

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL
MUNICIPIO DE OVEJAS-SUCRE

VIVIAN ISABEL BARBOZA BERTEL

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SINCELEJO**

2003

**REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL
MUNICIPIO DE OVEJAS-SUCRE**

VIVIAN ISABEL BARBOZA BERTEL

**Trabajo de Grado presentado como
requisito parcial para obtener el título
de Biólogo con énfasis en
Biotecnología.**

DIRECTOR

PEDRO JOSE BLANCO TUIRAN

Magíster en Medicina Tropical

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SINCELEJO
2003**

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

_____ *Jurado*

Jurado

Ciudad y Fecha (día, mes, año)

DEDICATORIA

- ♥ A **Dios, PADRE TODO PODEROSO**, por permitirme vivir en zona de riesgo, vencer mis temores y los obstáculos presentados durante todo el camino de mi formación y quitarme la venda de mis ojos que me hacía ver todo difícil.

- ♥ A mis padres, **Francia y Roberto**, por su gran amor, por sus esfuerzos y sacrificios que permitieron sacarme adelante y llegar a cumplir uno de mis más anhelados sueños. **Los amo y extraño.**

- ♥ A mis hermanos, **Cleo y Lucho**, por saber tolerar mis estados de ánimo. **Los quiero y extraño.**

- ♥ A mi esposo, **Juan Carlos**, por su amor, comprensión, apoyo y sobre todo saber tolerar mis innumerables ausencias en nuestro hogar. **Te amo mucho.**

- ♥ A mis familiares, **maternos y paternos**, por ofrecerme su ayuda en aquellos momentos en que se las solicite. **Gracias**

Vivian Isabel.

AGRADECIMIENTOS

- ♥ A **Dios**, por darme la vida y permitir cumplir uno de mis sueños.

- ♥ A **mami, papi, Cleo, Lucho y Juan** por quererme y confiar en mí.

- ♥ A la **UNIVERSIDAD DE SUCRE** y todos los Docentes que contribuyeron en mi formación académica.

- ♥ A **Pedro José Blanco Tuiran** por su gran oportunidad, por confiar en mí y por todo el apoyo moral y logístico brindado durante el desarrollo de este proyecto. Siempre le estaré agradecida.

- ♥ Al Doctor **Wualberto Buelvas**, Director de la E.S.E del Municipio de Ovejas-Sucre por su gran apoyo y colaboración en el desarrollo de mi trabajo de campo.

- ♥ Al Doctor **Ivan Dario Velez**, miembro del PECET, por su valiosa colaboración al suministrarme el control positivo para la optimización de la técnica PCR.

- ♥ A mi compañera de estudio **Iris Rocío Payarez Díaz** por estar conmigo al inicio de este proyecto. Gracias.

- ♥ A los auxiliares de enfermería de la E.S.E de Ovejas: **Yudis De Pelufo**, por su ayuda y confianza, a **Ana Viloría y Carlos Pérez** por acompañarme en todas aquellas caminatas bajo el intenso sol, para la toma de mis muestras.

- ♥ A las señoras **Betty** y **Natividad**, en Flor del Monte por cuidar de mí.
- ♥ A los habitantes seleccionados del municipio de Ovejas por participar en este proyecto, ya que sin ellos no hubiese sido posible la realización de este.
- ♥ Al profesor **Tulio Amaya** por su ayuda en aquellos momentos en que se la solicite.
- ♥ Al profesor **Justo Fuentes Cuello**, por su enseñanza e invaluable colaboración en la sistematización de mis datos de trabajo de campo. Muchísimas gracias
- ♥ A todos mis compañeros de estudio y de laboratorio: **Diargys, Suljei, Matilde, Elvis, Nina, Jorge** y **Yair** por su gran compañerismo y ayuda en los momentos de decadencia. Los voy a extrañar.
- ♥ A la Doctora **Graciela Herrera de Porras** por brindarme su ayuda en los momentos en que se la solicite y permitirme estar allí.
- ♥ A todas las personas que laboran en el Centro de Diagnostico Medico por su colaboración y compañerismo: **Carmen, Yamile, Edelmira, Cristina, Mercedes, Nohora, Rubys, Brunilda** y a los señores **celadores** por permitirme la entrada en horas y días no hábiles.
- ♥ A la profesora **Dary Luz Meza**, por todo su apoyo y compañerismo en los algunos momentos difíciles de mi proyecto.
- ♥ A la señora **Edith Bertel de Domínguez** por brindarme el tiempo necesario para llevar a cabo mi investigación.
- ♥ A todas las innumerables personas que de una u otra forma me colaboraron.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Pág.
FOTOGRAFIA 1. Morfología del <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
FOTOGRAFIA 2. <i>Rhodnius prolixus</i> , vector transmisor del parásito, <i>Trypanosoma cruzi</i> , causante de la enfermedad de Chagas.....	9
FOTOGRAFIA 3. Ciclo biológico del <i>Rhodnius prolixus</i>	11
FOPTOGRAFIA 4 (a): Vivienda adecuada para el establecimiento y reproducción del vector transmisor de <i>T. cruzi</i> b). Lugar predilecto por los vectores para su establecimiento y reproducción.....	12
FOTOGRAFIA 5. <i>Rhodnius sp.</i> alimentándose	13
FOTOGRAFIA 6. <i>Rhodnius sp.</i> lleno de sangre después de haberse alimentado.....	13
FOTOGRAFIA 7. Complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña-Mazza.....	18

FOTOGRAFIA 8. Vivienda del Barrio San Isidro.....	47
FOTOGRAFIA 9. Vivienda del Barrio Boca Canoa.....	47
FOTOGRAFIA 10. Salida hacia la Peña.....	48
FOTOGRAFIA 11. Vivienda del Barrio El Oasis.....	48
FOTOGRAFIA 12. Vivienda del Barrio el Corozo.....	48
FOTOGRAFIA 13. Amplificación del PCR para optimizar la concentración de MgCl ₂ , utilizando ADN de <i>T. cruzi</i> a 250 µG/µL.....	53
FOTOGRAFIA 14. Amplificación del PCR para optimizar la concentración de ADN de <i>T. cruzi</i> (control positivo).....	54
FOTOGRAFIA 15. Amplificación de ADN de <i>T. cruzi</i> variando su concentración en pG/µL.....	55
FOTOGRAFIA 16. Amplificación de ADN de <i>T. cruzi</i> a 100 pG/µL (control positivo) variando la concentración del Cloruro de Magnesio(MgCl ₂)	56
FOTOGRAFIA 17. Amplificación de ADN de <i>T. cruzi</i> (control positivo) una vez optimizada la técnica PCR.....	57
FOTOGRAFIA 18. Amplificación de ADN de muestras de sangre de Individuos positivos y negativos para la enfermedad de Chagas.....	61



LISTA DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. Cebadores específicos para <i>Trypanosoma cruzi</i> usados en la optimización del PCR.....	41
CUADRO 2. Condiciones aplicadas para la optimización del PCR.....	41
CUADRO 3. Distribución de la muestra poblacional que participó en él estudio y que habita en área rural (veredas).....	49
CUADRO 4. Distribución de la muestra poblacional que participó en el estudio seleccionada en la E.S.E y que habita en área rural (veredas).....	50
CUADRO 5. Distribución de la muestra poblacional que habita en zona urbana y periurbana.....	50
CUADRO 6. Distribución de la muestra poblacional desplazada del área rural (veredas) que habita en zona urbana y periurbana de la cabecera municipal.....	51

CUADRO 7. Características generales de individuos con PCR positivo para la enfermedad de Chagas.	58
--	----

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
GRAFICA 1. Etapas de un ciclo de PCR.....	30
GRAFICA 2. Conocimiento de la existencia de los vectores en las áreas rural y urbana del municipio de Ovejas.....	46
GRAFICA 3. Distintos síntomas de la enfermedad presentados en la población estudiada.....	46
GRAFICA 4. Resultados del PCR de la muestra poblacional.....	59

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Ubicación Geográfica de la zona de estudio en el departamento de Sucre-Colombia.....	78
ANEXO B. Encuesta N° 1.Encuesta de Investigación de trabajo de campo sobre la enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas-Sucre.....	79
ANEXO C. Consentimiento Informado N° 1.....	82
ANEXO D. Consentimiento Informado N° 2.....	83
ANEXO E. Condiciones de las viviendas visitadas que favorecen el establecimiento y reproducción de los vectores.	84
ANEXO F. Distribución Geográfica de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ADN:</i>	<i>Acido desoxirribonucleico.</i>
bp:	Pares de bases.
°C:	Grados Celsius.
Cm:	Centímetros.
dATP:	Desoxiadenosintrifosfato.
dCTP:	Desoxicitosintrifosfato.
dGTP:	Desoxiguanosintrifosfato.
dNTPs:	Desoxirribonucleotidos trifosfatados.
dTTP :	Desoxitimidintrifosfato.
ELISA:	Ensayo Enzimático Inmunoabsorbente.
E.S.E:	Empresa Social del Estado.
Grs:	Gramos.
Has:	Hectareas.
HAI:	Hemaglutinación Indirecta.
H:	Hombres.
IgG:	Inmunoglobulina G.
IgM:	Inmunoglobulina M.
IFI:	Inmunofluorescencia Indirecta.
K-ADN:	Acido desoxirribonucleico de Kinetoplasto.
Kgr:	Kilogramo.
Km:	Kilometro.
mG :	Miligramos.
Mg:	Magnesio.
mL:	Mililitros.
min:	Minutos.
mm:	Milímetros.
M:	Mujeres.
mM:	Milimolar.
Nm:	Nanometro
n.s.m	Nivel sobre el mar.
Mts:	Metros.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pG:	Picogramos.
P/V:	Peso sobre volumen.
r.p.m:	Revoluciones por minuto.
Seg:	Segundos.
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

Sp: Especie
Taq: Polimerasa *Termus aquaticus*.
μ: Micra (o).
μG: Microgramos.
μL: Microlitros.

**“ UNICAMENTE LOS AUTORES SON LOS RESPONSABLES DE
LAS IDEAS EXPUESTAS EN EL PRESENTE TRABAJO ”**
(Resolución 004 del 2001, Artículo 12)

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA N° 1. Distintas formas que presenta el <i>Trypanosoma cruzi</i> en su ciclo de vida.....	6
FIGURA N° 2. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
FIGURA N° 3. Proceso de Desnaturalización de ADN.....	31
FIGURA N° 4. Proceso de Hibridización cebadores ADN blanco.....	31
FIGURA N° 5. Proceso de extensión (Polimerización).....	31

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBJETIVOS.....	24
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
2. MARCO REFERENCIAL	25
2.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA.....	25
2.2 AGENTE DE TRANSMISIÓN O VECTOR.....	30
2.2.1 El Vector Domiciliario	31
2.2.2 Desarrollo del Vector.....	31
2.2.3 Hábitos de Vida	32
2.3 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	13
2.4 EVOLUCION Y MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	37
2.4.1 Período agudo:.....	37
2.4.2 Período de Latencia	39
2.4.3 Período Crónico.....	40
2.5 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD	41
2.5.1 Transmisión Vectorial.....	20
2.5.2 Transmisión Congénita.....	20
2.5.3 Transmisión Transfusional	21
2.5.4 Transmisión por contaminación accidental en el laboratorio.....	21
2.5.5 Transmisión por el manejo de animales infectados.....	21
2.5.6 Transmisión por trasplante de órganos.....	22
2.5.7 Otras formas posibles.....	22
3. TRATAMIENTO PARA LA INFECCIÓN POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>.....	43
4. TECNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO	44
4.1 Técnicas directas:	45
4.2 Técnicas indirectas:	46
4.3 Técnicas serológicas:.....	47

5. TÉCNICA MOLECULAR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	49
5.1 Fundamento de la técnica PCR.....	50
6. METODOLOGÍA	56
6.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	56
6.2 TIPO DE ESTUDIO.....	35
6.3 UNIVERSO	57
6.4 POBLACION DE ESTUDIO	57
6.5 TRABAJO DE CAMPO	58
6.5.1 Toma de las Muestras de Sangre	59
6.6 TRABAJO DE LABORATORIO	59
6.6.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	59
6.6.1.1 Protocolo de Lisis de Sangre Entera:	59
6.6.1.2 Protocolo de Extracción de ADN con Sal de Alta Molaridad.....	60
6.6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	60
6.6.3 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL PCR A TRAVÉS DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	63
6.6.3.1 Análisis de los Geles de Agarosa al 0.5%	64
7. RESULTADOS	44
7.1 TRABAJO DE CAMPO	65
7.2 TRABAJO DE LABORATORIO.....	73
7.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR).....	73
7.2.1.1 Ensayos para la optimización del PCR.....	73
8. DISCUSIÓN	83
9. CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	77

RESUMEN

La Trypanosomiasis Americana o mal de Chagas es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* que normalmente se transmite al ser humano a través de insectos Triatomíneos estrictamente hematofagos, de la familia Reduviidae (Guhl, 2000).

La importancia del estudio en esta patología radica en la gran morbimortalidad de la forma crónica de la enfermedad que se manifiesta con la dilatación de diversos componentes del sistema digestivo y la miocardiopatía dilatada (Hiller et al, 2000).

Para diagnosticar la enfermedad se optimizó la técnica molecular PCR con la que se detectaron 8 individuos que mostraron amplificación dentro de una muestra poblacional de 165 habitantes de las áreas rural (veredas), periurbana y urbana del municipio de Ovejas –Sucre.

Para obtener los resultados se trató cada muestra de sangre periférica con un protocolo de extracción de ADN con sal de alta Molaridad (Acetato de Potasio 5M) y el ADN se amplificó utilizando cebadores específicos (s-121 y s-122) para *T. cruzi*, permitiéndose así la obtención de un fragmento de ADN de 330 pb de una de las cuatro regiones variables de los minicírculos del K-DNA del parásito.

Los 8 casos positivos representan el 4.85% de la muestra poblacional estudiada, dentro de la cual se encuentran 3 muestras de adultos (37.5%), con edades entre los 18 y 31 años, y 5 muestras de menores (62.2%) con edades entre los 6 y 14 años, de un total de 91 adultos (55.15%) y 74 menores (44.85%). Seis casos de la infección son del área rural y 2 del área urbana, presentando mayor riesgo de infección los del área rural sin descartar la posibilidad de infección para los habitantes de las áreas urbana y periurbana del municipio de Ovejas-Sucre.

ABSTRACT

The American Tripanosomiasis or Chagas disease is a chronic parasitic illness caused by the flagellated protozoo *Trypanosoma cruzi* and is normally transmitted by the bite of insects belonging to family Reduviidae (Guhl,2000).

The study of this pathology is important due to the great morbimortality of its chronic form manifested by dilation of several organs (heart, colon) (Hiller *et al*, 2000).

The diagnosis of the disease has been improved by the development of molecular techniques like PCR. Using this approach it was possible to detect eight individuals infected with *Trypanosoma cruzi* in samples from 165 people living in the rural, periurban and urban areas from the municipality of Ovejas- Sucre.

In order to obtain ADN from the blood samples they were treated with high concentration salts (potassium acetate 5 M) and the obtained ADN was amplified using specific primers (s-121 and s-122) for *Trypanosoma cruzi* allowing to amplify the DNA fragment of 330 bp from regions in minicircles of K-DNA.

The 8 positive cases represent the 4.85% of the studied population; three of them were adults and five were children. Six of the positive cases were living in the rural area and two in the urban area; this shows greater risk of contracted disease in this area however, the study showed that it is possible to become infected in that urban area.

INTRODUCCIÓN

La infección humana por *Trypanosoma cruzi* se presenta en extensas zonas de Centro y Sur América y en regiones australes de Norteamérica. Varias de las poblaciones afectadas acusan una elevada incidencia de la infección y el número de personas que sufren de Tripanosomiasis se calcula en varios millones; al mismo tiempo que decenas de millones están en riesgo de padecer la enfermedad (Guhl *et al*, 1.999).

La enfermedad afecta a un gran número de individuos en Brasil y otros países de Sur y Centroamérica. Tradicionalmente limitada a áreas rurales o a sitios habitados por inmigraciones de áreas endémicas. Ésta infección puede desarrollarse en países, principalmente, a través de las transfusiones de sangre contaminada; algunos casos de infección aguda por *T. cruzi* son causados por transplantes de órganos (Almeida *et al*, 1.997).

Las autoridades gubernamentales y de la salud así como la propia población de los países en donde ocurre la parasitosis están cada vez más conscientes de la enfermedad o mal de Chagas. En consecuencia se viene investigando de manera creciente las formas de mejorar los métodos de diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana. En América del Sur generalmente se utilizan las técnicas de Hemaglutinación, Inmunofluorescencia y el ELISA (Enzyme Linked-Immunoabsorbent Assay) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En

todos los casos el antígeno utilizado se obtiene de las formas epimastigote (no infectiva) de *T. cruzi*. Igualmente, el uso de La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) presenta una alta especificidad ya que se puede detectar el ADN del parásito en muestras de sangre. El PCR resulta ser significativamente más sensible que el Xenodiagnóstico y completamente confirmativo con relación a los datos serológicos de un panel de muestras de sangre (Almeida *et. al*, 1.997).

El estudio titulado REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA ÉL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL MUNICIPIO DE OVEJAS–SUCRE consiste en la aplicación de una técnica molecular para detectar la presencia del parásito *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes que provienen de las áreas rurales, en su mayoría, del municipio de Ovejas y que se encuentran expuestas a contraer la infección chagásica. Con el PCR se busca dar un diagnostico seguro de la enfermedad dirigido a establecer un tratamiento oportuno y seguro.

