásito PCR sobre los métodos serológicos es la rápida detección e identificación de tripomastigotes patógenos en pacientes, animales reservorios e insectos vectores. Aventura al examen serológico, ya que provee evidencia directa de la presencia de parásitos en el hospedero. Además permite observar el polimorfismo inherente en la secuencia del genoma del parásito, lo que hace posible a su vez la clasificación de especies e identificar la igualdad en cepas (47).

Recientemente los estudios que se han llevado a cabo por medio de PCR para la detección de *T. cruzi* se han realizado en muestras de sangre, utilizando ADN nuclear o ADN ribosomal. En un estudio se analizaron 100 muestras de sangre de diferentes individuos de un área de Brasil, con resultados serológicos positivos, negativos e indeterminados para anticuerpos contra *T. cruzi*, el volumen de muestra de cada paciente fue de 10 ml., el ADN se extrajo por separación física, amplificando el ADN con los cebadores 121 y 119, para los cuales se reportó un 96.5 por ciento de sensibilidad con los métodos serológicos y xenodiagnóstico. Se concluyó que el uso potencial de PCR podría tener particular importancia en casos en los que la serología no puede funcionar como un buen indicador de la presencia o ausencia de *T. cruzi*, como por ejemplo en pacientes bajo tratamiento específico o en pacientes chagásicos en fase crónica (23).

Este estudio demuestra que es posible detectar ADN del parásito en la mayoría de pacientes chagásicos con una técnica tan sensible como el PCR y que permite la detección exitosa de parásitos incluso en biopsias de corazón provenientes de pacientes que murieron por una cardiopatía chagásica crónica (28).

El siguiente paso en la validación del diagnóstico basado en PCR para la amplificación de *T. cruzi* es la evaluación de su sensibilidad y especificidad en muestras clínicas. Para este propósito se utilizaron pacientes de una ciudad de Brasil ya examinados, obteniendo como conclusión primaria para el PCR una sensibilidad del 96.5 por ciento al 100 por ciento comparado con el diagnóstico clínico y un 100 por ciento de especificidad en la técnica de PCR comparada con serología, utilizando los cebadores 121 y 122 (28).

Sin embargo, la enfermedad de Chagas posee una variabilidad de manifestaciones clínicas incluyendo baja parasitemia. El objetivo del PCR es poder realizar el diagnóstico en diferentes áreas endémicas, comparado con la serología. Otra aplicación del PCR es la amplificación de cadenas características con productos moleculares marcados para la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre (28).

Se ha observado que cuando se utilizan productos de 300 pb como sondas se obtiene bajo nivel de reacción de hibridización cruzada en los experimentos, aún en pacientes de diferentes regiones geográficas. Esto es probablemente debido a la presencia de secuencias de la región conservada del minicírculo que tienen el tamaño adecuado como para producir duplicados estables (28).

Los cebadores 121 y 122 cuyo producto de amplificación es de 330 pb tienen la característica de ligarse a un trecho de las cuatro regiones constantes de los minicírculos del ADN de *T. cruzi* reduciendo considerablemente la hibridización cruzada (48).

En base a esto los métodos moleculares pueden ser utilizados para el diagnóstico de la enfermedad. La ventaja de la alta sensibilidad del PCR permite detectar y tipificar el ADN del kinetoplasto del protozoo. Los oligonucleotidos

derivados de la secuencia de la región conservada del ADN del *T. cruzi* pueden ser usados para los análisis basados en PCR y la detección del parásito en sangre humana (29).

Aguilar y colaboradores realizaron un estudio en 1993 con 120 pacientes chagásicos crónicos encontrando que con PCR se puede obtener el 100 por ciento de sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos serológicos y el diagnóstico clínico combinados (29).

Los pacientes que reciben tratamiento para la enfermedad representan un problema para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, para lo cual las nuevas técnicas pueden ser una solución al problema (40).

En el año de 1994, en Río de Janeiro se realizó un estudio, en el que utilizaron los cebadores 121 y 122 y 5 ml de sangre, reportándose una sensibilidad del 90 por ciento comparado con pruebas serológicas. Dos estudios previos llevados a cabo en áreas endémicas del Brasil, reportaron una sensibilidad del 96.5 por ciento y 100 por ciento en las mismas condiciones. Se demostró también que el PCR puede discriminar entre pacientes parasitológicamente positivos y pacientes negativos después del tratamiento con Benzonidazol, lo que no se puede realizar con las técnicas serológicas clásicas usualmente empleadas (29).

En un estudio comparativo de las técnicas de hemocultivo, xenodiagnóstico y PCR (amplificación del kADN) con las técnicas serológicas, se evaluaron 101 muestras de regiones endémicas del noreste de Brasil, obteniéndose de un 45 al 96.5 por ciento de sensibilidad con los cebadores 121 y 122, mientras que el xenodiagnóstico y el hemocultivo mostraron del 13 al 50 por ciento respectivamente. Se determinó al mismo tiempo que la cantidad de sangre empleada es un factor importante para el éxito del diagnóstico de la enfermedad de Chagas por PCR, debido a que en estudios anteriores se reportaron resultados del 90 al 100 por ciento de sensibilidad empleando de 10 a 20 ml. de muestra de sangre de los pacientes, y un 93 por ciento con 5 ml. de muestra, comparados con la serología. Para este estudio se utilizaron 5 ml. de sangre ya que se pensó que

era suficiente puesto que el vector succiona aproximadamente 3 ml. durante el xenodiagnóstico (8).

Bosseno y colaboradores realizaron un estudio en la región de Mizque Cochabamba con 45 niños comprendidos entre 5 y 8 años de edad, con diagnóstico serológico y parasitológico positivos; y con un grupo control proveniente de Río de Janeiro y La Paz que nunca vivieron en áreas endémicas. Se reportó una sensibilidad del 93 por ciento comparada con el examen parasitológico y serológico (43).

En todos los estudios anteriormente descritos la separación del ADN se realizó por procedimiento físico con Guanidina/EDTA 6 M y calentándolas a 100 ° durante 15 minutos (8, 43).



## V. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas tradicionales para la detección de *T. cruzi* en sangre son pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra el parásito, estos métodos son sensibles pero tienen baja especificidad ya que presentan reacciones cruzadas con otros parásitos. La detección directa de *T. cruzi* por hemocultivo o xenodiagnóstico produce alta especificidad pero su sensibilidad es muy baja tomando algunas veces hasta seis meses para obtener resultados (2).

En Guatemala actualmente se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas el hemocultivo como método de amplificación biológica y los métodos indirectos para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en el suero del paciente a través de diferentes técnicas inmunológicas como hemaglutinación indirecta, aglutinación de partículas de látex, inmunofluorescencia indirecta y ELISA.

En la presente investigación se demostró la utilidad de los cebadores 121 y 122 en la técnica de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Estos cebadores fueron analizados con el financiamiento de la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA), en un proyecto regional que incluyó nueve diferentes laboratorios latinoamericanos.

Este proyecto tenía como fin, la detección directa de *T. cruzi* en muestras de sangre completa de pacientes en las distintas fases de la enfermedad, especialmente en el estadio donde aún no se han formado anticuerpos y serológicamente son negativos y en aquellas donde el hemocultivo pierde sensibilidad debido a la baja concentración de parásitos en sangre.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVOS GENERALES

5.1.1. Identificar el ADN de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre completa, a través de la amplificación de ADN con los cebadores 121 y 122 contenidos en el set de reactivos de PCR donados por IAEA/FIOCRUZ para la detección del *Trypanosoma cruzi*.

5.1.2. Contribuir al estudio de la situación actual de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1. Determinar la seropositividad de las muestras al *Trypanosoma cruzi*, detectando anticuerpos séricos mediante los métodos de aglutinación de látex, aglutinación de gelatina e inmunodifusión doble (IDD) de las muestras a las que se les realice la amplificación de ADN.

5.2.2. Comparar a través de la prueba de concordancia de Kappa los resultados obtenidos con los métodos serológicos con los resultados obtenidos por la técnica de PCR.

## VI. HIPÓTESIS

Los cebadores 121 y 122 de la región constante del ADN del minucírculo del kinetoplasto amplifican el ADN de las cepas guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo De Trabajo:

La siguiente investigación se realizó en muestras de sangre de pacientes de áreas endémicas y no endémicas de la enfermedad de Chagas de la República de Guatemala.

#### 7.1.1. Muestra:

40 muestras de sangre de pacientes distribuidas de la siguiente forma:

- 15 muestras positivas confirmadas por diagnóstico clínico y serológico, 13 con síntomas asociados a la enfermedad de Chagas como disnea, edema, prolongación en el intervalo P-R en el electrocardiograma, que fueron clasificados como pacientes en fase crónica de la enfermedad, mientras que 2 únicamente presentaban serología positiva, por lo que fueron clasificados como pacientes en fase indeterminada.
- 15 muestras de área no endémica de sin historia clínica para la enfermedad de Chagas y que no hubieran residido y/o emigrado de áreas endémicas.
- 10 muestras de áreas endémicas, sin historia clínica para la enfermedad de Chagas.

### 7.2. RECURSOS

#### 7.2.1. Recursos Humanos:

- Autor: Br. Ana Myriam Indhira Karina Vargas Gudiel.
- Asesores: Licenciado Gerardo Leonel Arroyo Catalán.  
Licenciada María Eugenia Paredes Sánchez.
- Colaboradores: Licda. María Paula de León Granados.  
Dr. Julio Cesar Argueta.

#### 7.2.2. Recursos Institucionales:

- Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA).
- Instituto Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ).

- Dirección General de Medicina Nuclear de Guatemala.

### 7.3. Materiales:

#### 7.3.1. Equipo:

- Congelador a - 80 °C.
- Congelador a - 20 °C.
- Refrigerador a 4 °C.
- Baño de María a 100 °C.
- Campana para extracción de ADN con luz UV (MJ Research, Inc.).
- Centrifuga eppendorf (Biofuge Heraeus Sept Tech).
- Termociclador (PTC™, Pelter-Effect Cycling, MJ Research, Inc.).
- Aparato horizontal para electroforesis.
- Fuente de poder.
- Fuente de luz ultravioleta.
- Balanza.
- Bloque caliente.
- Cámara fotográfica

#### 7.3.2. Materiales:

- Tubos vacutainer® con EDTA para 5 ml..
- Agujas para tubos vacutainer (21\*1.1/2).
- Camisas para extracción con vacutainer.
- Tubos de poliestireno de 10 ml. y tapa de rosca.
- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para Reacción de PCR de 0.5 ml.
- Gradillas.
- Pipeta automática de 5-40 µl.
- Pipeta automática de 40-200 µl.
- Pipeta automática de 200-1000 µl.
- Pipetas serológicas de 5 y 10 ml.
- Bulbos para pipetas serológicas.
- Puntas celestes de 200-1000 µl.

- Puntas amarillas de 1-200  $\mu$ l.
- Puntas de punta larga y flexible de 1- 300 $\mu$ l.
- Puntas de 20E.
- Puntas de 100E.
- Puntas de 10  $\mu$ l.
- Pipeta automática para PCR de 0.5-10  $\mu$ l.
- Pipeta automática para PCR de 5- 40  $\mu$ l.
- Pipeta automática para PCR de 40-200  $\mu$ l.
- Pipeta automática para PCR de 200- 1000  $\mu$ l.
- Vasos de precipitado.
- Erlenmeyer.
- Probetas.
- Papel parafilm.
- Papel aluminio
- Moldes para gel de agarosa.
- Peines para gel de agarosa.
- Placas de microtitulación.
- Algodón.
- Alcohol.
- Hipoclorito de sodio.

#### 7.3.3. Reactivos:

- Set de PCR diseñado por el instituto Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ) y proporcionado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA).
- Solución de Guanidina-HCl 6M., 200 mM. EDTA.
- Cloroformo.
- Fenol con Tris-HCl.
- Agarosa.
- Membrana de transferencia de celulosa.
- Agua desionizada.
- Buffer 10x (FIOCRUZ).

- dNTPs (FIOCRUZ).
- Gene AMP dNTPs (Perkin-Elmer®).
- Taq. ADN polimerasa (*Thermus aquaticus* recombinante en *E. coli*, no comercial y SIGMA®)
- Cebadores 121 y 122 (FIOCRUZ).
- Buffer tris base-acido bórico-EDTA 1X (Buffer TBE 1X).
- Buffer Citrato trisódico dihidratado- cloruro de sodio (Buffer 2X SSC).
- Bromuro de etidio.
- Acetato de sodio 3M.
- Etanol al 70 %.
- Solución de Transferencia "A".
- Reactivo para aglutinación de látex.
- Reactivo para aglutinación de gelatina (FUJIREBIO)
- Reactivo para inmunodifusión directa.
- Tris HCl.

## VIII. PROCEDIMIENTO.

### 8.1. Toma de muestra:

De cada muestra se colectaron 5 ml de sangre por punción venosa en tubos vacutainer® con EDTA. Se separó 1 ml de plasma para pruebas serológicas. El resto de la muestra se transfirió a un tubo de polipropileno y se le agregó el mismo volumen de Guanidina-HCl/EDTA. Se almacenó a 4 °C. por 15 días.

### 8.2. Aglutinación con partículas de látex (AGP):

El método es una técnica basada en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígenos de *T. cruzi* con la cepa guatemalteca MHOM/GT/95/SMI-07 (H7). El reactivo es producido en el Departamento de Citohistología

Se mezclaron 3 µl. de reactivo con 3 µl. de plasma en una lámina de reacción. Se colocaron en un rotor, el resultado se leyó a los 5 minutos. La

presencia de aglutinación indicó un resultado positivo, al no observarse aglutinación se reportó como negativo.

### 8.3. Aglutinación con Partículas de Gelatina FUJIREBIO (AGG):

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

Se efectuó en placas en de microtitulación con fondo en "U" llevando a cabo primero un tamizaje, al obtener resultados positivos se procedió a titular en diluciones dobles a partir de 1:8.

El procedimiento se realizó de la siguiente forma:

En el pozo número uno de la placa se colocó 175  $\mu$ l. de diluyente de muestra, 25  $\mu$ l. de suero o plasma (dilución 1:8). Se reconstituyó las partículas sensibilizadas con la solución diluyente y se dejó reposar 30 minutos. Luego se procedió a mezclar las partículas sensibilizadas y se agregó a cada pozo 25  $\mu$ l. Se mezcló y tapó con papel adhesivo para placas y se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos horas.

Al observar aglutinación en un título igual o mayor a 1:32 se tomó el resultado como positivo y al no observarse se reportó como negativo.