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad con especial importancia desde el punto de vista económico social, debido a que la mayoría de los enfermos quedan inhabilitados para el trabajo a una edad en la que el hombre es económicamente productivo (Corredor *et al*, 1.997).

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

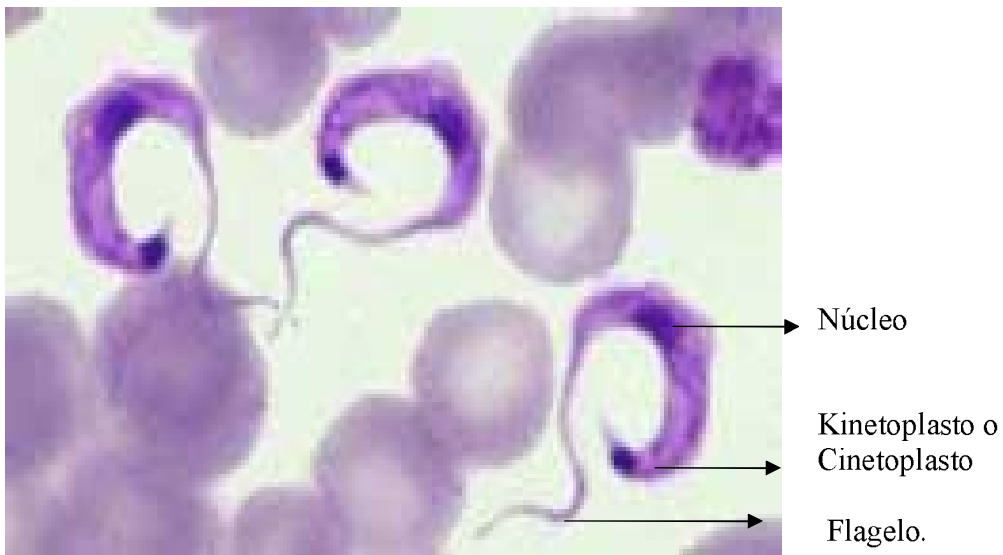
Validar la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como una herramienta para confirmar la presencia del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, que permita dar un diagnóstico confiable de personas expuestas a contraer la infección por *Trypanosoma cruzi*.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ◆ Optimizar la técnica de PCR como una forma para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- ◆ Detectar la infección por *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de desplazados y no desplazados en el municipio de Ovejas – Sucre.
- ◆ Realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos en el trabajo de campo en las áreas rural y urbana del municipio de Ovejas.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 *TRYPANOSOMA CRUZI*: TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA



Fotografía N° 1.
Morfología del *Trypanosoma cruzi*

Fuente: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/lifecycles.htm>.

El agente causal de la Enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi* cuya ubicación sistemática es:

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Sub-phylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Subgénero: Schizotrypanum

Especie: cruzi (Chagas, 1909) (Zygman *et al*, 1992).

Es extracelular y mide aproximadamente 20 μ (micras) de longitud, es alargado fusiforme, se caracteriza por la presencia de un flagelo, un núcleo y una mitocondria simple que se sitúa en el kinetoplasto o cinetoplasto (Zygman *et al*, 1992). (Fotografía N° 1).

La mitocondria tubular simple tiene partes similares a la de las organelas de las células de los mamíferos presentando rasgos como la presencia de ADN y un número de enzimas detectadas en el interior de la membrana. El kinetoplasto, constituye del 20 al 25% del ADN total del parásito localizado en la mitocondria.

Estudios han demostrado que la molécula de K-ADN esta organizada en asociaciones de minicírculos y maxicírculos, cada kinetoplasto abarca de 20.000 a 25.000 minicírculos. Los maxicírculos debido a su peso molecular y tamaño, es probable que codifiquen para una enzima que participa en el metabolismo del parásito.

El *T. cruzi* presenta tres formas diferentes en su ciclo evolutivo: la forma flagelada o tripomastigote se encuentra en la sangre circulante de vertebrados infectados, presentando forma de S o C (Zygman *et al*, 1992).

Las formas amastigotes se encuentran en todos los hospederos vertebrados, en casi todos los tipos de células principalmente en las del sistema fagocítico y muscular estriado y miden de 4 a 5 μ presentando un flagelo muy rudimentario, se multiplican por fisión binaria y origina grupos de parásitos intracelulares que se denominan pseudoquistes. Las formas amastigotes y epimastigotes aparecen en el insecto vector, de esta forma pasan a tripomastigotes y completan su ciclo (Corredor *et al*, 1997) (Figura N° 1).

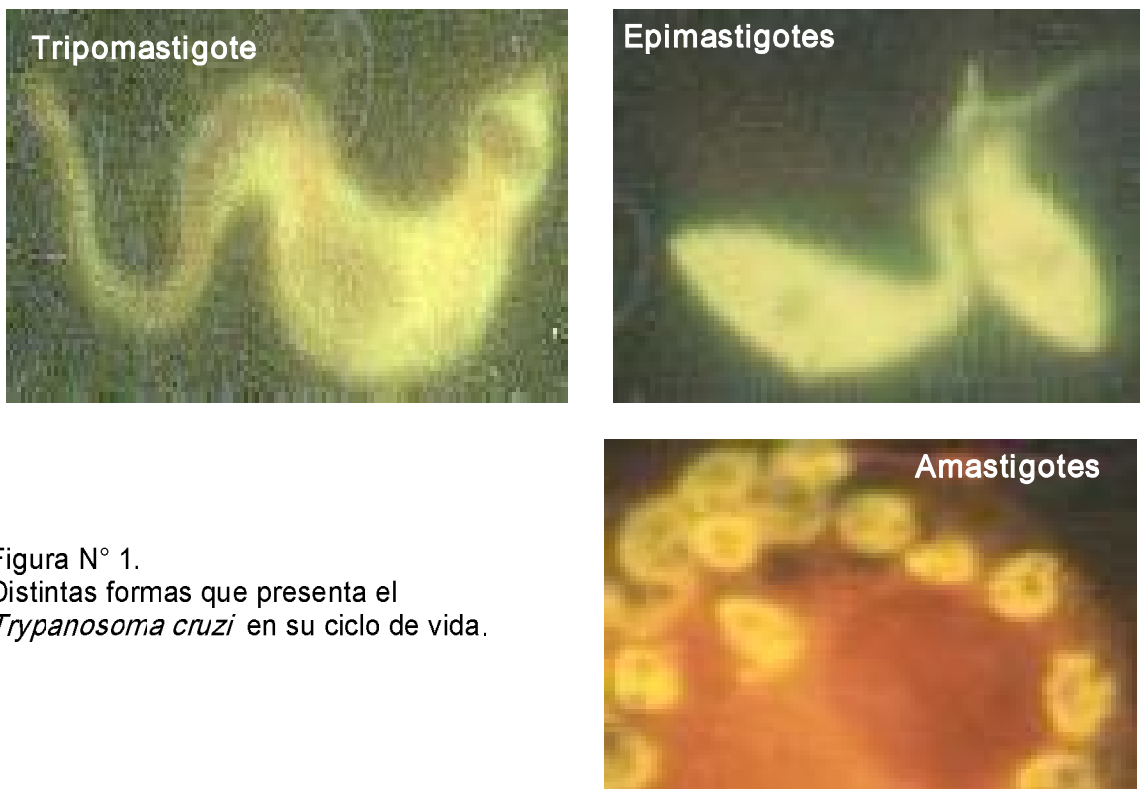


Figura N° 1.
Distintas formas que presenta el
Trypanosoma cruzi en su ciclo de vida.

Fuente: <http://www.biosci.ohio-state.edu/parasite/lifecycles.htm>

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito heteroxeno, es decir, que una parte de su ciclo de vida vive en la sangre o tejidos de un hospedero vertebrado y la otra la vive en el intestino de un insecto vector hematófago (De Araujo, 1.999).

Después que el vector ingiere la sangre conteniendo tripomastigotes, los parásitos se transforman en epimastigotes y se multiplican en el intestino medio del insecto. Después de 3-4 semanas están presentes los tripomastigotes metacíclicos infectantes en el intestino posterior. Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados con las heces. La infección del huésped vertebrado ocurre por contaminación cuando el reduviideo deposita sus heces en la piel mientras se alimenta de sangre. Los tripomastigotes pueden penetrar por la picadura o a través de pequeñas abrasiones o, más fácilmente, por la conjuntiva. Una vez dentro del tejido los parásitos pueden ser fagocitados por macrófagos o pueden penetrar directamente las células, en donde se transforman en amastigotes y se reproducen por división binaria. Los tripomastigotes y amastigotes sintetizan una proteína hemolítica que es capaz de lisar la membrana de la vacuola parasitófora; de este modo los parásitos escapan al citoplasma y se multiplican por fisión binaria. Las células huésped distendidas con los microorganismos se rompen y liberan amastigotes y tripomastigotes, ambos de los cuales pueden infectar células adyacentes o distantes. Aunque ningún tejido se salva de la infección, las cepas del parásito pueden variar en tropismo; los sistemas reticuloendotelial y nervioso (especialmente los ganglios autónomos) y los músculos estriados y cardíacos son particularmente vulnerables (Neva, 1999) (Figura N° 2).

CICLO DE VIDA DEL TRYPANOSOMA CRUZI

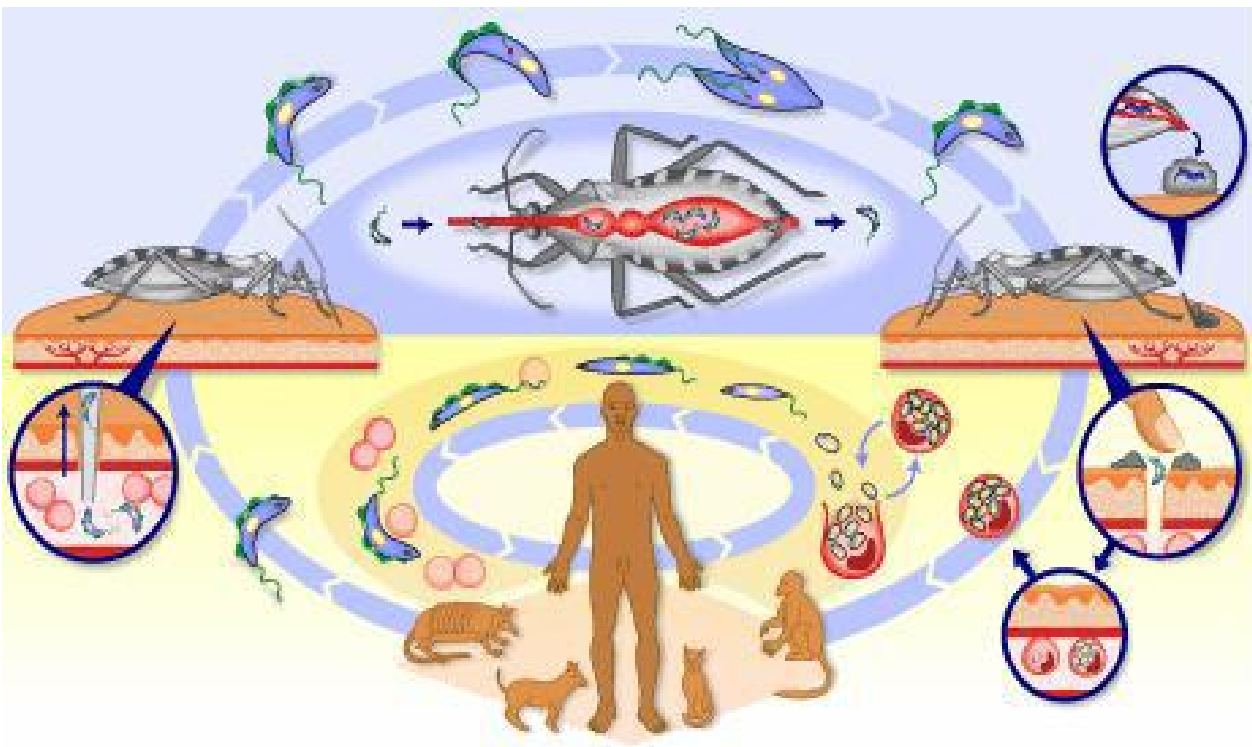


Figura N° 2
Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

Fuente: <http://www.biosci.ohio-state.edu/parasite/lifecycles.htm>.

Los parásitos pueden ser matados por mecanismos citocidas, como la producción de peróxido de hidrógeno. Recientemente se ha demostrado la participación del óxido nítrico en la muerte del parásito (Neva, 1999).

Durante las primeras 24 horas del contacto célula- parásito, todas aquellas células que ya están infectadas son más susceptibles a una invasión en segundos; probablemente se debe a los cambios de la superficie celular después de la infección (De Araujo, 1.999).

2.2 AGENTE DE TRANSMISIÓN O VECTOR

La “Chinche Hocicona” o “Pito” corresponden a los nombres con los cuales se conoce al vector de la enfermedad de Chagas en Colombia. Como en todos los insectos el cuerpo esta compuesto por tres regiones: cabeza, tórax y abdomen.

La cabeza es alargada, fusiforme en la mayoría de las especies. Posee un par de ojos compuestos globosos y salientes, un par de ojos menores, los ocelos y un par de antenas. En la cara ventral del tórax se insertan las patas que son delgadas y relativamente largas. Gran parte del dorso del abdomen esta cubierto por alas y se destaca por mostrar manchas transversales claras característica muy importante para identificar al vector (Antonovich, 1.999) (Fotografía N° 2).



Fotografía N° 2.

Rhodnius Prolixus Vector transmisor del parásito, *Trypanosoma cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas.

Fuente: <http://www.biosci.chio-state.edu/parasite/rhodnius.htm>.

2.2.1 El Vector Domiciliario

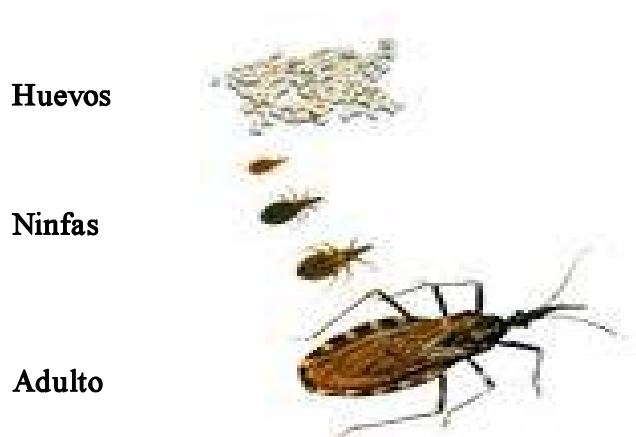
Hay mas de un centenar de especies de vectores, 23 especies de estos Triatominos han sido reportadas en Colombia; pero no todos tienen importancia epidemiológica en la transmisión del *T. cruzi*. Lo más importante en términos epidemiológicos es que éstos viven en asociaciones cerradas con los humanos, viviendo en grietas y huecos y en las noches emergen para alimentarse y depositar su materia fecal sobre el sitio de la picadura, una herida, la boca o la conjuntiva pasando a la sangre y a otros órganos. En nuestro país, se ha reportado hasta ahora, una sola especie de vector que convive con el hombre y se alimenta con su sangre, es el *Rhodnius prolixus* (Guhl *et al*, 1.999).

Un grupo de especies tiene hábitos silvestres y son vectores del *Trypanosoma* entre los mamíferos salvajes. Otro grupo suele invadir la zona peridomiciliaria, estableciéndose en gallineros, corrales, conejeras, etc.; se alimentan sobre los animales domésticos participando en la transmisión del parásito al perro, gato y otros mamíferos que se crían cerca de las viviendas (Jansen *et al*, 1.999).

2.2.2 Desarrollo del Vector

La hembra pone hasta 200 huevos de forma elíptica y de color blanco cuando son recién puestos; luego este color va cambiando a rosado al adelantar el desarrollo del embrión cuya evolución se completa entre 20 y 50 días según sea la temperatura. Los huevos son depositados en la tierra, en las grietas de las

paredes y en otros lugares más o menos ocultos. Al nacer el insecto tiene unos 3 mm de largo y es parecido al adulto, pero carece de alas. Unas semanas después la ninfa muda de piel y aumenta de tamaño, estas mudas se repiten en número de cinco, cada una de ellas da origen a una ninfa cada vez mayor. Con la última muda aparecen las alas y el insecto adquiere su aspecto definitivo con un tamaño de 3 cm. (Borges *et al*, 1.999) (Fotografía N° 3)



Fotografía N° 3.

Ciclo Biológico del *Rhodnius prolixus*.

Fuente: <http://www.almargen.com.ar/sitio/sección/actualidad.htm>.

2.2.3 Hábitos de Vida

El *Rhodnius prolixus* es una especie casi exclusiva domiciliaria. Se le encuentra principalmente en la vivienda del hombre y también en los lugares propios de los animales domésticos. El insecto se refugia sobre todo en las grietas de los pisos y

paredes, detrás de los muebles y otros objetos, en las partes que no son periódicamente limpiadas, debajo de la cubierta de los techos o paredes que ofrecen resquicios y en las soluciones de continuidad de paredes de adobe mal embarradas (Pinto, 1.992)(Fotografías N° 4a y 4b).



Fotografía N° 4a.

Vivienda adecuada para el establecimiento y reproducción del Vector transmisor de *T. cruzi*



Fotografía N° 4b.

Lugar predilecto por los vectores para su establecimiento y reproducción.