### 8.4. Inmunodifusión Doble (IDD):

Se preparó las láminas de agar con azida de sodio y PBS. Se dispensó en cada una de ellas aproximadamente 5 ml. de la mezcla. Luego se perforaron los agujeros usando como guía la hoja de papel milimetrado preparada para el efecto.

Se centrifugó a 3,000 r.p.m. por 5 minutos el antígeno de *T. cruzi* preparado en el departamento de Citohistología a partir de la cepa MHOM/GT/95/SMI-07 (H7) y cada uno de los sueros a evaluar. Se colocaron cuidadosamente 10  $\mu$ l. del antígeno en un pozo central y 10  $\mu$ l. de cada uno de los sueros alrededor teniendo cuidado de no estropear el agar y no rebalsar los pozos. Se incubó en cámara húmeda de 48 a 72 horas a temperatura ambiente.

Se procedió a colocar cada una de las láminas en un recipiente que contenía NaCl al 0.85 % para desproteínizarlas 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 secó completamente con aire caliente.

Se separó el papel de la lámina con cuidado para no romper el agar y se coloreó por una o dos horas con azul de Coomasie. Se destiñó con cuidado de no perder las bandas de precipitación teñidas.

Por último se secó al aire y se montó el agar sobre portaobjetos.

Se reportó como positivo las muestras que presentaron bandas de precipitación.

#### 8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

##### 8.5.1. Extracción de ADN:

Se hirvieron los tubos conteniendo sangre y guanidina en agua durante 15 minutos para promover la linearización y liberación de los minicírculos. Se almacenó a 4 °C por lo menos tres días antes de utilizarlas.

##### 8.5.2. Extracción:

Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l. y se desproteinizó de la siguiente forma:

- Se agregó fenol-cloroformo en una proporción de 1:1, se mezcló y centrifugó por 10 minutos a 12 g.

- El sobrenadante se pasó a un tubo rotulado.

- Se agregó 150  $\mu$ l. de agua al tubo anterior, se mezcló, centrifugó, y pasó el sobrenadante al mismo tubo rotulado.

- Se agregó 150  $\mu$ l. de cloroformo al tubo que contenía el sobrenadante, se mezcló, centrifugó y retiró el sobrenadante. Se midió cuidadosamente y colocó en otro tubo.

- Al sobrenadante anterior se le agregó 10 % de acetato de sodio 3 M. (1:10) y dos volúmenes de etanol para precipitar.

- Se precipitó en frío durante una noche a -20 °C, se centrifugó por 15 minutos a 1200 r.p.m. en frío.

- Se descartó el sobrenadante y se secó el tubo en un bloque caliente a 70 °C por 15 minutos.

- Se resuspendió el ADN en 50  $\mu$ l. de agua desionizada y almacenó a -20 °C.

- Amplificación del ADN Extraído:

#### 8.5.3.1. Protocolo Oswaldo Cruz:

El set se probó inicialmente con el protocolo estandarizado por el Instituto Oswaldo Cruz, Brasil (FIOCRUZ), utilizando principio caliente.

Se preparó la mezcla de reacción 1 en tubos de reacción de PCR. Se les colocó a cada tubo una perla de parafina que fue fundida y luego solidificada con el programa respectivo en el termociclador y luego se procedió a preparar la mezcla de reacción 2 en el mismo tubo de reacción de PCR.

Se trabajó con un volumen total de 50  $\mu$ l de reacción, compuesto de la siguiente forma:

reactivos	1 tubo mezcla de reacción 1	1 tubo mezcla de reacción 2
Buffer 10x (FIOCRUZ)	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
albúmina bovina (B.S.A.)	0.5 $\mu$ l	0 $\mu$ l
DNTPs 10 mM	5.0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Mezcla de cebadores (1 /1)	2.0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Taq-Polimerasa (0.5 U)	0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
agua	13.0 $\mu$ l	19 $\mu$ l
ADN	0 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l
total	23 $\mu$ l	27 $\mu$ l

Se amplificó el ADN con el siguiente programa:

ciclos	temperatura (°C)	tiempo (minutos)
1 ciclo inicial	94	2
33 ciclos intermedios	94	1
	55	1
	72	1
1 ciclo final	72	10

#### 8.5.4. Protocolo estandarizado en el Departamento de Citohistología.

Se preparó las muestras en tubos de reacción de PCR, con un volumen total de 25  $\mu$ l de reacción:

reactivos	1 tubo mezcla de reacción
Buffer 10x (FIOCRUZ)	2.5 $\mu$ l
DNTPs 10mM	4.0 $\mu$ l
mezcla de cebadores (0.5/0.5)	1.0 $\mu$ l
Taq-Polimerasa (0.5U)	1.5 $\mu$ l
agua	13.5 $\mu$ l
ADN	2.5 $\mu$ l
total	25 $\mu$ l

Se colocó las muestras en el Termociclador con el siguiente programa:

ciclos	temperatura (°C)	tiempo (minutos)
1 ciclo inicial	94	2
33 ciclos intermedios	94 60 72	1 1 1
1 ciclo final	72	10

#### 8.6. Electroforesis:

Se preparó un gel de agarosa al 2 % (electroforesis horizontal) con el número de pozos de acuerdo al número de muestras utilizadas en cada corrida. Utilizando como marcador molecular para ADN una escalera de 100 pares de bases (GIBCO BRL).

Se mezclaron las muestras con una solución compuesta por 30 % de glicerol, 0.25 % de azul de bromofenol y 0.25 % de xileno-cianol, en una

proporción de 1  $\mu$ l para cada 10  $\mu$ l de muestra. Se corrieron las muestras 30 minutos a un voltaje de 100 y aproximadamente 25 minutos a 50 V. (anexo 3)

#### 8.7. Revelado:

Se colocó el gel en una solución conteniendo 5  $\mu$ g de bromuro de etidio diluido en 50 ml. de agua desionizada, durante 15 minutos. Se decoloró en agua destilada por 15 minutos más. Se observó por transluminación UV y se fotografió.

#### 8.8. Interpretación:

La presencia de una banda de 330 pb de tamaño molecular, indicó la presencia de kADN de *T. cruzi*, por lo que se reportó resultado positivo para el PCR. (anexo 4)

#### 8.9. Diseño de la Investigación:

##### 8.9.1. Muestreo:

Se trabajó con un total de 40 muestras en un muestreo no probabilístico por cuota, distribuidas de la siguiente forma: 15 muestras positivas confirmadas por serología, procedentes de área endémica de la enfermedad de Chagas, 10 muestras de área endémica, sin historia clínica de la enfermedad y diagnóstico serológico y 15 de área no endémica sin historia clínica que no hubieran residido y/o emigrado de área endémica.

##### 8.9.2. Variable:

Amplificación de ADN para identificar *T. cruzi*.

##### 8.9.3. Análisis estadístico:

###### 8.9.3.1. Fase 1:

Se comparo las bases amplificadas con patrones electroforéticos de 330 pb.

###### 8.9.3.2. Fase 2:

La presentación de los resultados se realizó comparando la concordancia de cada uno de los métodos serológicos con PCR utilizando la prueba de Kappa.

$$f = [2(ad-bc)] / [(p_1q_2) + (p_2q_1)]$$

La sensibilidad (S) y especificidad (E), se calculó a través de la siguiente fórmula:

$S = \text{verdaderos positivos} / \text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}$

$E = \text{verdaderos negativos} / \text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}$

Se calculó el valor predictivo de la prueba positiva y el valor predictivo de la prueba negativa con las siguientes fórmulas:

$VPPP = \text{verdaderos positivos} / \text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}$

$VPPN = \text{verdaderos negativos} / \text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}$

## IX. RESULTADOS

En este estudio se evaluaron 40 muestras de sangre completa distribuidas de la siguiente forma:

- Grupo 1: 15 muestras positivas confirmadas por diagnóstico clínico y serológico (AGG e IDD), 13 en fase crónica de la enfermedad y 2 en fase indeterminada. Todas ellas procedentes de un área endémica del país.
- Grupo 2: 15 muestras de área no endémica de pacientes sin historia clínica para la enfermedad de Chagas y que no hubieran residido y/o emigrado de áreas endémicas.
- Grupo 3: 10 muestras de área endémica, de pacientes sin historia clínica y diagnóstico serológico para la enfermedad de Chagas.

A cada grupo se le realizaron las siguientes pruebas serológicas:

- Aglutinación con partículas de látex, considerándose positivas aquellas muestras que presentaron aglutinación.
- Aglutinación con partículas de gelatina, tomándose como positivas aquellas muestras que aglutinaron en un título igual o mayor a 1:32, y por último,
- Inmunodifusión doble, siendo positivas las muestras que presentaron bandas de precipitación.

Se obtuvo un 40 % de seropositividad y un 60 % de seronegatividad en el total de muestras evaluadas y para cada grupo los siguientes resultados:

- Grupo 1: 100 % de muestras seropositivas (15 muestras).
- Grupo 2: un 100 % (15 muestras) de seronegatividad.
- Grupo 3: un 10 % (1 muestra) de seropositividad y un 90 % (9 muestras) de seronegatividad.

Los resultados obtenidos para cada grupo con las diferentes pruebas serológicas se resumen a continuación en la tabla No. 1:

Tabla No. 1

## Resultados obtenidos por técnicas serológicas

Técnica	AGP		AGG		IDD		Total
	+	-	+	-	+	-	
Grupo 1	15	0	15	0	15	0	15
Grupo 2	0	15	0	15	0	15	15
Grupo 3	2	8	1	9	1	9	10
Total	17	23	16	24	16	24	40

AGP: Aglutinación con partículas de látex,

AGG: Aglutinación con partículas de gelatina,

IDD: Inmunodifusión doble

+: Positivo

-: Negativo

Se obtuvieron bandas amplificadas menores de 330 pb con el set de reactivos de FIOCRUZ, tal como estaba estandarizado por éste. Mientras que con el protocolo estandarizado por el Departamento de Citohistología utilizando la Taq ADN polimerasa de Sigma y la no comercial, se obtuvo amplificación de ADN observándose bandas de 330 pb y de 660 pb, por lo que se decidió trabajar con este protocolo las diferentes muestras.

15 muestras del grupo 1 y 4 del grupo 3 (19 muestras ó 47.5 %), presentaron resultados positivos. 21 muestras (52.5 %), presentaron resultados negativos, de las cuales 15 correspondían al grupo 2 y 6 del grupo 3 como se presenta a en la tabla 2.

Tabla No. 2

Resultados obtenidos para la técnica de PCR

Técnica	PCR		Total
	+	-	
Grupo 1	15	0	15
Grupo 2	0	15	15
Grupo 3	4	6	10
Total	19	21	40

Se determinó la sensibilidad y especificidad para la técnica de PCR comparándola con serología, a través del análisis respectivo, para lo cual se determinó a partir del total de muestras, el número de verdaderos positivos (16 muestras), verdaderos negativos (21), falsos negativos (0) y falsos positivos (3), como se presenta en la tabla 3. Calculándose una sensibilidad y especificidad del 100 % y del 87.5 % respectivamente. El valor predictivo para la prueba positiva fue de un 84.2 % y el valor predictivo para la prueba negativa de un 100 %.

Tabla No. 3

Resultados obtenidos por PCR y serología

		Serología		
		+	-	
PCR	+	16	3	19
	-	0	21	21
		16	24	40

Al comparar los resultados obtenidos por la técnica de PCR y por serología se obtuvieron los siguientes resultados para cada grupo de estudio:

- Grupo 1: El 100 % (15 muestras), presentó resultados positivos para ambas pruebas.



- Grupo 2: El 100 % (15 muestras) resultados negativos tanto para PCR como para serología.
- Grupo 3: El 10 % (1 muestras) resultados positivos en ambas técnicas, el 30 % (3 muestras) positivo para PCR y negativo para las pruebas serológicas, mientras el 60 % presentó resultados negativos para ambas pruebas (6 muestras).

Los resultados se presentan en la tabla No.4.

Tabla No. 4

Resultados obtenidos por serología y PCR

Técnica	Serología		PCR		Total
	+	-	+	-	
Grupo 1	15	0	15	0	15
Grupo 2	0	15	0	15	15
Grupo 3	1	9	4	6	10
Total	16	24	19	21	40

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

+: Positivo

-: Negativo

Las muestras fueron corridas indistintamente con la Taq de Sigma y la Taq no comercial, obteniéndose la misma especificidad en la amplificación de las bandas por lo que no se hace ninguna diferenciación en los resultados.

Los resultados obtenidos por la técnica de PCR y serología fueron analizados a través de la prueba estadística de concordancia de Kappa, obteniéndose los siguientes resultados:

- Grupo 1:

**PCR**

		PC R		
		+	-	
Serología	+	15	0	15
	-	0	0	15
		15	0	

Kappa= 1

- Grupo 2

		PC R		
		+	-	
Serología	+	0	0	0
	-	15	0	15
		15	0	

Kappa= 1

- Grupo 3

		PC R		
		+	-	
Serología	+	1	0	1
	-	3	6	9
		4	6	10

Kappa= 0.286

## X. DISCUSION

Todas las muestras fueron confirmadas por tres pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, aglutinación de partículas de látex, aglutinación de partículas de gelatina e inmunodifusión doble para que pudieran ser incluidas en cada grupo. Tomándose como positivas todas aquellas muestras que presentaron resultados serologicamente positivos en por lo menos dos pruebas, como lo recomienda la Organización Mundial para la Salud (OMS) (38).

Para el grupo 1 el 100 por ciento presentó resultados positivos en las tres pruebas serológicas realizadas.

En el grupo 2 el 100 por ciento fueron serologicamente negativas.

Para el grupo 3 el 10 por ciento presentó serología positiva mientras que el 90 por ciento serología negativa.

Del set de reactivos diseñados por FIOCRUZ, como se puede notar en la sección de reactivos, solamente se utilizaron los cebadores 121 y 122 de este instituto, el buffer 10x y dNTPs, estos últimos para realizar algunos experimentos. La Taq polimerasa de este set no fue empleada debido a que presentó resultados inespecíficos y fue perdiendo estabilidad, por lo que fue necesaria sustituirla. Por lo tanto se puede afirmar que este set bajo las condiciones establecidas por FIOCRUZ no funciona, aunque los cebadores 121 y 122 se pueden utilizar con otros reactivos, teniendo especial cuidado en mantener las concentraciones adecuadas para su buen funcionamiento.

Las bandas de amplificación observadas de 330 pb corresponden a bandas de ADN específicas, mientras que las bandas de 660 pb. se deben a los dobles de ADN formados en la reacción.