Fuente: [Municipio de Ovejas.](#)

En las noches templadas cuando las personas se retiran a dormir y apagan la luz, los vectores comienzan a salir de sus refugios; si están en los techos o en la parte alta de las paredes se dejan caer y llegan al hombre dormido. Una vez sobre el hombre o animal del que se alimenta endereza su pico que lleva normalmente plegado sobre la parte inferior de la cabeza, apoya sus extremos en la piel e introduce su largo estilete, inyecta su saliva irritante y anticoagulante y empieza a chupar sangre durante algunos minutos (Fotografía N° 5); una vez lleno de sangre

el vector presenta el aspecto de una uva y regresa a su refugio caminando por el piso y subiendo luego por la pared (Antonovich, 1.999)(Fotografía N° 6).



Fotografía N° 5

Rhodnius sp. alimentándose.



Fotografía N° 6

Rhodnius sp. lleno de sangre después de haberse alimentado.

Fuente: <http://www.Therion.dna.uba.ar/lab.chagas/caracteristicas.html>.

2.3 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, Tripanosomiasis cruzi Humana o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis o parasitosis producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, hematófilo pero que se reproduce en los tejidos, por la división binaria, múltiple y progresiva, pasando por una forma no flagelada: amastigote.

Se transmite entre diversos hospederos animales, mamíferos silvestres y domésticos a sus congéneres por insectos hematófagos conocidos con el nombre común de “pitos”. Por el número de enfermos y la amplitud del área que abarca,

por la gravedad de las alteraciones cardíacas y de otros tipos que ocasiona y por su carácter endémico, la Enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de la salud pública (Guhl, 2000).

Esta parasitosis fué descubierta en Brazil por Carlos Chagas en 1909, durante su trabajo en la campaña antimalárica en el estado de Minas Gerais. En esa época Chagas fué informado de la presencia de abundantes insectos hematófagos, que habitaban dentro de las viviendas y picaban a sus moradores en las noches. Verificó rápidamente que las heces de los insectos se encontraban infectadas por tripanosomatídeos, que denominó *Trypanosoma cruzi*, en honor a su profesor Oswaldo Cruz. Posteriormente pudo recuperar los mismos parásitos de la sangre de individuos que habitaban tales viviendas; de esta manera descubrió la enfermedad y encontró después de varios estudios, que en su fase crónica ocurrían lesiones en el miocardio. El mismo investigador estudió en forma completa la enfermedad en sus aspectos parasitológico, epidemiológicos y clínicos. En los años siguientes se hicieron nuevos hallazgos de vectores y casos humanos en otros países americanos (Botero *et al*, 1992).

La enfermedad es endémica del Continente Americano (Anexo F), considerándose que de una población total de 360 millones de personas viven en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas, se estima que por lo menos 100 millones están expuestas al riesgo de infección y que 16 a 18 millones están infectados con el agente causal *T. cruzi*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (1991) se calcula que aproximadamente 500.000 personas llegan a

infectarse cada año debido a la ausencia de programas de control y que 300.000 son niños. La tasa de mortalidad puede alcanzar de un 5% a un 15% durante el inicio de la fase aguda de la infección (Guhl *et al*, 1999).

En Colombia, el *T. cruzi* se detecta frecuentemente a todo lo largo del Valle del río Magdalena, en la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el pie de Monte de los Llanos Orientales y la Serranía de la Macarena. Los departamentos que presentan una mayor endemia son: Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Arauca, Tolima, Huila y Bolívar (Guhl, 2000).

En 1923, César Uribe Piedrahita encontró los flagelados en deyecciones de reduvídeos, procedentes de Tolima. Brumpt en la misma época, encontró vectores en Boyacá, Meta y los Santanderes (Botero *et al*, 1992). En 1929 fue reportado el primer caso de la enfermedad de Chagas (Marinkelle, 1975) (Guhl *et al*, 1.999); desde entonces numerosos estudios han contribuido a un conocimiento epidemiológico y ahora se estima que 1.3 millones de personas están infectadas en el país y más de 3.6 millones de personas se consideran en riesgo debido a que viven en regiones donde se encuentran insectos vectores domésticos (Guhl *et al*, 1.999).

En el departamento de Sucre son muy pocos las investigaciones realizadas acerca de la Enfermedad de Chagas; sólo se tiene conocimiento de estudios de diagnóstico, en área urbana, realizados por la Universidad de Antioquia en el año

1998 en el municipio de Ovejas, y en el 2000 por el Ministerio de Salud en todos los municipios del departamento; estudios de los cuales no se conoce reporte alguno.

En Sucre únicamente se han reportado 7 casos de la enfermedad en los últimos 5 años (1998-2002), uno de los cuales sucedió en Ovejas en el año 1998 en una niña de 2 años de edad (DASSALUD 2002). En la actualidad se han presentado síntomas característicos de la enfermedad (Signo de Romaña-Mazza y Chagomas) en menores de edad y adultos del área rural que hasta el momento no aparecen registrados como casos positivos estando en espera de un diagnóstico seguro y un tratamiento oportuno.

2.4 EVOLUCION Y MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Enfermedad de Chagas evoluciona en tres periodos:

2.4.1 Período agudo

Es el comienzo de la enfermedad que dura alrededor de 20 a 30 días (Blitzman, 1999). La Tripanosomiasis americana en su fase aguda se da generalmente en niños, mientras que las manifestaciones crónicas irreversibles por lo común aparecen en las etapas medias o finales de la vida. La mayor parte de los afectados por la enfermedad son niños, no porque estos sean más susceptibles

que los adultos, sino simplemente por estar más expuestos a ser infectados por el vector.

Este período puede pasar desapercibido semejante a un resfriado común o presentar un cuadro más severo que se caracteriza por fiebre intermitente o irregular, malestar generalizado y hepato-esplenomegalía; en ocasiones se presenta un exantema generalizado, anorexia, diarrea y vómitos. Las anomalías electrocardiográficas y radiológicas suelen aparecer, debido a miocarditis aguda. En el sitio de la infección puede presentarse una reacción inflamatoria (chagoma) que dura hasta ocho semanas y es de apariencia forunculoide, no supurativa y en un número reducido de los casos llega a presentarse edema unilateral en ambos párpados (complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña-Mazza) (Fotografía N° 7), conjuntivitis, inflamación de la glándula lagrimal y linfadenopatía regional. Las manifestaciones que ponen en riesgo la vida o se consideran mortales son la miocarditis y la meningoencefalitis (Tapia, 1999).



Fotografía N° 7.

Complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña- Mazza.

Fuente: <http://www.mflor.mx/materias/temas/malchagas/malchagas.htm>.

2.4.2 Período de Latencia

Pasado el primer mes el enfermo entra en un segundo período o de latencia; este período puede durar años y durante ese tiempo no hay ningún síntoma, solamente se puede poner en evidencia la enfermedad por medio de análisis de sangre en el que se comprueba las alteraciones provocadas por la enfermedad o también (más difícilmente) viendo los *Trypanosomas*. La mayor parte de las personas permanecen en este periodo todo el resto de sus vidas y aun hay quienes se han curado espontáneamente (Macêdo, 1.999).

2.4.3 Periodo Crónico

Después de 10 a 20 años de la infección pueden desarrollarse los síntomas más severos (Blitzman, 1999). Por lo general es una manifestación tardía de la infección; se le encuentra en casi un 15% de quienes han padecido el contagio y sus manifestaciones más evidentes están en relación directa con las alteraciones del corazón (Antonovich, 1.999). Comprende lesión del miocardio, con dilatación cardíaca, arritmias y anormalidades graves de la conducción; los síntomas frecuentes son palpitaciones, mareos, síncope, disnea de esfuerzo, edema y dolor precordial, así como afección de las vías gastrointestinales, con megaesófago que se caracteriza por presencia de disfagia, dolor esofágico, regurgitación activa o pasiva, pirosis, hipo, tos, ptialismo, aumento en el tamaño de las glándulas salivales y megacolon, que se caracteriza por irregularidad en las evacuaciones fecales por períodos prolongados (semanas o meses), distensión abdominal severa, tímpanismo, halitosis, náusea, vómito, desnutrición y caquexia, que pueden evolucionar hacia la sepsis y muerte. La forma cardíaca puede coexistir con las formas digestivas en un individuo. En sujetos con SIDA se presenta meningoencefalitis multifocal o difusa grave con necrosis y hemorragia, también miocarditis aguda como recaída de infección crónica; lo mismo ha sido señalado en casos de la enfermedad de Chagas crónica, con inmunosupresión que no depende del SIDA (Tapia, 1999).

Otro dato a tener en cuenta es el relacionado con la cardiopatía chagásica en personas jóvenes; es decir un organismo relativamente sano, presenta invalidez

para una vida normal debido a la lesión del corazón. El *T. cruzi* afecta también al sistema nervioso, al aparato digestivo y al sistema muscular (Antonovich, 1.999).

2.5 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

2.5.1 Transmisión vectorial: En 1911, Chagas verificó que varias especies de Triatomíneos pueden transmitir el *T. cruzi*. También ya muy temprano, Chagas y sus colegas de Manguinhos (A. Neiva, especialmente) definen que la vía vectorial constituye la forma fundamental de la transmisión a los humanos, señalando que ocurre básicamente en el interior de la vivienda campesina de las regiones infestadas (Pinto, 2000).

2.5.2 Transmisión Congénita: La infección prenatal por pasaje transplacentario de *Trypanosomas* desde la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada. Se han verificado nacimientos de niños no infectados, aún en presencia de placenta con elevado parasitismo. Se ha comprobado igualmente la inversa: madre con bajísima parasitemia, placenta sin parásitos y neonato con la enfermedad de Chagas franca (distrofia, edemas, fiebres y parasitemias elevada) (Pinto, 2000).

Muchas de las formas de la enfermedad de Chagas en lactantes, sin puerta de entrada y sin seguridad de exposición a Triatomíneos es de transmisión transplacentaria; hijos de madres que apenas dan una reacción de desviación del complemento positiva (Antonovich, 1.999).

2.5.3 Transmisión Transfusional: Otro considerable número de infecciones se produce mediante la transfusión de sangre proveniente de donantes con infecciones ignoradas, generando cuadros clínicos atípicos. Si bien se han registrado casos mortales fulminantes, la mayoría mejoran espontáneamente aún en presencia de altas parasitemias inicial. La posibilidad de infección está condicionada por la cepa infectante y la inmunidad del receptor (Cortés *et al*, 2000).

2.5.4 Transmisión por la Contaminación Accidental en el Laboratorio: La transmisión accidental ha sido registrada desde los años 50, generalmente en laboratorios de investigación, en hospitales que lidian con casos agudos y en órganos de salud dedicados al manejo del vector (Pinto, 2000). Son múltiples los casos conocidos de enfermedad de Chagas por infección accidental en laboratorios médicos por la manipulación de Triatomíneos y animales infectados, cultivo de *T. cruzi* o material biológico proveniente de enfermos graves o animales infectados.

2.5.5 Transmisión por el Manejo de Animales Infectados: Se han relatado casos adquiridos al manejar animales silvestres o semidomesticos enfermos (los curies, criados para alimentación familiar en ciertas regiones de Perú y Bolivia). Se ha encontrado el *Trypanosoma* en la saliva de perros infectados con altas parasitemias, el manejo promiscuo de canes y gatos con infección natural acentuada puede ser medio de contagio (Antonovich, 1.999).

2.5.6 Transmisión por trasplante de órganos: A partir de los años 60 se viene acumulando casos especialmente por trasplantes de riñón (la mayoría) de corazón y de páncreas, que pueden ocurrir cuando el donante está infectado y el receptor es susceptible. Los cuadros clínicos suelen presentarse relativamente atípicos comparativamente a los agudos por transmisión vectorial o transfusional, con una parasitemia generalmente menos intensa pero focalizada en tejidos periféricos (piel y subcutáneo), también con propensión al desarrollo de cuadros neurológicos centrales, todo esto probablemente relacionado con la inmunosupresión derivada de la enfermedad de base y de los procedimientos farmacológicos antirechazo.

2.5.7 Otras formas posibles y mucho más raras de transmisión del *T. cruzi* al hombre es la transmisión por vía **Sexual** donde aparentemente varones susceptibles se contaminan a través de la relación sexual con mujeres infectadas crónicas donde se ha aislado el parásito de su líquido menstrual (Pinto, 2000). La transmisión **por contacto** es susceptible con heces contaminadas de Triatominos en las paredes de una vivienda con alta tasa de infestación (Pinto, 2000).

3. TRATAMIENTO PARA LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

- ◆ **Fase Aguda e Indeterminada:** En la fase aguda e indeterminada es muy útil el Nifurtimox, un derivado del Nitrofurilideno. En adultos se administra a dosis de 7 a 10 mG por Kg de peso por día (máximo 700 mG al día). En los

menores de 15 años, que toleran más el medicamento, la dosis es de 15 mG por Kg de peso, repartidos en dos tomas diarias durante sesenta días consecutivos.

El medicamento está contraindicado en pacientes con daño cerebral, estados convulsivos, psicosis, así como en mujeres en periodo de lactancia. En casos congénitos se administra el medicamento a dosis diaria de 8 a 25 mG por Kg de peso, por 30 días. No se administra en mujeres embarazadas. En casos graves también ha mostrado ser eficaz el Benznidazol, un derivado del 2-nitroimidazol, a dosis de 5 mG por Kg de peso en todas las edades, repartidas en dos tomas diarias durante treinta días ininterrumpidos. Se recomienda vigilancia médica estrecha, en pacientes con antecedentes de daño hepático, renal, pulmonar y hematopatías (Fragata, 1996).

- ♦ **Fase crónica:** Al principio de esta fase se administran los mismos esquemas de tratamiento recomendados para la aguda y la indeterminada, a condición de que el enfermo permanezca bajo control médico, el cual incluye: parasitoscopías de sangre, serología, electrocardiogramas y estudios radiológicos del corazón y tracto digestivo, para verificar si existen lesiones de corazón, esófago y colon, lo que ameritaría que el enfermo reciba atención en sitios con servicios especializados (Passos *et al*, 1999).

4. TECNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO

Establecido el diagnóstico clínico donde se debe tener en cuenta la procedencia del

enfermo con la forma chagásica y el antecedente de haber vivido o pernoctado en casas con Triatominos, el diagnóstico de laboratorio es necesario para la comprobación de la enfermedad de Chagas (Corredor *et al*, 1997).

El diagnóstico en la fase aguda es fundamentalmente parasitológico. Es muy difícil la demostración del parásito en la sangre o tejidos una vez autolimitada la enfermedad aguda clínica y establecida la forma crónica, aunque existan parasitemias esporádicas y transitorias que, sin embargo, hacen del sujeto chagásico un asintomático (Britto *et al*, 1.999).

4.1 Técnicas directas

- ◆ **Método de la Gota Gruesa:** Se colocan tres gotas de sangre en un porta objetos, se mezcla con movimientos concéntricos con un alfiler o con el extremo de un portaobjeto, se extrae la fibrina. Se seca a temperatura ambiente y luego se tiñe (Hidalgo *et al*, 1997) se mira al microscopio con lo cual se pueden descubrir los *Trypanosomas* en las células sanguíneas del presunto enfermo (Guhl, 2000).
- ◆ **Examen de sangre al fresco:** Una gota de sangre recién extraída se observa entre lámina y laminilla, directamente al microscopio.
- ◆ **Frotis de sangre:** Se extiende una gota de sangre recién extraída, sobre un portaobjetos y se tiñe con Giemsa o Wright.
- ◆ **Microhematócrito:** Se toma una muestra de sangre en un tubo de microhematócrito y se centrifuga a 1000 r.p.m. por tres minutos. Se fractura el

capilar en el límite de la capa leucocitaria. Se deposita sobre un portaobjeto la capa de leucocitos y plasma y se observa al microscópio (Hidalgo *et al*, 1997).

- ♦ **Biopsias:** Este método se utiliza para comprobar las formas tisulares de *T.cruzi* se pueden ver en los tejidos los llamados nidos de leishmanoides con sus formas amastigotes en su interior. Sirve en algunos casos para el diagnóstico de la enfermedad a pesar de no encontrarse parásitos en la sangre circulante (Botero *et al*, 1992).

4.2 Técnicas indirectas:

- ♦ **Xenodiagnóstico:** Esta técnica sólo se utiliza para la enfermedad de Chagas. Se emplean ninfas de *Triatoma sp.* libres de infección, las que se alimentan con sangre del paciente. Los resultados se obtienen a los 30, 60 y 90 días. Esta técnica sólo es utilizada en algunos centros de investigación y puede ser reemplazada por PCR para *T. cruzi* (Hidalgo *et al*, 1997).
- ♦ **Cultivos:** El más utilizado en la actualidad es el medio LIT (Hígado- Infusión – Tryptosa), debido a que se puede obtener una positividad relativamente alta, tanto en la fase aguda como en la crónica. Se obtiene una positividad del 55%, significativamente mayor que la obtenida con el Xenodiagnóstico (Botero *et al*, 1992).

4.3 Técnicas Serológicas

En la etapa inicial de la infección los anticuerpos contra el *T. cruzi* se encuentran en la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por anticuerpos IgG a medida que progresa la enfermedad. Entre las diversas pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, las más difundidas son la prueba de Fijación del Complemento (FC) (prueba de Machado-Guerreiro), la prueba de Hemaglutinación Indirecta (HAI), la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). La prueba que más precozmente puede dar resultados positivos durante la infección es la IFI (Inmunofluorescencia indirecta) para la detección de IgM. Subsiguientemente se positiviza la IFI - IgG, la FC y la HAI. En personas que sufren la infección crónica con parasitemia comprobada, todas las pruebas mencionadas han dado resultados positivos en el 95% de las muestras de suero.