Los valores de sensibilidad obtenidos en el Proyecto Técnico Regional de Cooperación de Diagnóstico y Epidemiología de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, oscilan entre un 47 % a un 73 % comparado con serología, aunque en estudios anteriores la técnica de PCR utilizando los cebadores 121 y

122 ha demostrado tener una sensibilidad del 93 % utilizando 5 ml de sangre (43, 49).

En este estudio el valor tan alto para sensibilidad obtenido (100 %), puede verse influido por la poca cantidad de muestras analizadas, por lo que sería conveniente analizar un mayor número de muestras para así determinar el valor real de sensibilidad bajo estas condiciones.

Los valores de especificidad obtenidos en el Proyecto Regional, oscilan entre un 88 % y 99 % en general (49). Por lo que podemos afirmar que la especificidad obtenida en este estudio se encuentra entre el rango esperado. Aunque la diferencia mínima obtenida, puede deberse al número reducido de muestras estudiadas, por lo que también sería conveniente evaluar mayor número de muestras.

Los valores predictivos para la prueba de PCR utilizando los cebadores 121 y 122, para este estudio, indica que solamente el 84.2 % de los resultados positivos obtenidos son realmente positivos, mientras que el 100 % de los resultados negativos son realmente negativos.

Los datos de sensibilidad, especificidad y los valores predictivos negativo y positivo son válidos únicamente para esta investigación, debido al número reducido de muestras que se analizaron.

En el Proyecto Regional, demostraron la utilidad de la técnica de PCR para el monitoreo de pacientes que han recibido tratamiento con drogas tripanocidas. Demostraron que después de dos años de tratamiento las pruebas serológicas se mantienen positivas. Para el xenodiagnóstico la positividad disminuye de un 74 % a un 3 % después de tres meses y a un 0 % a los 24 meses, y para el PCR solamente disminuye de un 97 % a un 76 % después de tres meses y un 19 % a los 24 meses (49).

Al analizar los resultados obtenidos a través de la prueba de concordancia de Kappa se obtuvo un valor de 1 para los dos primeros grupos, mientras que para el tercer grupo se obtuvo un valor de concordancia de 0.286. Según el criterio de la prueba de concordancia de Kappa, los valores obtenidos mayores

que 0.75 demuestran una excelente concordancia, aquellos que se encuentren entre 0.40 y 0.75 demuestran una buena concordancia y los que sean menores a 0.40 indican una pobre concordancia.

En los diferentes experimentos realizados en los laboratorios participantes en el Proyecto Regional, se obtuvo una concordancia para serología y PCR en aquellos pacientes con serología positiva e historia clínica para la enfermedad de Chagas de un 47 % a 81 %, mientras que en este estudio fue del 100 %. La diferencia obtenida entre estos valores, puede deberse a la poca cantidad de muestras analizadas o bien a las modificaciones realizadas, en el protocolo de amplificación, como lo fue el cambio de la temperatura de hibridación de 55° a 60 ° C, ya que la taq no comercial presentaba mejor actividad a esa temperatura.

En cuanto al tercer grupo de muestras se observó una pobre concordancia entre serología y PCR, lo cual puede deberse a diferentes causas como:

- Una posible contaminación del ADN, o bien que las muestras estuvieran contaminadas antes de la extracción de ADN.
- Contaminación de la mezcla de reacción aún cuando siempre se realizó el control interno de la reacción (control PCR), el cual fue negativo para todos los experimentos realizados.

Se tomaron las precauciones ya establecidas para realizar el PCR sin contaminación cruzada en el proceso pre y post - PCR que pudieran llevar a obtener falsos positivos. Se trabajó en áreas separadas de pre y post amplificación, al igual que existía un área de preparación de muestras. El área de preparación de reactivos se irradió con luz UV por 30 minutos para evitar cualquier contaminación previo a la preparación del master mix. Todos el equipo, material y reactivos fueron personalizados y de uso exclusivo para PCR. Todos los reactivos de PCR fueron alicuotados para ser utilizados en las cantidades necesarias en los experimentos y almacenados a -20° C. En cada análisis realizado se corrió un control positivo, que se preparó en el laboratorio infectando 5ml. de sangre con tripomastigotes, un control negativo de una muestra negativa

serológicamente y procedente de área no endémica, y un control interno de PCR, con el cual se controló la mezcla de reacción.

- Hay que tomar en cuenta que estas muestras provienen de un área endémica para la enfermedad de Chagas, y es probable que se trate de una infección reciente en la que no hay producción de anticuerpos, pero presentan una parasitemia detectable. No hay que olvidar que debido a las distintas fases de la enfermedad la respuesta humoral no es detectable ya que necesita de varias semanas para poder serlo (43). Una de las características de la enfermedad es que frecuentemente no se encuentran manifestaciones clínicas, la duración de la fase aguda es de 4 a 8 semanas y es durante esta etapa en la que parásito se encuentra circulante en la sangre por lo que es muy fácil detectarlo con PCR, mientras que en el cultivo puede tomar varios meses obtener un resultado.

## XI. CONCLUSIONES

1. Los cebadores 121 y 122 utilizando el protocolo estandarizado en el departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, identifican el ADN de *T. cruzi*.
2. Las técnicas de aglutinación de partículas de látex, aglutinación de partículas de gelatina e inmunodifusión doble, detectaron anticuerpos anti *T. cruzi*, en un 40 por ciento de las muestras evaluadas.
3. En base a los resultados de concordancia obtenidos para cada grupo de muestras se puede afirmar que para el grupo uno y dos existe una excelente concordancia entre serología y PCR.

## XII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar reacciones cruzadas de los cebadores 121 y 122 en muestras de pacientes con leishmaniasis cutánea.
2. Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR utilizando los cebadores 121 y 122 con mayor número de muestras.
3. En base a los resultados obtenidos, promover por parte de la Dirección General de Servicios de Salud, a través del Area de Malaria, asistencia para aquellas personas infectadas con *T. cruzi* de las diferentes áreas endémicas evaluadas que aún no son parte del programa de Chagas de esta institución.



## XIII. REFERENCIAS

1. Brown, HW, NEVA, FA. Parasitología Clínica. 5ta. ed. México: Editorial Interamericana, 1985. 360p.(p.59-70).
2. UNPD/WORLD BANK/WHO. Tropical Disease. Progress in International Research, 1989;88:79-84.
3. Velásquez, E. *et.al.*, Cambios Electrocardiográficos en Habitantes de un Área Endémica para la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Año 1993 CL+82-89.
4. Hurtarte, S. *et.al.*, Situación Epidemiológica de las Enfermedades Cardiacas en Guatemala. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1994 CCVII 57-75.
5. Luquetti, A.O. Use of *Trypanosoma cruzi* Defined Proteins for Diagnosis Multicentre Trial Serological and Technical Aspects. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 1990;vol 85:497-505.
6. Díaz, C. *et.al.*, An Improved Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood. Am.J.Trop.Med.Hvg. 1992;vol 46:616-623.
7. Britto, C. *et.al.*, A Simple Protocol for Physical Cleavage of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA Present in Blood Samples and Its Use In Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Diagnosis of Chronic Chagas Disease. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 1993;vol 88:171-172.
8. Angela, C.V. *et.al.*, Comparison of Polymerase Chain Reaction with Two Classical Parasitological Methods for the Diagnosis of Chagas Disease in an Endemic Region of North-eastern Brazil. Trop.Med. Hvg. 1996;vol 90:129-132.
9. Mejía, M. *et.al.*, Reservorios de la Enfermedad de Chagas. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1994 VIII+121-124.
10. Aguilar, J. Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala: 1932-1990 Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1993 CL+1-23.