No obstante, pueden ocurrir reacciones falso-positivas con sueros de pacientes con *Leishmaniasis* o con infección por *T. rangeli* debido a que la especificidad de las pruebas puede variar, los límites de positividad deben definirse localmente usando un panel serológico. Se ha recomendado el empleo de al menos dos pruebas serológicas para confirmar la infección.

Durante la infección crónica los métodos parasitológicos generalmente producen resultados negativos y aún el xenodiagnóstico es positivo en menos del 50% de

los casos. Por otra parte, cualquiera de las pruebas serológicas antes mencionadas deberían dar resultados positivos (Morales, 1999).

- ◆ **Fijación del Complemento (FC)**: Prueba descrita en 1913 por Guerreiro-Machado (Botero *et al*, 1992), desde ese tiempo se ha empleado como el método clásico para el diagnóstico serológico de la infección chagásica y la técnica se ha mejorado progresivamente. La especificidad depende del tipo de antígeno utilizado y es casi del 100% con antígenos proteicos. La sensibilidad es de 20 a 40% en la fase aguda y más del 90% en las fases latente y crónica.
- ◆ **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**: Tiene la ventaja de ser más sencilla y es positiva más precozmente; permanece a títulos bajos por tiempo prolongado. Utiliza como antígeno, *T. cruzi* fijado en la preparación, en sus formas tripo y epimastigote; en algunas ocasiones muestra reacciones cruzadas por otros protozoarios como los del género *Leishmania*; esta inespecificidad se acentúa en los títulos bajos.
- ◆ **Hemaglutinación Indirecta (HAI)**: Se utilizan glóbulos rojos tanizados a los cuales se les adhiere un antígeno de tipo proteico o una fracción de polisacárido. La sensibilidad es mayor en las formas crónicas que en las agudas. La especificidad se considera buena (Botero *et al*, 1992).
- ◆ **Técnica de ELISA:**

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked inmuno sorbent assay). Como todo ensayo inmunoenzimático,

la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.

De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno -Ag.- ó anticuerpo -Ac) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcados con una enzima (peroxidasa de rábano picante); agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante (Laboratorios Géminis, 2002).

5. TÉCNICA MOLECULAR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, mas conocida como PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) es actualmente una de las técnicas que ha tenido mayor auge a nivel mundial en el diagnóstico de laboratorio clínico, contribuyendo al desarrollo de diversas áreas de la medicina (Lairmore, 1.990).

Esta es una forma simple y especialmente muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas para posibilitar su identificación al permitir la obtención de millones de copias de una determinada secuencia de ADN. Esta tecnología ha revolucionado la investigación clínica y la de laboratorio de diagnóstico. La técnica fue descubierta en el año 1983 por Kary B. Mullis quien ganó por sus trabajos el premio Nobel de química en 1993 (Fariña *et al*, 1998).

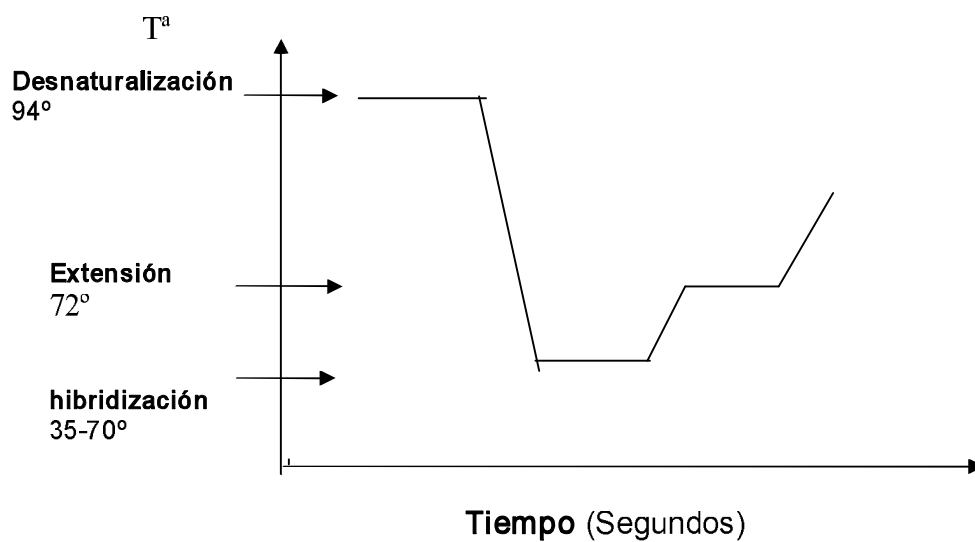
Las aplicaciones del PCR son múltiples, desde la arqueología, la Medicina forense y la Medicina clínica. Permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas en unas horas frente a la espera de los cultivos. Además, las cantidades necesarias son mínimas por lo que ese inconveniente es obviado (Fariña *et al*, 1998). La gran sensibilidad, versatilidad y sencillez de esta técnica ha revolucionado tanto las estrategias de estudio de la genética y de los procesos evolutivos como determinados aspectos de diagnóstico y forenses (Lairmore, 1990).

5.1 Fundamento de la técnica PCR

La PCR se utiliza con el fin de amplificar un segmento de ADN a través de una serie de ciclos repetitivos consistentes (Fariña *et al*, 1998). Una vez purificado el ácido nucleico (ADN) es mezclado con una solución que contiene agua, buffer de amplificación, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), nucleótidos trifosfatos, partidores específicos (cebadores) y la enzima *Taq* DNA Polimerasa. Esta mezcla se incuba

en un termociclador que controla la temperatura y tiempo para que ocurran los procesos de desnaturalización (Figura N°3) (separación de la doble hebra de ADN), hibridización de los cebadores ADN blanco (Figura N°4) y extensión realizada por la *Taq* Polimerasa (Figura N°5) (Gráfica N° 1).

ETAPAS DE UN CICLO DE PCR



Grafica N° 1
Etapas de un ciclo de PCR

Fuente: Lairmore, 1990.



Figura N° 3. Proceso de Desnaturalización de ADN.

Figura N° 4. Proceso de Hibridación cebadores ADN blanco.

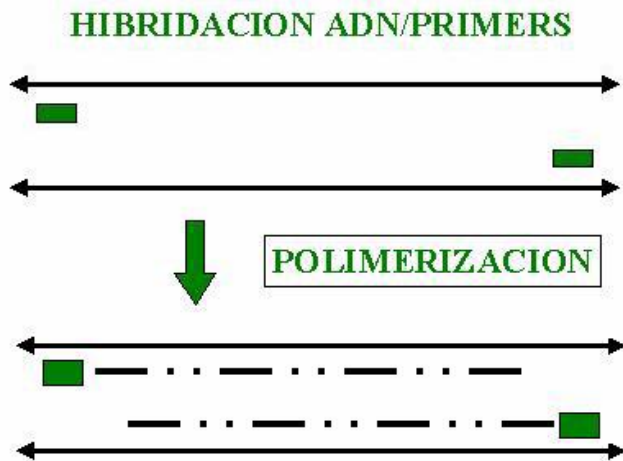


Figura N° 5. Proceso de extensión (polimerización)

Fuente: <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/019/aplicaciones.htm>

Después de realizar varios de estos ciclos (de 25 a 35), si está presente en la muestra el ADN a pesquisar, se obtendrá como producto final un elevado número de moléculas de ADN (10^6 fragmentos) de un tamaño bien definido y de secuencia idéntica al ADN blanco, que es detectado finalmente por diversas técnicas siendo la más común la Electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (Lairmore, 1990).

Desde finales de la década de los 80 hasta 1.999, importantes avances se han efectuado en el área del diagnóstico y caracterización del *T. cruzi* utilizando técnicas moleculares como la detección por amplificación del DNA del parásito utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Hasta el momento se ha propuesto al menos seis estrategias para la detección de *T. cruzi* por PCR, de las cuales la reacción basada en la amplificación de un fragmento de 330 pb originado de los minicírculos de K-DNA es hasta el momento la técnica que ha mostrado mayor sensibilidad (Sturm *et al*, 1989, Avila *et al*, 1991, Britto *et al*, 1993 revisado en Vallejo *et al*, 1999). Esta técnica ha mostrado capacidad aún para detectar el ADN del parásito en restos momificados de hasta 4000 años de antigüedad (Guhl *et al*, 1999)(Vallejo *et al*, 1999).

Los primeros reportes del uso de PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica (Gomes, 1998), donde los niveles de parasitemia son muy bajos y los títulos de anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi* son altos (Britto *et al*, 1999), dieron a conocer niveles de sensibilidad entre el 90% y 100%; al momento de compararlos con niveles de sensibilidad, bajos y significativos, entre el 45% y

60% de técnicas Serológicas necesitadas para comparar con el PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica (Gomes, 1998).

Lo anterior se puede corroborar con el estudio realizado por Chiari (1999), quien utilizó también la técnica de PCR, el hemocultivo y distintos métodos serológicos para el diagnóstico de la infección, con ello estableció una marcada diferencia entre las pruebas serológicas y parasitológicas utilizadas; ya que las primeras presentaron una alta sensibilidad y una baja especificidad, por las reacciones cruzadas con antígenos de los parásitos de *Leishmania sp* y de *T. rangeli* (Schmunis, 1991; Saldana & Sosa, 1996) y las pruebas parasitológicas como el Hemocultivo y el Xenodiagnóstico que mostraron una alta especificidad y una baja sensibilidad al compararse con la técnica molecular de PCR; que se caracterizó por detectar el parásito, a través de la amplificación de ciertas secuencias repetitivas del K-ADN de *T. cruzi*, proponiéndose así como una buena alternativa por detectar el parásito en muestras de sangre (Avila *et al*, 1993; Wincker *et al*, 1994; Britto *et al*, 1995 en Chiari, 1999).

Estudios de diagnóstico serológico, realizados en neonatos con infección por *T. cruzi*, son considerados difíciles al momento de compararlos con la técnica de PCR, debido a que en los neonatos ocurre una transferencia pasiva de anticuerpos de IgG, lo que no ocurre con los de IgM, siendo un hallazgo dependiente del momento de la infección y obligando a realizarle al niño un seguimiento por varios meses, teniendo el inconveniente de las parasitemias que no siempre van a ser evidenciables por los métodos serológicos utilizados;

mientras que con el uso de PCR se diagnostica la infección congénita sólo por la detección y la amplificación de pequeñas cantidades de ADN del parásito, convirtiéndose en una alternativa para el diagnóstico precoz de la infección (Diez *et al*, 1998). Todos estos estudios y muchos más realizados, en el campo del diagnóstico de la enfermedad de Chagas y detección de *T. cruzi*, reafirman que la técnica de PCR es una herramienta poderosa para el diagnóstico parasitológico (Wincker *et al*, 1999) por ser muy específica al momento de detectar sólo el parásito y ser muy sensible por que sólo unos pocos parásitos pueden ser detectados en una muestra de sangre (Campbell, 1.998) aún cuando los niveles de parasitemias, en un paciente crónico, son muy bajos y los títulos de anticuerpos son muy altos (Britto *et al*, 1.999).

6. METODOLOGÍA

6.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZONA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el municipio de Ovejas (Sucre) que pertenece a la subregión de los Montes de María. Su cabecera está localizada a $08^{\circ} 31' 48''$ latitud norte y $75^{\circ} 14' 01''$ de longitud Oeste. Su altitud es de 259 mts s.n.m. Presenta una temperatura media de $26^{\circ} C$ y una precipitación media anual de 1.034 mm.

Ovejas dista de Sincelejo 41 Km. El área municipal es de 463 Km^2 (46.200 Has) y limita por el Norte con el Departamento de Bolívar, por el Este con el Departamento de Bolívar y el municipio de San Pedro, por el Sur con los Palmitos y por el Oeste con Chalán y Coloso (Sucre). Su población es de 28.887 habitantes (Díaz *et al*, 2002). Anexo A.

6.2 TIPO DE ESTUDIO

De acuerdo con la participación del investigador el estudio se designa de corte transversal.

6.3 UNIVERSO

El universo estuvo formado por una población de 28.887 habitantes del municipio de Ovejas que pertenece a una subregión de los Montes de María.

6.4 POBLACION DE ESTUDIO

La población de estudio seleccionada, en mayor parte, es desplazada de las diferentes veredas del municipio y que en la actualidad habitan en zonas urbanas y periurbanas de la cabecera municipal. Aparte de esta población, se seleccionó una muestra poblacional no desplazada que habita en veredas y en zonas urbanas.

La muestra poblacional se escogió de acuerdo a los criterios de inclusión (picaduras de vectores, habitar en viviendas con vectores, pertenecer a una zona con riesgo de infección, vivir con animales domésticos en el ámbito domiciliario y peridomiciliario, ser sintomático o asintomático para la infección después de una o varias picaduras, vivir en viviendas con techo de palma o paja, paredes de bahareque y pisos en tierra, entre otros).

Se decidió trabajar primordialmente con una población desplazada de las áreas rurales y con una pequeña muestra de veredas, debido a que son una muestra representativa que estuvo en contacto con el vector triatomineo. El tamaño de la muestra poblacional representativa se calculó basándose en el programa

estadístico Epi Info 2000 (CDC, 2002) cuya función es analizar datos estadísticos epidemiológicos, para el cual se utilizó el promedio de las prevalencia 3.3% (Cortés *et al*, 2000) y 5% (Guhl, 2000) de la enfermedad de Chagas en Colombia, la población del municipio (28.887 hab) y un nivel de confianza del 95%.

6.5 TRABAJO DE CAMPO

Una vez por semana durante 3 meses no consecutivos (febrero, marzo y junio del 2002) se visitaron viviendas que cumplieran, en mayor parte, los criterios de inclusión. Las viviendas seleccionadas se ubicaron en las áreas urbana, periurbana y rural del municipio. Se visitaron 10 sectores de la cabecera, 3 veredas, una finca ubicada en zona periurbana y la E.S.E de Ovejas.

Para la toma de las muestras de los habitantes no desplazados se escogieron al azar las veredas Santa Rita, Flor del Monte y Los Andes; como también se visitó en 3 ocasiones la E.S.E Centro de Salud de Ovejas-Sucre donde se seleccionó a pacientes provenientes de otras veredas no visitadas.

Tanto a los habitantes de las viviendas de los barrios, de las veredas y de los seleccionados en la E.S.E se les presentó una charla “ **La Enfermedad de Chagas, sus Manifestaciones Clínicas y su Prevención**” (Salazar *et al* 2000); de igual manera se aplicó una encuesta de Investigación - Trabajo de Campo sobre la Enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas – Sucre (Anexo B).

Una vez presentada la charla y aplicada la encuesta se firmó un consentimiento informado de acuerdo a la edad del paciente (Anexos C y D).

Los datos obtenidos con la encuesta aplicada (Anexo B), se organizaron y analizaron a través del programa estadístico Epi Info 2000 (CDC, 2002).

6.5.1 Toma de las Muestras de Sangre

A cada paciente se le extrajo 2 mL de sangre periférica por punción venosa y se conservó en tubos de vidrio estériles con anticoagulante EDTA (MERCK). El tubo se marcó con un código (tres dígitos), nombre del paciente, localidad, fecha y se almacenó a 4°C (Fiorentino, 1994).

6.6 TRABAJO DE LABORATORIO

6.6.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

6.6.1.1 Protocolo de Lisis de Sangre Entera:

Para la lisis de las células se mezcló 500 μ L de sangre entera con el anticoagulante, 490 μ L de buffer de lisis 2X (Tris-HCl 10 mM pH=7.4 GIBCO_BRL , EDTA 5 mM pH=8.0 GIBCO_BRL , SDS al 1% BIO_RAD) y 10 μ L de Proteinasa K a -20°C (20 mG/ml GIBCO_BRL). La mezcla se incubó a 55°C por 1 hora o toda la noche a 37°C , seguidamente se inactivó la Proteinasa K a 95°C por 5 min. y se centrifugó a 12000 r.p.m. por 10 min. El sobrenadante

resultante se tomó para la extracción de ADN con sal de alta Molaridad (Buffone & Darlington, 1.985).

6.6.1.2 Protocolo de Extracción de ADN con Sal de Alta Molaridad

El volumen del sobrenadante (300 μ L) se mezcló con 500 μ L de Acetato de Potasio 5M (GIBCO_BRL) y se agitó suavemente durante 15 min. en hielo, luego se centrifugó a 12000 r.p.m. por 5 min. a 4°C y se extrajo el sobrenadante. El sobrenadante que contiene la fase acuosa se mezcló con 300 μ L de Isopropanol (SIGMA) y se agitó por 15 min. en hielo, se centrifugó a 12000 r.p.m. por 5 min. y se descartó el nuevo sobrenadante.

Al precipitado resultante se le adicionó 500 μ L de Etanol al 70% (MERCK) para eliminar el exceso de Isopropanol y sales; se volvió a centrifugar a 12000 r.p.m. y se descartó de nuevo el sobrenadante. El precipitado se dejó secar por 15 min. a 37°C y se disolvió en 50 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH=7.4, EDTA 1mM pH=8.0). Se almacenó a 4°C hasta su uso (Buffone & Darlington, 1.985).

6.6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En un tubo eppendorf de 0.5 mL de PCR estéril se mezcló:

- 12.3 μ L de agua destilada, filtrada y estéril a pH = 7.0.

- 2.5 μL de Buffer sin Mg 10X (KCl 500mM, Tris-HCl 200 mM pH=8.4 Invitrogen life technologies).
- 2.5 μL de MgCl_2 a 25 mM (Invitrogen life technologies)
- 2.5 μL de la mezcla de dNTPs 2.0 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP {SIGMA})
- 2.0 μL de los cebadores s-121 y s-122 (Cebadores específicos para *T. cruzi* a 10 picomoles/ μL cada uno {GIBCO_BRL}). Cuadro N° 1.
- 1 unidad de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (0.2 μL {Invitrogen life technologies}).
- 1.0 μL de ADN de *T. cruzi* a 100 picogramos/ μL (Control positivo).
- Para todas las muestras de ADN se utilizaron las mismas condiciones y concentraciones, sólo se exceptuó la cantidad de ADN molde (2 μL) y el agua (11.3 μL).

Para validar la técnica se realizaron varios ensayos en los que se emplearon distintas concentraciones de ADN de *T. cruzi* (control positivo) y de MgCl_2 , aplicando distintas condiciones de temperaturas y tiempos (Sambrook *et al*, 1989).

- Una vez validado el PCR se realizaron ensayos para todas las muestras aplicando las condiciones expuestas en la Cuadro N° 2.

Cuadro N° 1.

Cebadores específicos para *Trypanosoma cruzi* utilizados en la optimización del PCR.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	% GC	Tm (1 M Na ⁺)	Peso Molecular μGr/μmol	Longitud pb
S-121	AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA	40	72	8120.7	26
S-122	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA	42	73	8128.2	26

Fuente : Certificado de análisis GIBCO-BRL y cebadores.

Cuadro N° 2.

Condiciones aplicadas para la optimización del PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minuto y segundo)	N° de Ciclos.
Desnaturalización Inicial	95	5 min.	1
Desnaturalización	95	45 seg.	30
Alineación	47	45 seg.	30
Extensión	65	45 seg.	30
Extensión Final	65	5 min.	1

6.6.3 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL PCR A TRAVÉS DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para visualizar los productos de cada reacción del PCR se prepararon 750 mL de T.B.E 0.5X a partir de una solución madre 5X (TRIS - Borato 40 mM SIGMA , EDTA 1mM pH=8.0 GIBCO_BRL)

El gel de Agarosa al 0.5% (P/V) se preparó tomando 100 mL del T.B.E 0.5X y 0.5 Grs. de Agarosa (GIBCO_BRL). La Agarosa se disolvió calentando la solución con una agitación moderada sin dejar hervir y se enfrió a 60°C; luego se vertió en un molde mediano horizontal para geles (BIORAD) con un peine (BIORAD) el cual solidificó a 37°C en 45 min.

El tanque de Electroforesis horizontal Subcell Model 96 cell (BIORAD) se llenó con los 650 mL de T.B.E restantes y 32.5 μ L de Bromuro de Etidio (SIGMA) para una concentración final de 0.5 μ G/ μ L.

Para las muestras a correr se tomó una alícuota de 12 μ L de cada producto (4/5 del volumen a correr) y se mezcló con 1/5 de volumen del tampón de carga (Orange G {SIGMA}, Sucrosa analítica {MERCK}) el volumen total de cada muestra (15 μ L) se agregó en cada una de las líneas del gel, seguidas del marcador de bajo peso molecular 100 (100 bp ladder 0,5 μ G/ lane {GIBCO-BRL}) a 50 μ G/ μ L, al control positivo (ADN de *T. cruzi* a 100 pG/ μ L) y blanco.

Al tanque con el gel se le aplicó un voltaje de 90 voltios, con una fuente de poder Model 300 (BIO-RAD) durante 180 min. tiempo en el cual el ADN migró a través del gel. El gel se llevó a una fuente de luz ultravioleta de 254/352 nm de longitud de onda (SIGMA) donde se observó detalladamente los resultados obtenidos y se fotografió con una cámara digital (Canon Power Shot S10 F92-1025-RFD) (Sambrook *et al*, 1989).

6.6.3.1 Análisis de los Geles de Agarosa al 0.5%

Para interpretar los resultados del PCR en un gel de Agarosa al 0.5% se gráfico en escala semilogarítmica el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos del marcador de bajo peso molecular 100 contra la distancia en Cm recorrida por cada fragmento.

7. RESULTADOS

7.1 TRABAJO DE CAMPO

Durante los tres meses de trabajo de campo se escogieron 69 viviendas dentro de las cuales el 77.9% (53 viviendas) pertenece al área rural y el 22.1% (16 viviendas) pertenecen al área urbana. Los factores de riesgos más relevantes fueron: la presencia de techos de palma (85.5%), paredes de Bahareque (87%), pisos en tierra (94.2%) y la presencia de los vectores (89.9% de todas las viviendas) en sitios específicos como dormitorios (82.60%). Todos estos criterios y la pobreza de sus habitantes permiten a los vectores poder establecer sus moradas, reproducirse y conseguir su alimento en horas de la noche preferiblemente (Anexo E y Fotografías N° 8 a N° 12).

La Charla presentada facilitó la participación activa de toda la población seleccionada haciendo que tomaran conciencia de la importancia del estudio y del peligro de infección que existe al momento de convivir con los vectores y ser víctimas de sus picaduras. De igual forma se comprobó que la población que habita en el 91.2% de las viviendas desconoce la infección chagásica; pero contrariamente dieron a conocer las diversas estrategias utilizadas para eliminar de forma temporal a dichos vectores (quemarlos con agua hirviendo, atraparlos

con pedazos de carbón encendido, fumigar la vivienda con veneno y en ocasiones cuando salen a la vista matarlos). En el 89.4% de las viviendas se manifestó la falta de aplicación de medidas de control, por parte de las autoridades sanitarias, para contrarrestar la existencia de los Reduviideos.

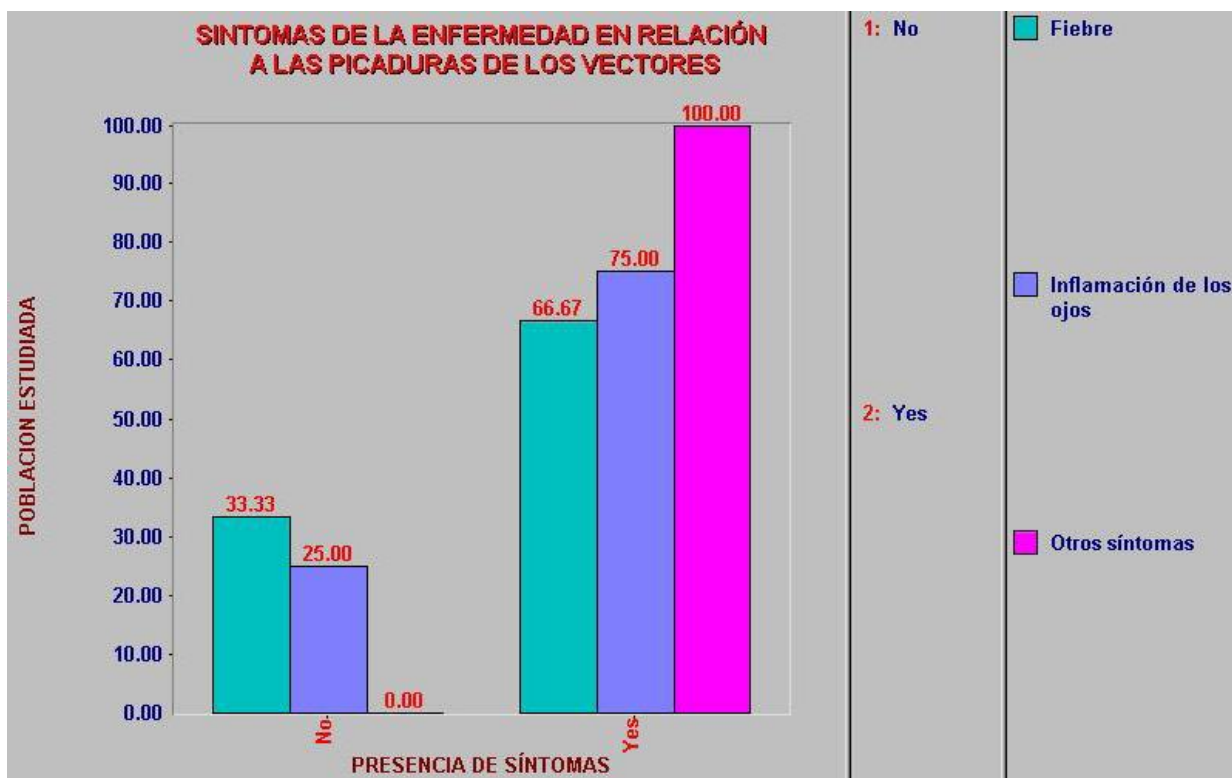
La Gráfica N° 2 da a conocer la existencia de los vectores en el 22.41% y 78.69% de las viviendas del área urbana y rural respectivamente; los vectores se encontraban en las grietas de las paredes de los dormitorios, debajo de los colchones, refugiados en los nidos de las gallinas, lugares de almacén del tabaco, en el techo de palma, en los lugares menos aseados, en el piso de los distintos lugares de la vivienda y aún en los alrededores. Además las picaduras padecidas por los niños, adolescentes, adultos y ancianos en las distintas partes del cuerpo (manos, piernas, espalda, cara, brazos, etc.) reafirman la presencia de los vectores. En el 98.5% de la población estudiada se presentaron los síntomas como comezón, ardor y dolor en la zona de la picadura o chagoma (Gráfica N° 3).

Los individuos con PCR positivo manifestaron sentir, después de la picadura, síntomas específicos de la enfermedad como malestar general, dolor de cabeza, y chagomas (100%), 3 de los cinco casos con síntomas presentaron inflamación en el ojo derecho (75%) y 3 presentaron fiebre (66.67%).



Grafica N° 2.

Conocimiento de la existencia de los vectores en las áreas rural y urbana del municipio de Ovejas Sucre



Grafica N° 3.

Distintos síntomas de la enfermedad presentados en la población estudiada.

La mayoría de la población desconocía la existencia de la enfermedad de Chagas y sus manifestaciones, hasta tal punto de dar a conocer que los vectores son los que producen la *Leishmaniasis cutánea* y que éstos son producidos por los nidos de las gallinas. De igual forma para ellos es muy común encontrar los vectores en sus viviendas, convivir con ellos y sufrir sus picaduras.

Los 10 Barrios seleccionados y visitados para el estudio fueron: La Ciudadela, La Pradera, El Veintiuno, San Isidro (Fotografía N° 8), Boca Canoa (Fotografía N° 9), Salida hacia la Peña (Fotografía N° 10), El Oasis (Fotografía N° 11), El Corozo (Fotografía N° 12), Jerusalén, El Tamarindo y la Finca el Socorro.



Fotografía N° 8.
Vivienda del Barrio San Isidro.



Fotografía N° 9.
Viviendas del barrio Boca Canoa



Fotografía N° 10.
Salida hacia la Peña



Fotografía N° 11.
Vivienda del Barrio El Oasis



Fotografía N° 12.
Vivienda del Barrio el Corozo

El tamaño de la muestra poblacional representativa, según Epi Info 2000 (CDC, 2002) fue de 167 habitantes, pero se escogieron 170, de los cuales sólo 165 hicieron participe en el estudio debido a que 3 muestras de sangre se dañaron al procesarlas en el laboratorio y 2 pacientes se negaron a participar en la toma de la muestra de sangre.

La muestra estaba conformada por el 55.15% de los adultos (91 individuos) y un 44.85% de los menores (74 individuos). Esta muestra se distribuyó en 3 submuestras: a) Una submuestra poblacional de 31.51% (52 individuos) que habitan en área rural (veredas) (Cuadro N° 3 y N° 4); b) una segunda de 23.8% (39 individuos) que habitan en zona urbana y periurbana (Cuadro N° 5) y c) una muestra poblacional desplazada del área rural, en el último año, de 44.69% (74 individuos) que habitan en zona urbana y periurbana de la cabecera (Cuadro N° 6).

Cuadro N° 3

Distribución de la muestra poblacional que participo en el estudio y que habita en área rural (veredas).

Vereda	Adultos		Menores		N° total de individuos por Vereda	% por Vereda
	N° H	N° M	N° niños	N° niñas		
Santa Rita	1	2	5	7	15	9.09
Flor del Monte	1	8	1	5	15	9.09
Los Andes	1		2		3	1.818
Total muestras seleccionadas	3	10	8	12	33	19.998

Fuente: Encuesta aplicada.

Cuadro N° 4

Distribución de la muestra poblacional que participo en el estudio seleccionada en la E.S.E y que habita en área rural (veredas).

E.S.E OVEJAS	Vereda	Adultos		N° total de Individuos	% por vereda
		N° H	N° M		
	San Rafael		2	2	1.21
	La Europa	2	1	3	1.81
	Pijiguay		1	1	0.606
	Almagra		8	8	4.84
	Las Babillas	1		1	0.606
	Villa Colombia		1	1	0.606
	Los Números		1	1	0.606
	Finca la Coquera		1	1	0.606
	El Palmar		1	1	0.606
Total muestras seleccionada		3	16	19	11.504

Fuente: Encuesta Aplicada.

Cuadro N° 5.

Distribución de la muestra poblacional que habita en zona urbana y periurbana

Area urbana/periurbana	N° de Adultos		N° de Menores		Total de Individuos	% por Barrio.
	N° H	N° M	N° niños	N° niñas		
San Isidro	1	5	2	5	13	7.87
El Tamarindo	1	2	1	1	5	3.03
Jerusalén		1		1	2	1.2
El Corozo		1	1	1	3	1.881
Salida Hacia la Peña	2	3	1	1	7	4.84
Finca el Socorro	2	4	1	2	9	5.454
Total muestras seleccionada	6	16	6	11	39	23.8

Fuente: Encuesta aplicada.

Cuadro N° 6.

Distribución de la muestra poblacional desplazada del área rural (veredas) que habita en zona urbana y periurbana de la cabecera municipal.

Area urbana /periurbana	Proveniente de Vereda	N° Adultos		N° Menores		N° total de individuos	% por vereda
		N° H	N° M	N° niños	N° niñas		
Barrio La Ciudadela	Salitral		1			1	0.606
	El Zapato		1			1	0.606
	Bajo Miramar		1		1	2	1.212
	El respaldo		1		1	2	1.212
	Santa Fe		1	1		2	1.212
	Chengue	3	5	3	4	15	9.09
	Pauda	1	1	2	1	5	3.03
	Almagra				1	1	0.606
	Bajo Grande	1	1	1		3	1.818
	Pijiguay	1		1	1	3	1.818
	Don Gabriel			2		2	1.212
	Villa del Carmen		1			1	0.606
	Villa Colombia	2	1			3	1.818
	El Campito	1			1	2	1.212
	La Europa		1			1	0.606
	Alemania		1			1	0.606
El Tesoro	1				1	0.606	
Barrio La Pradera.	Almagra		1		1	2	1.212
	Pijiguay			1		1	0.606
	El Tesoro				1	1	0.606
Barrio Boca Canoa	Salitral	1	3			4	2.424
	Villa Colombia		1	3	2	6	3.63
	Boca Canoa	1	3	5	2	10	6.66
Barrio El Oasis	Almagra		2		2	4	2.424
Total muestras seleccionadas		12	25	19	18	74	44.83

Fuente: Encuesta aplicada.