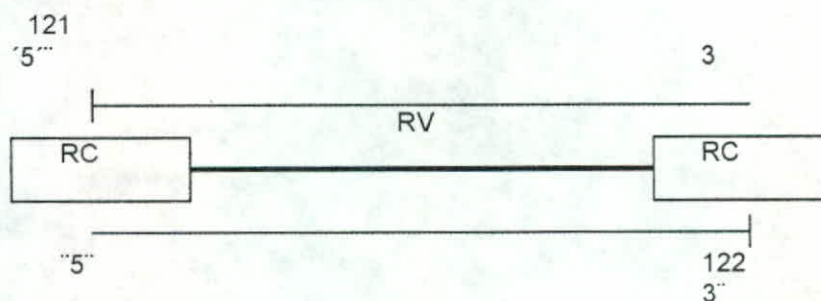
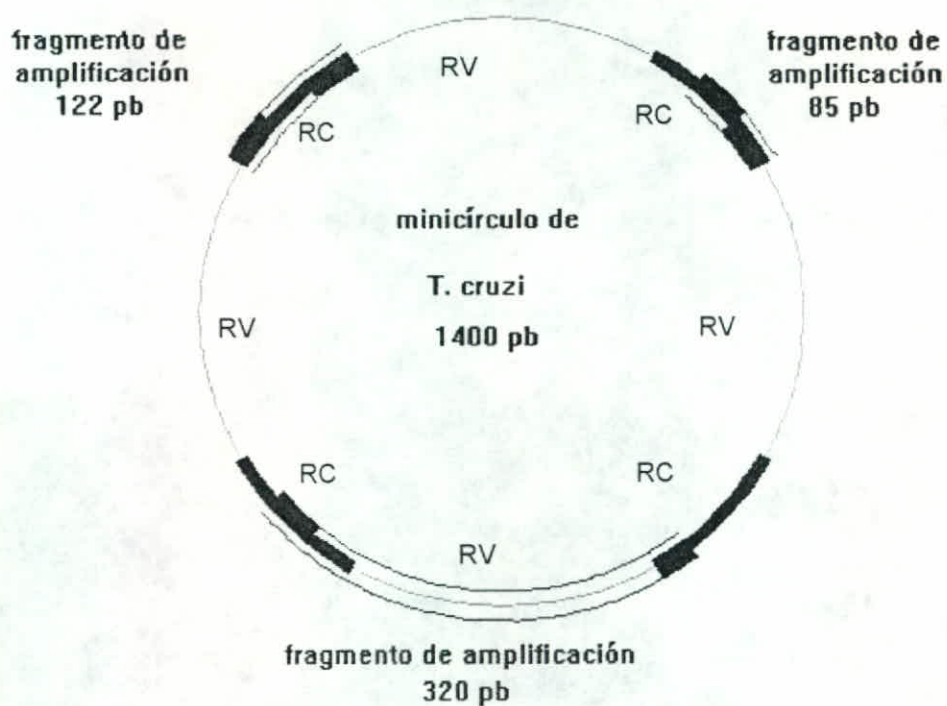
11. Stercorarian Trypanosomiasis. [http:// martin.parasitology.mcgill.ca / jimspage / biol / tcruzi](http://martin.parasitology.mcgill.ca/jimspage/biol/tcruzi).
12. de Tercero, C. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Ogata Editor. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1992 CL+103-104.
13. Aguilar, J. Parasitología Médica. 2a. ed. Guatemala:C.A., Litografía Delgado S.A., 1991.366p.(p.245-261).
14. Epstein, D. Progress Being Made Against Deadly Chagas' Disease. PAHO Doc.Tec., Jan, 1997. <http://www.medscape.com/>
15. Meza, F. *et.al.*, Estudio Serológico de la Enfermedad de Chagas en Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR). Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV +39-42.
16. Monroy, C. *et.al.*, Ecología Intradomiciliar de *Triatoma dimidia* en Santa María Ixhuatán. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Año 1995 IV +109-119.
17. Tabaru, Y. *et.al.*, Producción Masiva y Comportamiento de *Triatoma dimimdiata* y *Rhodnius prolixus*. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV +104-108.
18. Botero, D, Restrepo, M. Parasitosis Humanas. 2da. ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas, 1994. 418p.(p.191-198).
19. Hirayama, K. *et.al.*, Analysis of Polymorphism of the Gene Encoding the Cysteine Protease from Different Strains of *Trypanosoma cruzi*. Ogata Editores. Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV+59-62
20. Simpson, L. A New Blood Test for Chagas Disease. [http:// www.hhmi.org / communic / bulletin / feb96 / chagas](http://www.hhmi.org/communic/bulletin/feb96/chagas).
21. Degraeve, W. Peculiar Sequence Organization of Kinetoplast DNA Minicircles from *Trypanosoma cruzi*. MBP. 1988;27:63-70.

22. Avila, H. *et.al.* Schizodeme Analysis of *Trypanosoma cruzi* Stocks from South and Central America by Analysis of PCR-Amplified Minicircle Variable Region Sequences. *MBP.* 1990;42:175-188.
23. Winker, P. *et.al.*, Use of a Simplified Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients in a Rural Endemic Area. *Am. J. Med. Hyg.* 1994;51(5):000-000.
24. Sturm, N. *et.al.*, Sensitive Detection and Schizodeme Classification of *Trypanosoma cruzi* Cells by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA Sequences: Use in Diagnosis of Chagas' Disease. *MBP.* 1989;33:205-214.
25. Paredes, ME. Aspectos Moleculares de la Enfermedad de Chagas. *Mem.XI Congreso Centroamericano de Microbiología.* 1997;33-34.
26. Apostol, B. *et.al.*, Estimation of the Number of Full Sibling Families at an Oviposition Site Using RAPD-PCR Markers: Applications to the Mosquito *Aedes aegypti*. *Theor. Appl. Genet.* 1993;86:991-1000.
27. Black, W. PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care. *Insect Molecular Biology.* 1993;2(1):1-6.
28. Britto, C. *et.al.*, *Trypanosoma cruzi*. Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization. *Experimental Parasitology.* 1995;81:462-471.
29. Degrave, W. *et.al.*, Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* Using the Polymerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):367-368.
30. Matta, V. *et.al.*, Caracterización de la Cepas Guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi* en Base a su Curva de Crecimiento *in vivo*. Ogata Editores. *Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV +51-55.*
31. Rosales, E. *et.al.*, Caracterización Bioquímica de los Aislamientos y Cepas de *Trypanosoma cruzi* Aislados de la Sangre Humana y *Triatoma dimidiata* a través de Ratón en Guatemala. Ogata Editores. *Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV+48-50*

32. Souto, R. *et.al.*, DNA Markers Define Two Major Phylogenetic Lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996;83:141-152.
33. Carrasco, H. *et.al.*, Genetic Exchange as a Possible Source of Genomic Diversity in Sylvatic Populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1996;54(4):418-424.
34. Bogliolo, A.R. *et.al.*, Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*. evidence of genetic recombination. *Acta Tropica*. 1996;61:31-40.
35. Higo, H. *et.al.*, The Differences of Structure of *Trypanosoma cruzi* Isolates from Central and South Americas . Ogata Editor. *Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1996 IV+105-108*
36. Gil, M. *et.al.*, Immune Response to *Trypanosoma cruzi* Epimastigote Antigen of the Patients with Chagas' Disease and of Inhabitants in an endemic Area in Guatemala. Ogata Editor. *Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1995 IV+9-14.*
37. Kaneda, Y. *Molecular Biology in Chagas' Disease*. Ogata Editor. *Enfermedades Tropicales:JICA. Informe Anual Guatemala. Misión Japonesa Doc. Tec. Año 1996 IV+34-37.*
38. De León, M.P. *Estudio Clínico, Serológico y Epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Santa María Ixhutatán, Santa Rosa. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 72p.*
39. Camargo, M. *et.al.*, An appraisal of Chagas' Disease Serodiagnosis. In "Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT. 1992; 165-178.
40. Britto, C.*et.al.*, Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Blood Samples as a tool Diagnosis and Treatment Evaluation. *Parasitol.* 1995;110:000-000.
41. Zingales, B. *et.al.*, Use of Two Recombinant Proteins of *Trypanosoma cruzi* in the Serological Diagnosis of Chagas' Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1990; 85(4):519-522.