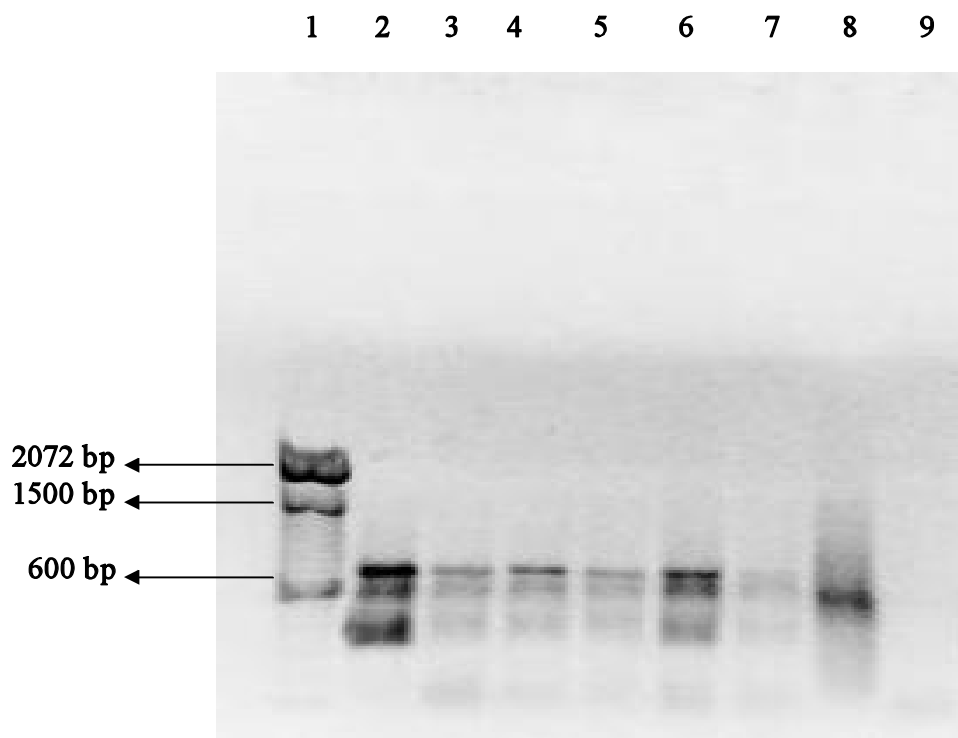
7.2 TRABAJO DE LABORATORIO

7.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

7.2.1.1 Ensayos para la optimización del PCR

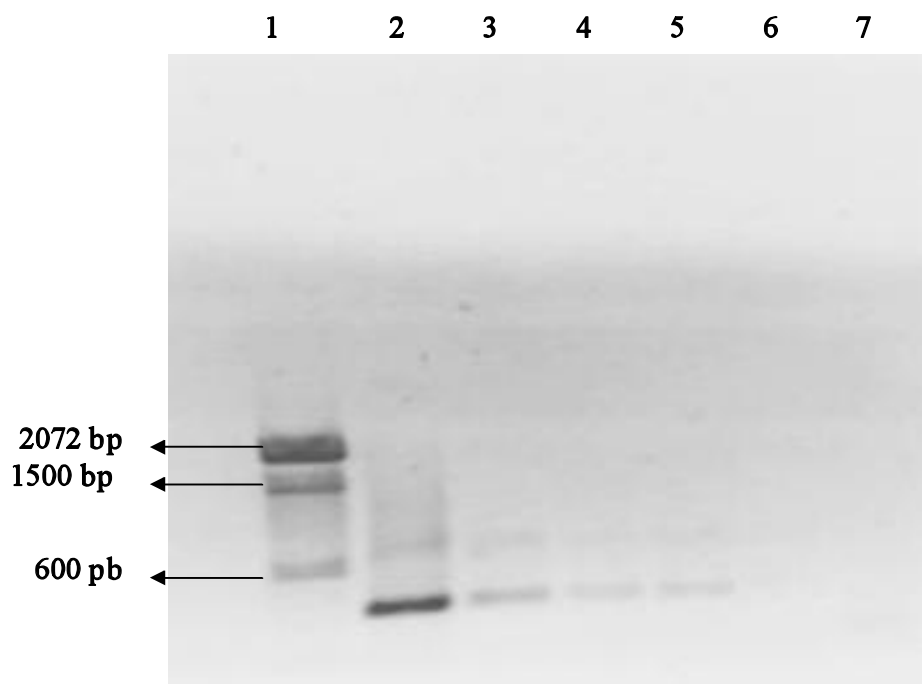
En un primer ensayo de PCR se tomaron concentraciones de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) de 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 mM, dNTPs a 0.2 mM, cebadores (s-121 y s-1221) a 20 picomoles, 1 unidad de DNA *Taq* Polimerasa y 1 μ L de ADN de *T. cruzi* (250 pG/ μ L). Se aplicó 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. , 30 ciclos de 95°C por 1 min. (Desnaturalización), 55°C por 1 min. (Alineación), 65°C por 1 min. (Extensión) y 1 ciclo de extensión final de 65°C por 5 min.

Los resultados del ensayo indican que estas condiciones de temperaturas y tiempos no fueron las adecuadas para optimizar la técnica por amplificar un fragmento inespecífico en las líneas 2, 3, 4, 5, y 6 (Fotografía N° 13) con un peso molecular de 800 bp, además no hubo amplificación del control positivo con el $MgCl_2$ a 4.5 mM (línea 7, Fotografía 13). Con base a estos resultados se realizó un nuevo ensayo aplicando nuevas condiciones pero manteniendo constantes las concentraciones y cantidades de los reactivos y utilizando una nueva concentración de ADN a 100 pG/ μ L. Se descartó una posible contaminación (línea 9, Fotografía N° 13).



Fotografía N° 13. Amplificación del PCR para optimizar la concentración del $MgCl_2$ utilizando ADN de *T. cruzi* a $250 \text{ pG}/\mu\text{L}$ (Control positivo), corrido en gel de Agarosa al 0.5% (GIBCO-BRL) y teñido con Bromuro de Etidio a $10 \text{ mg}/\text{mL}$ (SIGMA). Líneas: 1, Marcador de bajo peso molecular 100 a $50 \text{ }\mu\text{G}/\mu\text{L}$ (GIBCO_BRL). 2, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 2.0 mM . 3, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 2.5 mM . 4, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 3.0 mM . 5, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 3.5 mM . 6, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 4.0 mM . 7, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 4.5 mM . 8, ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ 5.0 mM . 9, Control Negativo

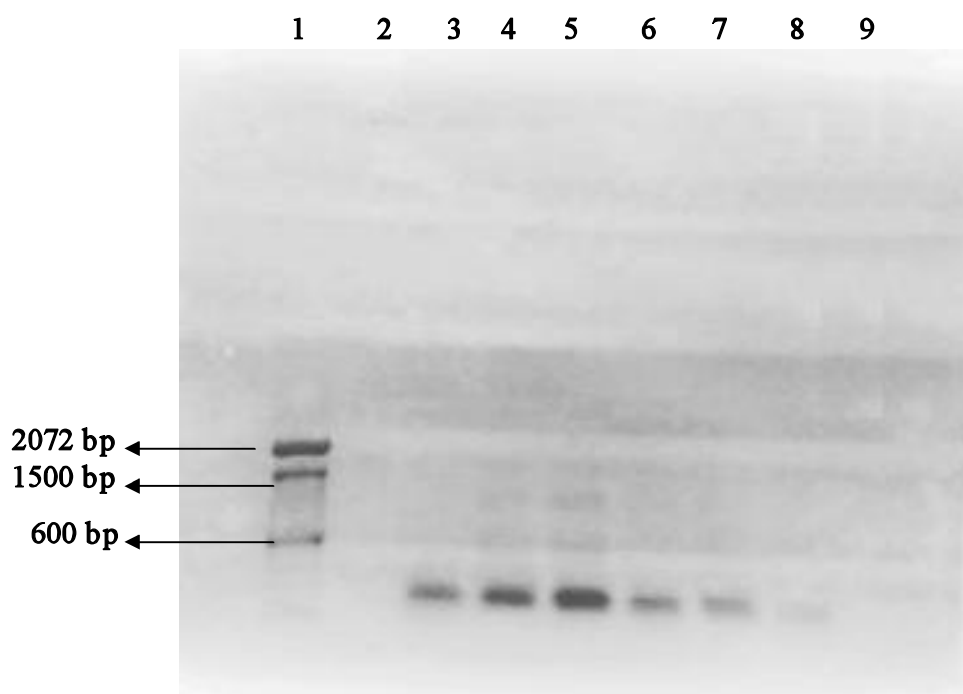
En un segundo ensayo se utilizaron concentraciones de ADN de *T. cruzi* iguales a 50 , 100 , 150 , 200 y $250 \text{ pG}/\mu\text{L}$, utilizando 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min . 30 ciclos de 95°C por 1 min . (Desnaturalización), 46°C por 1 min . (Alineación), 68°C por 1 min . (Extensión) y 1 ciclo de extensión final de 68°C por 5 min .



Fotografía N° 14. Amplificación del PCR para optimizar la concentración de ADN de *T. cruzi* (Control Positivo), en gel de Agarosa al 0.5% (GIBCO-BRL) y teñido con Bromuro de Etidio a 10 mg/mL (SIGMA). Líneas: 1, Marcador de Bajo Peso Molecular 100 a 50 μ G/ μ L (GIBCO-BRL). 2, ADN de *T. cruzi* a 50 pG/ μ L. 3, ADN de *T. cruzi* a 100 pG/ μ L. 4, ADN de *T. cruzi* a 150 pG/ μ L. 5, ADN de *T. cruzi* a 200 pG/ μ L. 6, ADN de *T. cruzi* a 250 pG/ μ L. 7, Blanco.

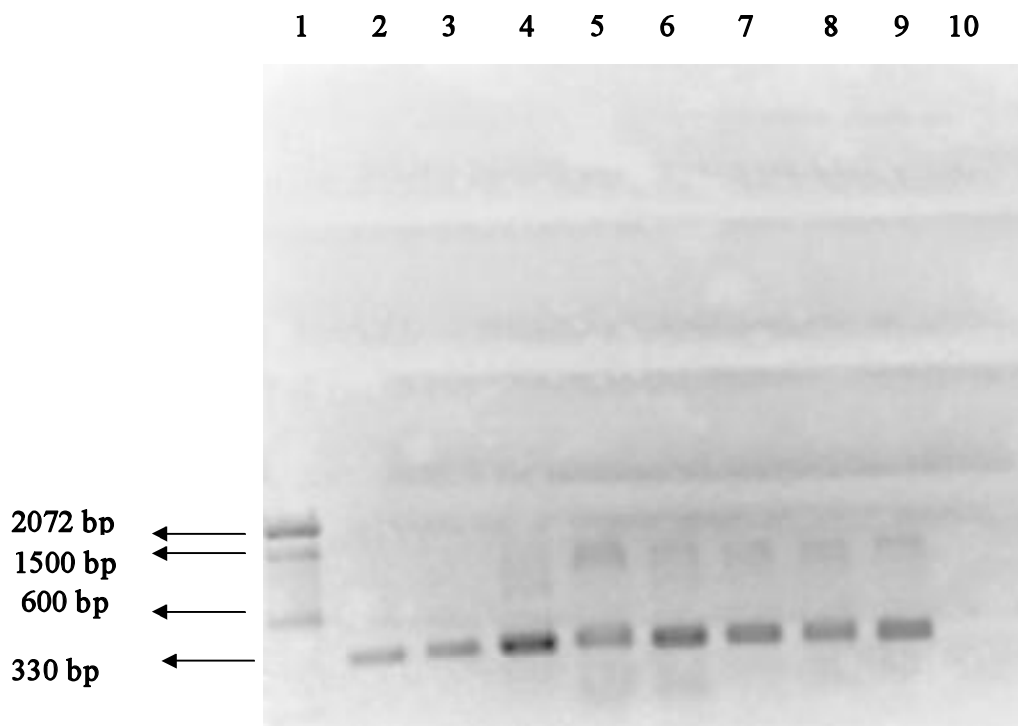
La concentración más adecuada utilizada en este ensayo fue la de 50 pG/ μ L; sin embargo las condiciones aplicadas no favorecieron a las concentraciones de ADN de 100,150, 200 y 250 pG/ μ L (Fotografía N° 14), por amplificar fragmentos muy tenues y poco consistentes; por lo tanto se decidió realizar otro ensayo disminuyendo el tiempo y aumentando en 1°C la temperatura de alineación y disminuyendo el tiempo y la temperatura de extensión, manteniendo constantes las cantidades y concentraciones de los demás reactivos.

El tercer ensayo realizado consistió en volver a amplificar el ADN de *T. cruzi* utilizando las mismas concentraciones de ADN, pero aplicando 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min. 30 ciclos a 95°C por 45 seg. 47°C por 45 seg. 65°C por 45 seg. y 1 ciclo de extensión final de 65°C por 5 min. Estas nuevas condiciones utilizadas demostraron ser ideales (Fotografía N° 15). A estas condiciones la mejor concentración de ADN de *T. cruzi* fue la de 100 pG/μL, tomándose esta para optimizar la concentración del MgCl₂. El fragmento amplificado por esta concentración es bastante nítido y muy consistente con un tamaño de 330 pb. Las demás concentraciones amplificaron el ADN pero presentaron fragmentos poco nítidos y poco consistentes.



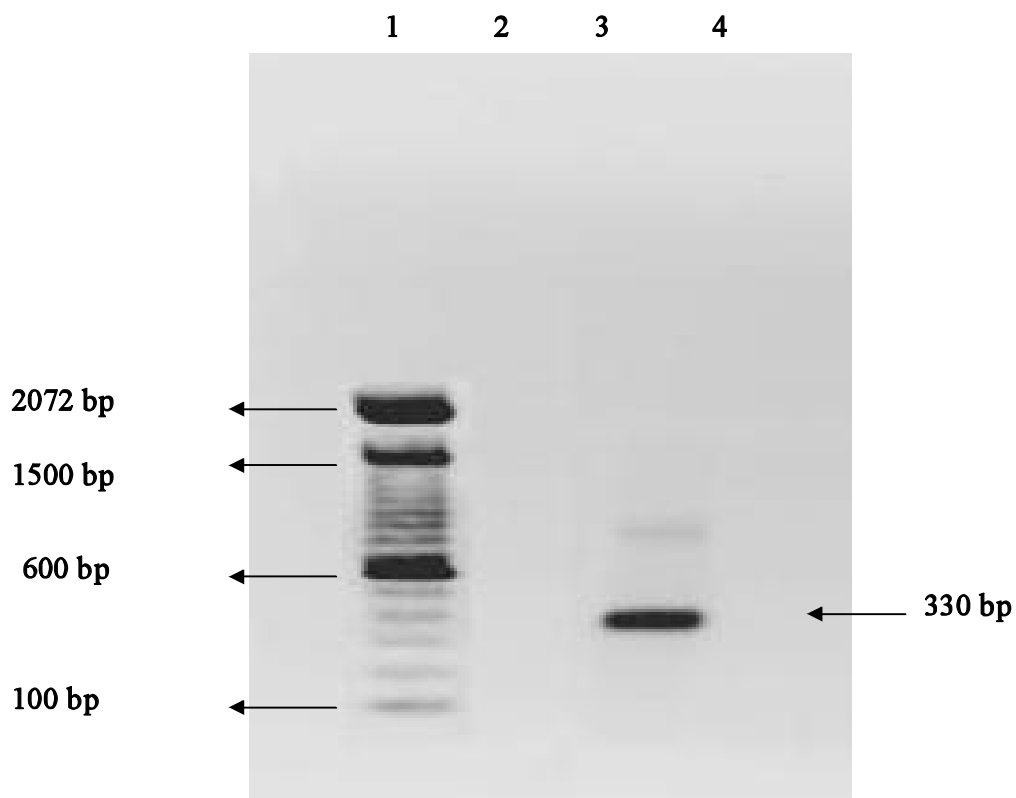
Fotografía N° 15. Amplificación de ADN de *T. cruzi* variando su concentración en pG/μL; utilizando los reactivos en las mismas cantidades y concentraciones, corrido en gel de Agarosa al 0.5% (GIBCO-BRL) y teñido con Bromuro de Etidio a 10 mg/mL (SIGMA). Líneas: 1, Marcador de Bajo Peso Molecular 100 a 50 μG/ μL (GIBCO-BRL). 2, Blanco. 3, ADN de *T. cruzi* 50 pG/μL. 4, ADN de *T. cruzi* 50 pG/μL. 5, ADN de *T. cruzi* 100 pG/μL. 6, ADN de *T. cruzi* 150 pG/μL. 7, ADN de *T. cruzi* 200 pG/μL. 8, ADN de *T. cruzi* 250 pG/μL.

En el cuarto ensayo se utilizaron concentraciones de MgCl_2 de 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 mM con las condiciones ya establecidas en el ensayo N° 3. Estas condiciones permitieron que todas las concentraciones amplificaran el fragmento de 330 bp, siendo las concentraciones de 2.5 y 3.5 mM favorables por amplificar fragmentos muy nítidos y consistentes; mientras que con las bajas concentraciones de MgCl_2 se observaron fragmentos sin barrido, muy opacos y poco consistentes. La concentración de 2.5 mM se escogió por ser la más utilizada para los ensayos de PCR. (Sambrook *et al*, 1.989) (Fotografía N° 16).



Fotografía N° 16. Amplificación de ADN de *T. cruzi* a 100 pG/ μ l (Control Positivo) variando la concentración del Cloruro de Magnesio (MgCl_2), corrido en del de Agarosa al 0.5% (GIBCO-BRL) y teñido con Bromuro de Etidio 10 mg/ μ L (SIGMA). Líneas: 1, Marcador de Bajo peso Molecular 100 a 50 μ G/ μ L (GIBCO-BRL). 2, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 1.5 mM. 3, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 2.0 mM. 4, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 2.5 mM. 5, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 3.0 mM. 6, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 3.5 mM. 7, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 4.0 mM. 8, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 4.5 mM. 9, ADN de *T. cruzi* y MgCl_2 5.0 mM. 10, Blanco. 11, control Negativo

Una vez determinadas las condiciones del PCR y optimizada las concentraciones de ADN de *T. cruzi* y $MgCl_2$ se hizo un último ensayo para comprobar los resultados obtenidos anteriormente (Fotografía N° 17).



Fotografía N° 17. Amplificación de ADN de *T.cruzi* (control positivo) una vez optimizada la técnica PCR en gel de Agarosa al 0.5% (GIBCO_BRL) y teñido con Bromuro de Etidio a 10mg/mL (SIGMA), utilizando concentraciones de Buffer 10x,, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, cebadores (s-121 y s-122) 20 picomoles, 1 unidad de Taq (0.2 μ L) y 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min. 30 ciclos a 95°C por 45 seg. 47°C por 45 seg. 65°C por 45 seg. y 1 ciclo de extensión final a 65°C por 5 min. Líneas: 1, Marcador de Bajo peso Molecular 100 a 50 μ G/ μ L (GIBCO_BRL). 2,. Blanco. 3 ADN de *T.cruzi* (100 pG/ μ L). 4, Control negativo.

A las 165 muestras de ADN de los individuos escogidos para el estudio se les aplicó el PCR utilizando las condiciones ya establecidas con las mismas cantidades y concentraciones de los reactivos expuestos en la metodología.

De las 165 muestras analizadas para amplificación, 8 muestras (4.8%) mostraron el fragmento esperado de 330 bp, dentro de las cuales se encontraron 3 muestras de adultos (37.5%) y 5 muestras de menores (62.2%) (Cuadro N° 7), de un total de 91 adultos (55.15%) y 74 menores (44.85%).

Cuadro N° 7.

Características Generales de Individuos con PCR positivos para la Enfermedad de Chagas.

Muestra N°	Desplazado	Vereda	Area: Rural, periurbana o urbana	Edad (años)	Sexo	Síntomas	Tiempo de picadura.
M-040	no	La Europa	no	55	F	Chagomas. asintomatico	Años
M-189	no	no	Boca Canoa	31	M	Chagomas inflamados. Malestar general	Días
M_041	no	Los Andes	no	18	M	Signo de Romaña-Mazza y fiebre	Meses
M-042	no	Los Andes	no	9	M	Signo de Romaña-Mazza y fiebre	Meses
M-144	no	no	El Oasis	12	F	Chagomas Inflamado, malestar general	1 día
M-029	no	Flor del Monte	no	14	F	Chagomas Inflamado, malestar general	Una semana
M-043	no	Los Andes	no	14	M	Signo de Romaña-Mazza y fiebre	Meses
M-019	no	Santa Rita	no	6	M	Chagomas, malestar general	Meses

Fuente: Encuesta aplicada

De los 126 individuos (100%) que habitan en el área rural (veredas), sólo 6 (4.85%) resultaron positivos para el PCR; mientras que los 120 restantes (95.15%) resultaron negativos encontrándose en riesgo de infección (Gráfica N° 4). Así mismo, de 39 individuos (100%) que pertenecen al área urbana sólo 2 individuos (5.1%) resultaron positivos y 37 (94.9%) resultaron negativos. Estos resultados demuestran que los individuos que tienen un mayor riesgo de contraer la enfermedad son los habitantes del área rural por el simple hecho de estar más expuestos al vector, sin descartar la posibilidad de infección para los habitantes del área urbana y periurbana del municipio.



Gráfica N° 4.
Resultados del PCR de la muestra poblacional.

Los resultados positivos para la infección se demuestran por la amplificación de un fragmento de ADN de 330 pb, que se comparó con un fragmento de ADN de *T. cruzi* del mismo tamaño perteneciente a una región variable de los minicírculos del Kinetoplasto del parásito (Fotografía N° 18). El tamaño del fragmento que amplificó el control positivo se determinó previamente con los geles de agarosa corridos con el marcador y con un gráfico en escala semilogarítmica; es por ello que la fotografía N° 18 no muestra el Marcador de bajo peso molecular 100 (GIBCO-BRL) con el fin de economizar el material existente en el laboratorio.

A las muestras positivas se les realizó una precipitación con Etanol (95% y 70%) ya que en 3 ensayos anteriores de PCR confirmativo presentaron barridos y excesos por la presencia de restos de proteína (Datos no mostrados).

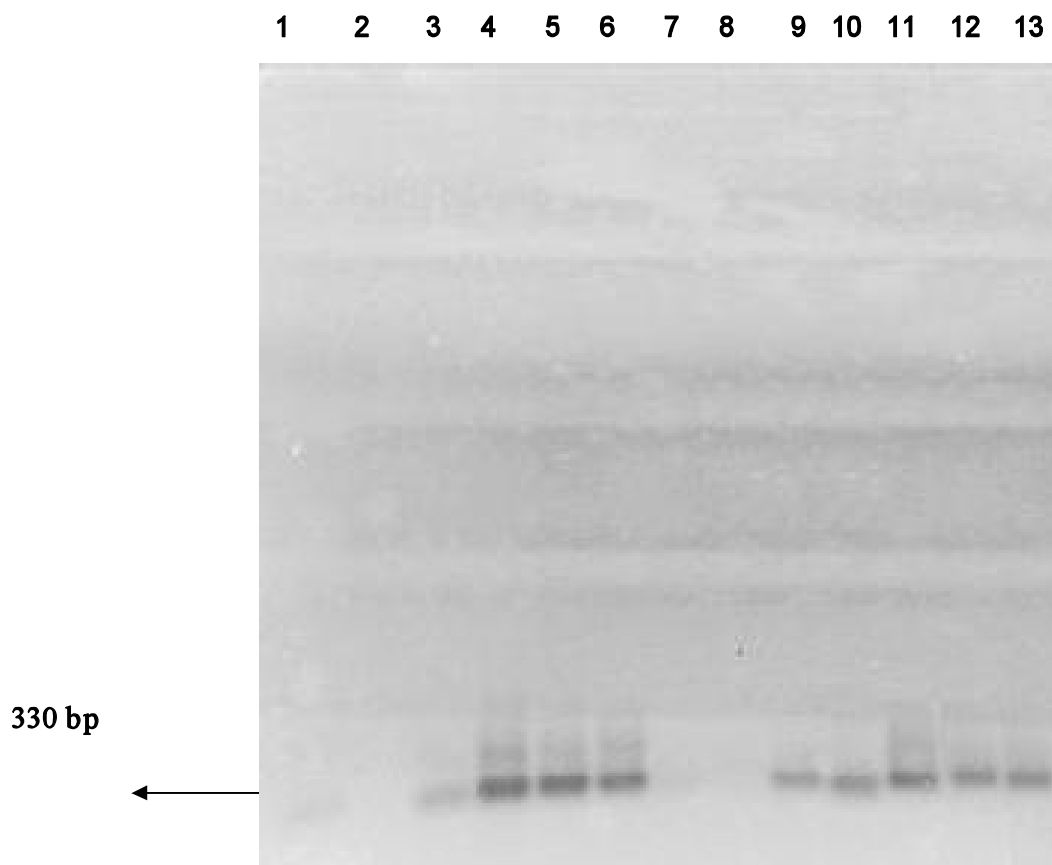


Figura N° 18. Amplificación de ADN de muestras de sangre de individuos positivos y negativos para la Enfermedad de Chagas, corrido en gel de Agarosa al 0.5% (GIBCO-BRL) y teñido con Bromuro de Etidio a 10 mG/mL (SIGMA). Líneas: 1, ADN de *T. cruzi* a 50 pG/ μ L (Control Positivo). 2, Blanco. 3, ADN M-041. 4, ADN M-042. 5, ADN M-043. 6, ADN M-189. 7-8, ADN M- 190 y M-191 (negativas). 9, ADN M-144. 10, ADN de *T. cruzi* a 100 pG/ μ L (Control Positivo). 11, ADN M-019. 12, ADN M-040. 13, ADN M-029.

8. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es un problema que está ligado a la pobreza y al subdesarrollo, ya sea en el ambiente rural o urbano, afectando principalmente a las personas de escasos recursos económicos que habitan en dichas áreas y en viviendas que favorecen una exposición prolongada a la infección por las picaduras de los vectores Reduviideos (Cortés *et al*, 2000).

Las personas seleccionadas para el estudio se caracterizaron por habitar en viviendas ubicadas en distintas veredas del municipio (Cuadros N° 3 al 6) y en zonas urbanas y periurbanas de la cabecera, donde las condiciones de vida son inhumanas y sus viviendas favorecen el contacto con el vector de *T. cruzi*. Las múltiples características de las zonas estudiadas (Fotografías N° 8 a N° 12 y Anexo E) en especial la de los sectores marginados y poblados por los desplazados, sin descartar las zonas urbana y rural, donde se observan condiciones de pobreza que favorecen la aparición de muchas infecciones, donde la enfermedad de Chagas tiene una prioridad especial. Estas zonas muestran el abandono total que sufren sus habitantes y la forma de vida que han tenido que adoptar de manera forzosa por culpa de la violencia.

Toda la población que pertenece a las distintas áreas demostraron, sin excepción alguna, conocer a los vectores y aún más padecer sus picaduras y sus síntomas. Sin embargo desconocen en gran parte todo lo relacionado a la enfermedad de Chagas.

La presencia de síntomas característicos a la enfermedad, después de una o varias picaduras, varió en la población estudiada; ya que dentro de los 8 casos con PCR positivos se encontró un individuo asintomático con picaduras no recientes (años); siendo un caso muy contrario al de 3 individuos que presentaron meses antes el signo de Romaña-Mazza y 4 individuos con picaduras recientes y malestar general (Cuadro N° 7). Este hecho presentado demuestra que en realidad la población infantil es la más susceptible a contraer la infección y a desarrollar síntomas del período agudo; mientras que en la población adulta se tiende a desarrollar las manifestaciones del período crónico, sin descartar para ambas poblaciones el período de latencia.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es muy importante resaltar que la sintomatología de la enfermedad presentada, puede estar en dependencia de la constitución genética del individuo, la edad, la inmunidad natural y sobre todo de los factores dependientes del parásito (Hiller *et al*, 2000) haciendo que estos síntomas varíen de un individuo a otro. La pobreza, la desnutrición, la mala alimentación, la falta de higiene, la falta de agua potable y el desconocimiento muchas veces por ignorancia, son factores que hacen de esta enfermedad, la

enfermedad de los pobres y a la vez convertirla en un verdadero problema de salud pública (Antonovich, 1999).

Los casos detectados ponen de manifiesto la presencia de la infección en el municipio y a la vez se comprueba la existencia de los vectores triatominos de *T. cruzi* en las áreas estudiadas. Los dos casos presentados en el área urbana/periurbana contribuyen a una urbanización de la endemia como posible causa de los desplazamientos internos de la población rural en los últimos años en el municipio. Además es importante mencionar que la presencia de potreros, nidos de aves y las distintas *sp* de mamíferos domésticos en las viviendas favorecen a los vectores, peridomiciliarios y aun de ciclo selvático, a tener una fuente de alimento y un refugio seguro.

Hasta la fecha en el municipio sólo se ha reportado un caso de la enfermedad de Chagas en el año 1998 (DASSALUD, 2002), pero el reporte de la presencia de vectores por la población de las viviendas del área urbana y rural junto con la ausencia de programas de control y eliminación del vector han permitido la aparición de nuevos casos; estando a la espera de una pronta solución y una revelación de muchos otros casos que hasta el momento permanecen ocultos. Para el diagnóstico de la enfermedad por la técnica de PCR se realizaron varios ensayos en los cuales se trabajo con distintas temperaturas y tiempos de alineación que no favoreció la obtención de un producto confiable que permitiera establecer un diagnóstico seguro de la infección, debido a la presencia de fragmentos inespecíficos con un tamaño de

800 bp y de igual forma la no-amplificación del ADN de *T. cruzi* (Fotografía N° 13, línea 7). Todo esto conllevó a seguir realizando los ensayos hasta determinar las condiciones ideales para detectar la presencia o ausencia del K-ADN del parásito en las distintas muestras de sangre.

Con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min. y 30 ciclos a 95°C por 45 seg. 47°C por 45 seg. 65°C por 45 seg. de desnaturalización, alineación y extensión respectivamente y un ciclo de extensión final de 65°C por 5 min utilizando los cebadores s-121 y s-122 a 20 picomoles se obtuvo el producto esperado, un fragmento de K-ADN de *T. cruzi* de 330 bp de una de las cuatro regiones variables de los minicírculos del kinetoplasto, indicando así su presencia en muestras de sangre de 8 pacientes de las áreas rural, urbana y periurbana del municipio de Ovejas - Sucre. En los casos detectados la posibilidad de haber una reacción cruzada con *Leishmania* y *T. rangeli* se considera nula, ya que los cebadores utilizados son específicos para *T. cruzi*. (Cuadro N° 1).

Al momento de analizar los 165 productos del PCR de las muestras de ADN se consideraron sólo 30, como sospechosas de contener el K-ADN de *T. cruzi*, por presentar un fragmento muy borroso, con presencia de barrido y un exceso en el frente de corrido (Datos no mostrados). Consecutivamente se realizaron dos PCR confirmativos en los cuales se obtuvieron los mismos resultados; pero en cada caso independiente se descartaron algunas muestras por no amplificar el fragmento (Datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en todos los tres PCR realizados permitieron sospechar que las muestras de ADN podrían estar contaminadas con residuos de proteínas; ya que en algunas se tuvo que utilizar un menor volumen de la enzima Proteinasa K (GIBCO-BRL) por que la cantidad existente en el laboratorio no era la suficiente para todas las muestras. Por lo tanto, se debió realizar una segunda precipitación con Etanol al 95%, Acetato de Sodio 3M y Etanol al 70% según la metodología de Sambrook *et al*, 1.989; esto con el objeto de poder precipitar una mayor cantidad de ADN y así llegar a eliminar los posibles restos de proteína que estuvieran contenidos en dichas muestras.

Los resultados de un cuarto PCR realizado demostraron, a través de sus productos, que en realidad si existieron los restos de proteínas y a la vez se reconfirmó la presencia del K-ADN del *T. cruzi* en sólo 8 muestras que en todos los ensayos amplificaron el fragmento de 330 bp. Los fragmentos amplificados se mostraron con una alta nitidez y consistencia; mientras que otros lo hicieron con un barrido muy notorio, algunas se mostraron un poco consistentes. Los fragmentos obtenidos amplificaron a la misma distancia de corrido del K-ADN de *T. cruzi* (control positivo) indicando que en realidad el fragmento tiene un tamaño molecular de 330 bp. Una posible contaminación, por parte de los reactivos, se descartó por completo ya que el blanco utilizado en el ensayo así lo demostró (línea 2, Fotografías N° 18).

Existe la posibilidad que la consistencia e inconsistencia de algunos fragmentos amplificados estén en dependencia de la concentración del ADN obtenido,

después de la segunda precipitación, o que se deba a errores humanos en el momento de pipetear el volumen de ADN para el ensayo de PCR o al volumen del producto obtenido y sembrado al momento de correr la Electroforesis. Para corroborar lo expuesto anteriormente, es importante resaltar que en la síntesis *in vitro* de ADN los errores no son constantes, pero dependen un poco de la Polimerasa, de la secuencia del ADN, de los errores menos considerados y de las condiciones de la reacción (Eckert *et al*, 1999).

En síntesis, la optimización de la técnica de PCR es dependiente, en primer lugar, de la fidelidad de la enzima y a su vez ésta depende de las concentraciones y cantidades de los demás reactivos del PCR y de las condiciones de temperatura y tiempos establecidos para el desarrollo de la técnica.

9. CONCLUSIONES

Del anterior estudio se concluye:

- ✓ La Técnica Molecular PCR es específica y sensible para detectar el ADN de *T. cruzi*, aún cuando la persona infectada esta en la fase crónica de la enfermedad, donde los niveles de parasitemia en sangre son demasiado bajos. Lo anterior permitiría establecer un diagnóstico diferencial preciso y así aplicar un tratamiento eficaz.

- ✓ Se confirmó la presencia de casos autóctonos de la enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas, después de haberse comprobado y reportado un caso de la enfermedad en el año de 1.998.

- ✓ Debido a la detección de nuevos casos de la enfermedad; éste estudio contribuye a la elaboración de mejores programas de control llevados a cabo por la E.S.E del municipio de Ovejas (Sucre).

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar un seguimiento periódico, a los 8 pacientes positivos, que involucre exámen parasitológico de sangre, serologías, electrocardiogramas y estudios radiológicos del corazón y tracto digestivo, ya que la enfermedad de Chagas es de evolución crónica y requiere una vigilancia sostenida durante años.

- ✓ Realizar un estudio más amplio en el municipio de Ovejas utilizando técnicas como PCR, IFI, ELISA, HAI o FC que abarque toda la población en riesgo y así determinar la situación real de la enfermedad.

- ✓ Crear programas para eliminar al vector en el que se utilicen insecticidas especiales (hexacloruro de benceno y su isómero gamexano, organoclorados, organofosforados y carbamatos). De igual forma mejorar la vivienda y ofrecer educación a los habitantes en relación con la presencia de los vectores y su relación con la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

ALMEIDA *et al.* A Highly Sensitive and specific chemiluminescent Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for diagnosis of Active *Trypanosoma cruzi* infection transfusion. Vol.37, agosto 1.997. P.200-230.

AMATO NETO, Vicente. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. Etiological treatment for Infection by *Trypanosoma cruzi*. (en línea). Vol. 94, Suppl.I: 337-339, 1999 september 1999 (citado 2002 Junio 13). Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/700.pdf>.

ANTONOVICH, Alan E. Mal de Chagas. Epidemia-Pandemia-Endemia. (en línea). 1.999. ICQ: 2479386. (citado 2002 junio 13). Disponible en: [@alan.netverk.com.ar](http://alan.netverk.com.ar).

BLITZMAN, Mario. La Enfermedad de Chagas-Mazza. En: Primer Congreso Virtual de Cardiología. (en línea). Buenos Aires – Argentina. 1999. (citado 2002 Diciembre 6). Disponible en: <http://www.fac.org.ar/virtual/llave/index.htm>.

BORGES, EC *et al.* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. Genetic Variability in Brazilian Triatomines and the Risk of Domiciliation. (en línea). Vol. 94, Suppl.I: 371-373, 1999. september 1.999. <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/610.pdf>.

BOTERO, David y RESTREPO, Marcos. Tripanosomiasis. En:----- Parasitosis Humanas. CIB. Corporación para Investigaciones Biológicas. 2 ed. Medellín - Colombia. 1992. P. 200-203.

BRITTO C, *et al.* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. RESEARCH NOTE: Polymerase Chain Reaction Detection: New Insights into the Diagnosis of Chronic Chagas Disease. (en línea). Vol. 94 Suppl.I :305-306, 1999. september 1.999. (citado 2002 Junio 7). Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/09.pdf>.

BUFFONE & DARLINGTON. Rapid PCR Sample Preparation From Whole Blood. En: DNA Probes: Probe and Target Amplification system. 1985.