42. Coen, M. Enzymatic Amplification of DNA by PCR. p. 15.1.4 -15.1.4. (In The Polymerase Chain Reaction). Boston, U.S.A.: Current Protocols MB. 1991.
43. Bosseno, M. *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. J. Microbiol Letters. 1994;124:419-424.
44. Rolfs, A. *et al.* PCR: Clinical Diagnostics and Research. Germany:Springer-Verlag, 1992, 271p.(p 244-245).
45. Birch, D. *et.al.*, Simplified Hot Start PCR. Nature. 1996;381:445-446.
46. Coura, J. *et.al.*, Human Infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trop.Med. Hvg.1996;vol;90:278-279.
47. Ramos, A. *et.al.*, Detection and Identification of Human Pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* Species by Hybridization of PCR-Amplified Mini-exon Repeats. Parasitol. 1996;82:242-250.
48. Treinamento Regional no Diagnóstico e Tipagem de Tripanosomatídeos Patogênicos de Humanos. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-Instituto Oswaldo Cruz. Ministério de Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Brasil. Doc. Tec. Año 1997.
49. Regional Technical Co-Operation Project on Diagnosis and Epidemiology of Chagas Disease and Leishmaniasis using Radionuclide DNA Probe Technology. Tc-RLA06/26/final report, 1999.
50. Current Protocols. The Polymerase Chain Reaction, Supplement 26 Current Protocols MB. Copyright© 1994.

## ANEXO No.1

Minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi*

Esquema de la organización de las moléculas del minicírculo del kinetoplasto del *T. cruzi*, presentando las cuatro regiones constantes (RC) y las regiones variables (RV), cuyo tamaño aproximado es de 1.42 kb.

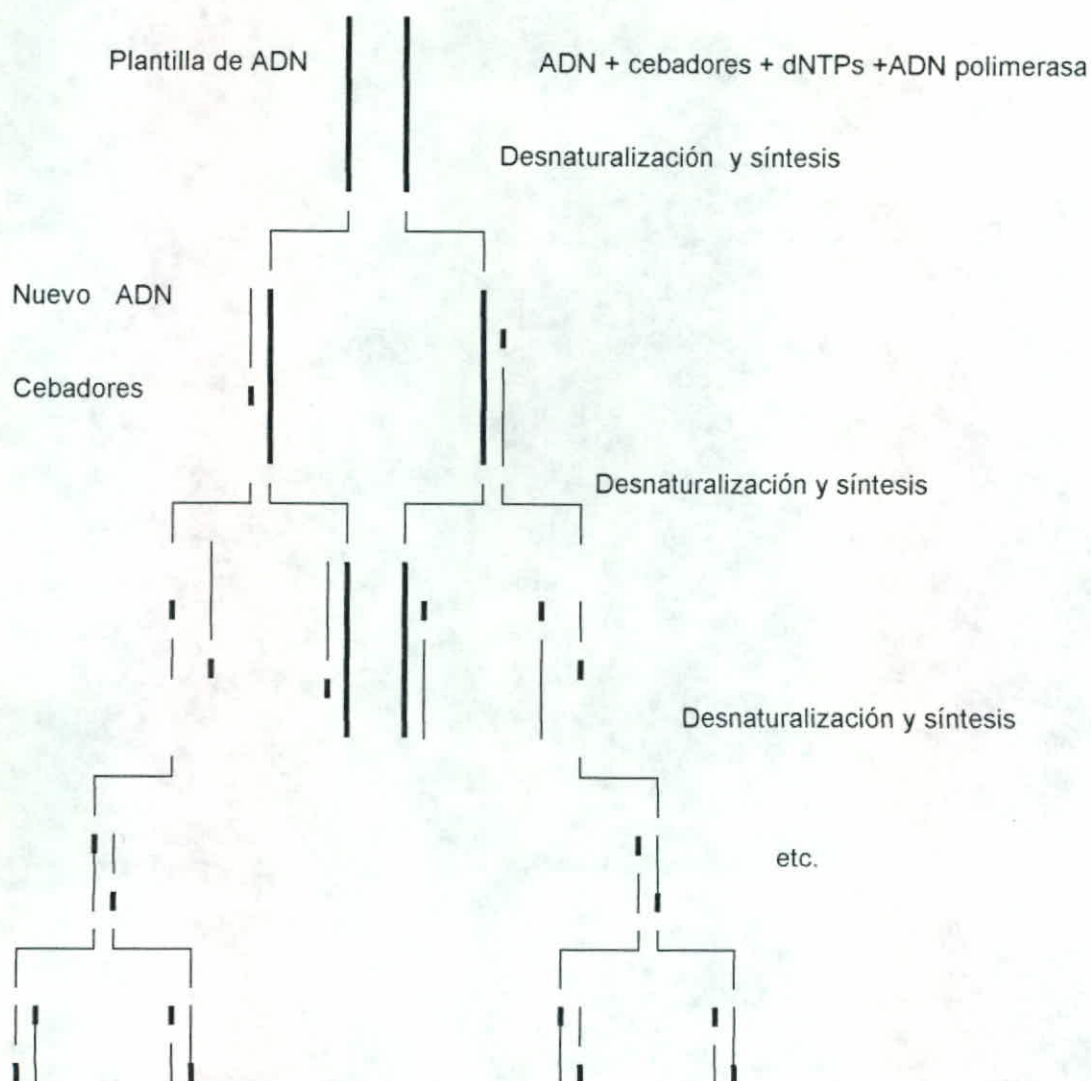
Tomado de:

Sturm, N. *et.al.*, Sensitive Detection and Schizodeme Classification of *Trypanosoma cruzi* Cells by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA Sequences: Use in Diagnosis of Chagas' Disease. *Mol. Bio. Parasy.* 1989;33:205-214.

Bosseno, M. *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. *J. Microbiology Letters.* 1994;124:419-424.

## Anexo No. 2

### Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

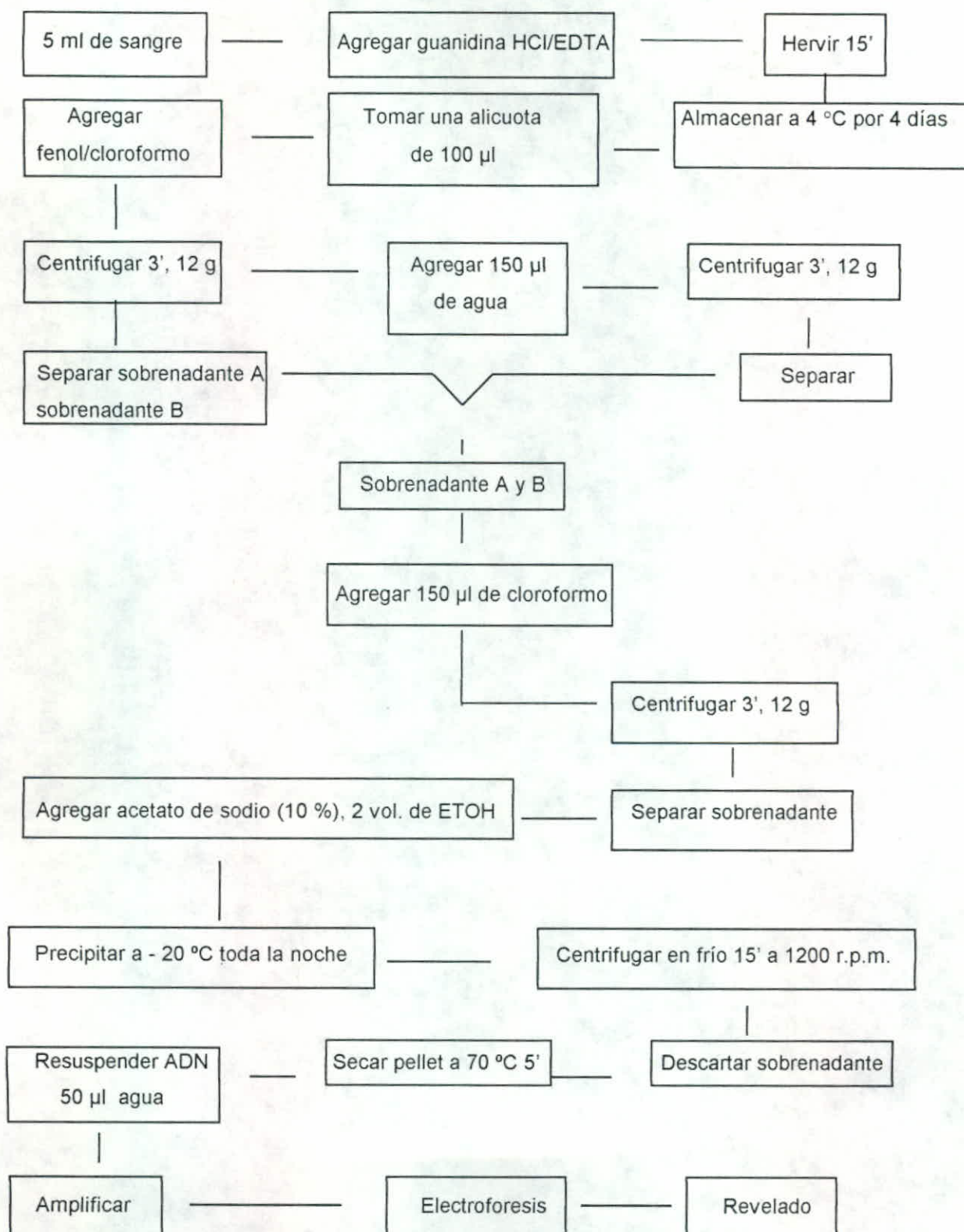


Reacción en cadena de la polimerasa. El ADN amplificado es desnaturalizado por calentamiento de la muestra. En presencia de la ADN polimerasa y dNTPs, los oligonucleótidos hibridizan una secuencia blanco específica, sintetizando nuevo ADN. El primer ciclo produce fragmentos de longitud indeterminada, sin embargo, el segundo ciclo produce un fragmento de longitud corta "producto corto", los cuales se acumulan exponencialmente con cada amplificación sucesiva. De esta forma se puede amplificar un millón de veces este fragmento, en un proceso de 20 a 30 ciclos.

Tom Current Protocols. The Ppolymerase Chain Reaction, Supplement 26 CPMB. Copyright© 1994ado de:

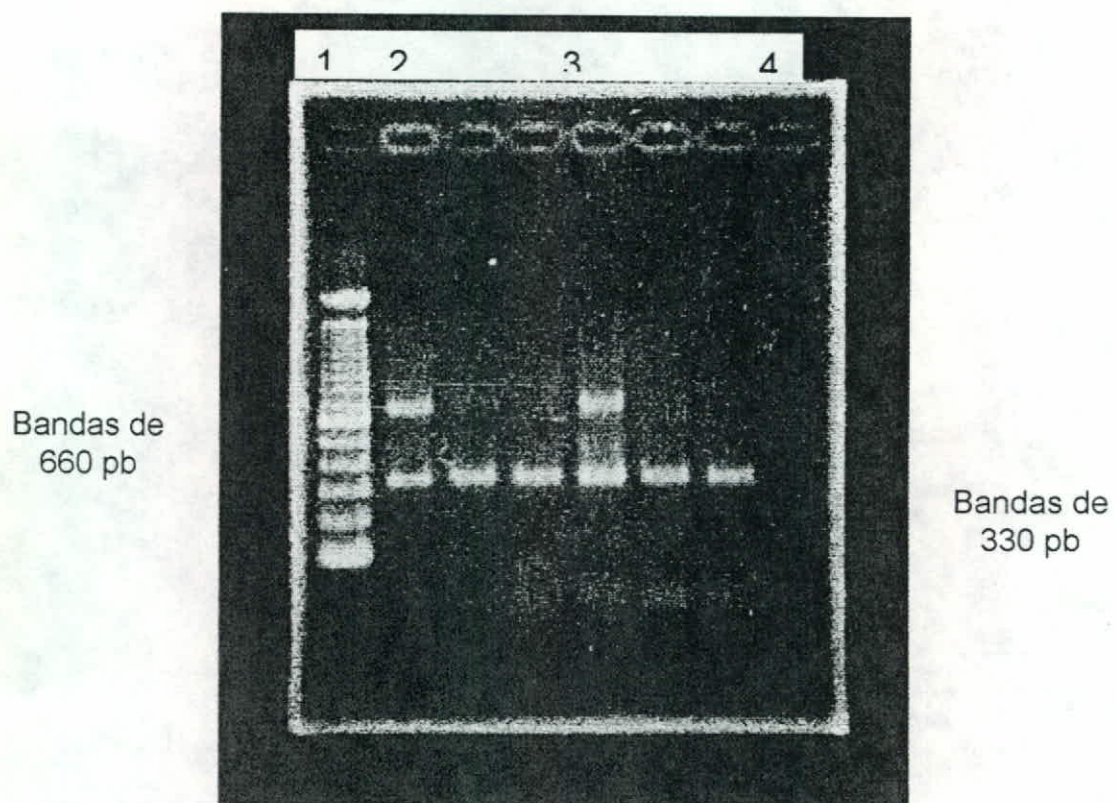
## Anexo No.3.

## Procedimiento para Extracción de ADN.





Anexo No. 4.  
Identificación de ADN amplificado.



1. Marcador de ADN.
2. Control positivo.
3. Muestras.
4. Control PCR.



Ana Myriam Vargas Gudiel

Tesista



Lic. Gerardo Arroyo

Asesor




Licda. Maria Eugenia Paredes

Asesora



Licenciada Heidi Logemann Lima

Directora



Licenciada Hada Marieta Alvarado Beteta

Decana