CAMPBELL. Diagnosis of Chagas Disease En: *Trypanosoma cruzi* - Epidemiology and Diagnosis of Infections. (en línea) C168 Feb.9 .1.998. (Citado 2002 septiembre 23). Disponible en: http://www.hhmi.uncla.edu/C168/week3/lecture3/lecture_3.html.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Developing Public Health Software Applications With Epi Info 2000. (en línea). May14-17, 2002. Atlanta Georgia. Disponible en: <http://www.sph.emory.edu/EPICOURSE/EpilInfoMay2002.course.doc>.

CHIARI, Egler. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction , Hemoculture and Serologic Methods. (en línea) Vol.94, suppl.I:299-300.1999.(citado 2002 septiembre 20). Disponible en: http://www.dbm.fiocruz.br/www-mem/94_sup1/main.html.

CORTES BUELVAS, Armando; GUHL, Felipe y BARRAZA, Marcos. Enfermedad de Chagas Transfusional en Cali-Colombia.(en línea) Colombia Med 1.995; 26:6-11. (citado 2002 Junio 13). Disponible en: http://www.Colombia_medica.univalle.edu.co/covol26 N°1/Indice.html.

CORREDOR, Augusto y MATIZ, Hernando. Trypanosomiasis Americana En: Medicina Interna. Fundación Instituto de Reumatología e Inmunología. 3ª ed. Bogotá. 1.997. Tomo II. P. 345-378.

DASSALUD.2002.

DE ARAUJO JORGE, Tania C. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. Biology and Ultra-Structure of *Trypanosoma cruzi*: 90-Years Old Challenge for Scientists.(en línea) Suppl.I:131-134. 1.999.(citado 2002 Junio 2).disponible en: <http://www.dbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/09.pdf>.

DIAZ M, Rosaura; GARRIDO, Tulio C. Sucre Expresión Artística. 1ª ed. Sincelejo.2002. P.43.

DIEZ, Cristina *et al.* PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en Chagas Neonatal; Una alternativa para el diagnóstico precoz? (en línea). Medicina- Volumen 58-N° 4, 1998 (citado 2002 septiembre 20).

ECKERT, Kristin y KUNKEL, Thomas. The Fidelity of DNA Polymerases used in the Polymerase Chain Reaction. En: M. J; Mc. Pherson; P. Quirke y G. R, Taylor. PCR. A Practical Approach. Serie Editores D. Rickwood; B. D, Hames. 1.991. P. 222-243.

FARIÑA GONZALEZ, J y MC. MILLANA DE, Ynes. PCR y Aplicaciones de la PCR. En: -----Patología Molecular en la Citopatología del aparato respiratorio y de la Pleura. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. (en línea). 1998 (citado 2002 Diciembre 6). Disponible en: <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/019/aplications.htm>.

FIORENTINO G, Susana *et al.* La Inmunología en el Diagnóstico clínico. Centro Editorial Javeriana CEJA. Santa Fé de Bogotá. 1.994. P-84.

FRAGATA FILHO, Abilio Augusto *et al.* Manual " Tratamiento etiológico da Doença de Chagas". Fundação Nacional de Saúde. (en línea). 1996. (citado 2002 Diciembre 6). Disponible en: <http://www.farmakos.com/consultorio.htm>.

GRAHAM R, Taylor. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automatión. En: M. J; Mc. Pherson; P. Quirke y G. R, Taylor. PCR. A Practical Approach. Serie Editores D. Rickwood; B. D, Hames. 1.991. P. 1-9.

GOMES, Mónica Lucia. *Trypanosoma cruzi*. Use of an optimized PCR method in chronic Chagas disease diagnosis, and molecular characterization of strains isolated from chronic chagasic individuals living in northwest Paraná, Brazil. En: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (en línea) mai-jun, 1998. (citado 2002 septiembre 20). Disponible en: <http://www.mtsu.edu/~scientia/journals/Vol.3/issuez/samcoli.html>.

GUHL ACAD, Felipe. Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana situación Actual en Colombia. (en línea). Medicina Chagas.htm. 2000. (Citado 2002 junio 13). Disponible en: <http://www.enColombia/academedicina/220253.htm>.

----- Programas en la Eliminación de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas en Colombia.(en línea). Medicina Chagas 2000.(Citado 2002 junio 13). Disponible en: <http://www.anm.fepafem.org/220253.htm>.

GUHL, Felipe y A. VALLEJO, Gustavo. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On-line*. Interruption of Chagas Disease Transmisión in the Andean countries: Colombia. (en línea). Vol. 94,Suppl.I:413-415, 1.999 september 1999.(Citado 2002 Junio 13). Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/700.pdf>.

HIDALGO TORRES, Marisa; NUÑEZ GONZALES, Rebeca y CANALES ROMERO, Marilena. Boletín Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile. (en línea). 1997;26:169-172.(citado 2002 Diciembre 6)

HILLER CORREA, Georg *et al*. Evaluación de la posible Reactividad de Anticuerpos contra la Hemaglutinina del virus de la Influenza con moléculas de invasión del *Trypanosoma cruzi*.(en línea).2000.(citado 2001 junio 6). Disponible en: <http://www.memorias.instituto.oswaldo.cruz.2.htm>.

JANSEN, Ana María *et al*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On-line*. The Sylvatic Cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still Unsolved puzzle.(en línea). SUPPL 1:203-204.1.999.(Citado 2002 junio 7). Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/19ret.htm>.

LABORATORIOS Géminis, c.a.2002. <http://www.labgeminis.com/disclaimer.htm>.

LAIRMORE, Terry C. Method: Polymerase Chain Reacctions. May 9, 1990. (en línea). (Citado 2001 Junio 6). En: <http://www.labge.nomik.com/tecnicas.htm>.

LLACUNAS y QUIZCO. Diccionario Geográfico de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. INGAC. Tomo III. 3ª ed. Bogota.1.996.P.348.

MORALES,W. Información Básica sobre La Enfermedad de Chagas. En: Curso de Parasitología Médica.(en línea). 1999.

MACEDO, Vanize. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On-line*. Indeterminate Form of Chagas Disease.(en línea). Vol. 94,Suppl.I:311-316,1.999. september 1.999.(Citado 2002 Julio 7).Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/4800.pdf>.

MEENA H, Mahbubani; ASAN K. Bey. Applications of Polymerase Chain Reaction Methodology in Clinical Diagnostics. En: GRIFFIN, Annette M y GRIFFIN, Hugh G.

MOLINA, Jorge *et al* . Distribución actual e importancia epidemiológicas de las especies de triatomíneos (Reduviidae-Triatominae) en Colombia.2000. En: Biomédica 2000; 20:344-60.

PCR Technology Current Innovations. Estados Unidos: CRC, press Boca Raton ann Arbor.1.994.P.314-317.

MM MACHADO *et al*, A simplified Method for Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine Vectors. (en línea).Vol.95(6):863-866,Nov/Dec 2000.(citado 2002 septiembre 20).disponible en:<http://www.memorias.ioc.fiocruz.br/956/>.

NEVA, Franklin A. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) (en línea). 1999.Disponible en: [http:// www.infomed.hpg.ig.com.br/bemvindo.html](http://www.infomed.hpg.ig.com.br/bemvindo.html).

OMS. Organización Mundial de la Salud.1991

PASSOS, VMA *et al*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz *On -line*. RESEARCH NOTE: Differential Serodiagnosis of Human Infections Caused by *Trypanosomas*.(en línea).).Vol. 92 (6):791-793.Suppl. 1-1.999. september 1.999.(Citado 2001 Junio 6). Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/80.pdf>.

PINTO DIAS, João Carlos. Epidemiology of Chagas Disease. En: S. Wendel; Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi. Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and Clinical medicine. (en línea). (Edt.). ISBT BRAZIL'92 SAO PAULO, BRAZIL. Disponible en: http://www.dbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter_4html.

----- Evolución del Conocimiento Epidemiológico y Situación Epidemiológica Actual. En: Primer Congreso Virtual de Cardiología. (en línea).2000.(Citado 2002 Diciembre6).Disponible : <http://pcvc.sminter.com.ar/cvrtual/cuirtesp/cientesp/htm>.

Resolución N° 008430 de 1993. Sante Fe de Bogotá. En: COLOMBIA-Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico. Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud.

SALAZAR, Clara Lina; RESTREPO, Berta Nelly y PARRA Gabriel Jaime. ¿Conoce usted la Enfermedad de Chagas?. Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil. República de Colombia. Ministerio de Salud. Medellín-Colombia. 2000. 11.P.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Agarose Gel Electroforesis of DNA. En: Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2 ed. 1.989. Tomo I. P. 6.3-6.13.

-----*In vitro* Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. En: Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2 ed. 1.989. Tomo II. P. 14.14-14.21.

----- Appendix E: Commonly Used techniques in Molecular Cloning. Purification of Nucleic Acids. Extraction with Phenol:Chloroform. En: Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2 ed. 1.989. Tomo III. P. E.3-E4.

TAPIA COYER, Roberto. Trypanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas. En:----- Norma Oficial Mexicana de Emergencia Nom. Em-001-Ssaz-1999, para la Vigilancia, Prevención y control de Enfermedades transmitidas por vectores. (en línea). México 1999. (Citado 2002 Diciembre 6).

VALLEJO, Gustavo Adolfo, *et al.* La Biología Molecular y sus Aplicaciones en el estudio de la Tripanosomiasis Americana. (en línea). 1.999. (Citado 2002 septiembre 23).

WINCKER, P. *et al.* High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area (en línea) FEMS Microbiol Lett. 1994. Dec 15; 124(3): 419-23 (citado 2002 septiembre 20).

ZIGMAN, Brener. *Trypanosoma cruzi*. Taxonomy, Morphology and Life Cycle En: Wendel, Z. Brener, M.E. CAMARGO, A. Rassi. Chagas Disease-American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and Clinical medicine. (en línea). 1.992 ISBT BRAZIL' 92, SAO PAULO, BRAZIL. Disponible en: <http://www.dbm.fiocruz.br/tropical/chagas7chapter3.html>.

ANEXOS

**ANEXO A. UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LA ZONA DE ESTUDIO EN EL
DEPARTAMENTO DE SUCRE-COLOMBIA**



ANEXO B. ENCUESTA No. 1

Encuesta de Investigación de Trabajo de Campo sobre La Enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas-Sucre.

Vivienda No. : _____
 Área: Urbana: _____

Localidad: _____
 Rural: _____

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA VIVIENDA

1.1 Tipo de Techo

A. Zinc () B. Palma () C. Tejas () D. Otros ()

1.2 Tipo de Pared

A. Bahareque () B. Bloque () C. Madera () D. Otros ()

1.3 Tipo de Piso

A. Cemento () B. Madera () C. Tierra () D. Otros ()

2. OBSERVACIONES DE LA PRESENCIA DE VECTORES (PITOS) EN LA VIVIENDA Y/O ALREDEDORES

A. Sí () B. No ()

2.1 Si la respuesta es afirmativa especifique el sitio de la vivienda

A. Sala () B. Dormitorios () C. Cocina () D. Alrededores () E. Otros ()

2.2 Indique el sitio exacto

A. Paredes () B. Techo () C. Piso () D. Otros

3. ¿EXISTEN NIDOS, POTREROS Y/O ESTABLES CERCANOS A LA VIVIENDA?

A. Si () B. No ()

4. CUANTIFIQUE EL NÚMERO DE HABITANTES

4.1 ¿Cuántos habitantes tiene la vivienda?

A. 2 () B. 3 () C. 4 () D. 5 () E. Más ()

4.2 ¿Cuántos niños viven en la vivienda?

A. 2 () B. 3 () C. 4 () D. 5 () E. Más ()

4.3 ¿Cuántos adultos habitan en la vivienda?

A. 2 () B. 3 () C. 4 () D. 5 () E. Más ()

5. EDAD DE LOS HABITANTES

5.1 De los Niños

A. 0 – 2 () B. 3 – 5 () C. 6 – 8 () D. 9 – 11 E. 12 en adelante

5.2 De los adultos

A. 18 – 25 () B. 26 – 35 () C. 36 – 45 () D. 46 – 55 E. Más

6. ANTECEDENTES FAMILIARES CON PROBLEMAS CARDÍACOS

6.1 ¿Alguien en la familia presenta problemas cardíacos?

A. Sí () B. No ()

6.2 ¿Se ha presentado muerte súbita en algún miembro de la familia?

A. Sí () B. No ()

6.3 Si se presentan problemas cardíacos, en qué miembros?

A. Niños () B. Adolescentes () C. Adultos () D. Ancianos

7. ¿EN EL SENO DE LA FAMILIA, SE TIENE CONOCIMIENTO DE QUE EL PITO TRANSMITE UN PARASITO QUE PUEDE CAUSAR GRAVES PROBLEMAS DE SALUD

A. Si () B. No ()

8. ¿LAS AUTORIDADES SANITARIAS DEL MUNICIPIO HAN REALIZADO CONTROLES O ALERTADO A LAS PERSONAS ACERCA DEL PELIGRO POTENCIAL QUE REPRESENTA CONVIVIR CON PITOS?

A. Si () B. No ()

9. NOMBRE DE LOS HABITANTES DE LA VIVIENDA Y CARACTERISRICAS GENERALES.

10. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y MORFOLÓGICAS DEL VECTOR

11 ¿SE HAN PRESENTADO PICADURAS DE PITOS?

A. Si () B. No ()

12. SI HAN HABIDO PICADURAS, ¿EN CUÁLES PERSONAS?

- A. Niños () B. Adolescentes () C. Adultos () D. Ancianos

13. TIEMPO DE HABERSE PRESENTADO LA PICADURA

- A. Días () B. Semanas () C. Meses () D. Años

14. ¿SE HAN OBSERVADO SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD DESPUÉS DE LA PICADURA?

- A. Si () B. No ()

15. SI ES AFIRMATIVA LA RESPUESTA, ¿QUÉ TIPO DE SÍNTOMAS?

- A. Fiebre () B. Infamación de los Ojos () C. Otros

16. ¿SE LES HA BRINDADO ASISTENCIA MÉDICA?

- A. Si () B. No ()

17. ¿QUÉ TIPO DE TRATAMIENTO HA SEGUIDO?

18. ¿QUÉ MEDIDAS DE CONTROL HA TOMADO PARA CONTRARRESTAR A LOS VECTORES O PITOS?

PCR

- Negativo () Positivo()

Nombre: _____

ANEXO C. CONSENTIMIENTO INFORMADO N° 1

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio “Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas-sucre” que se realiza en la Universidad de Sucre y cuyos Objetivos Específicos son: 1- Optimizar la técnica de PCR como una forma para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. 2- Detectar la infección por *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de desplazados y no desplazados en el municipio de Ovejas - Sucre. 3 - Realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos en el trabajo de campo en las áreas rural, periurbana y urbana del municipio de Ovejas.

Soy consciente de que los procedimientos y pruebas para lograr los objetivos mencionados consistirán en extracción de sangre por punción intravenosa y que los riesgos a mi persona serán de riesgo mínimo, según lo estipulado en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Entiendo que del presente estudio se derivaran beneficios como el diagnóstico de la enfermedad en la población seleccionada impidiendo, de esta forma, una muerte segura.

Tengo la plena seguridad de recibir respuesta a preguntas y aclaraciones sobre mis dudas acerca de la investigación y la debida actualización en lo referente a los resultados de la misma.

El destino de las muestras obtenidas será el estipulado en los objetivos y entiendo que estos no se comercializaran ni serán usadas en otras investigaciones sin mi consentimiento.

Comprendo que me será respetado mi derecho a la vida y a la intimidad; así como la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Firma

C.C _____ de _____

ANEXO D. CONSENTIMIENTO INFORMADO N° 2

Yo _____ con C.C N° _____ de _____ como representante legal de _____ quien es menor de edad, declaro conocer los parámetros del estudio “Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en el municipio de Ovejas-sucre” que se realiza en la Universidad de Sucre y cuyos Objetivos Específicos son: 1- Optimizar la técnica de la PCR como una forma para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. 2- Detectar la infección por *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de desplazados y no desplazados en el municipio de Ovejas-Sucre.3 - Realizar un análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos en el trabajo de campo en las áreas rural, periurbana y urbana del municipio de Ovejas.

Soy consciente de que los procedimientos y pruebas para lograr los objetivos mencionados consistirán en extracción de sangre por punción intravenosa y que los riesgos a mi persona serán de riesgo mínimo, según lo estipulado en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Entiendo que del presente estudio se derivaran beneficios como el diagnóstico de la enfermedad en la población seleccionada impidiendo, de esta forma, una muerte segura.

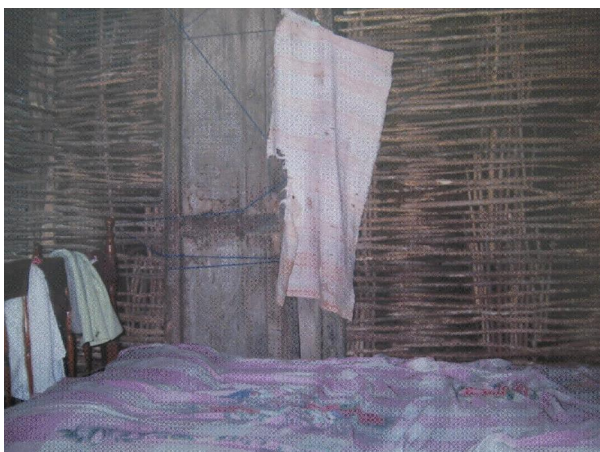
Tengo la plena seguridad de recibir respuesta a preguntas y aclaraciones sobre mis dudas acerca de la investigación, y la debida actualización en lo referente a los resultados de la misma.

El destino de las muestras obtenidas será el estipulado en los objetivos y entiendo que estos no se comercializaran ni serán usadas en otras investigaciones sin mi consentimiento.

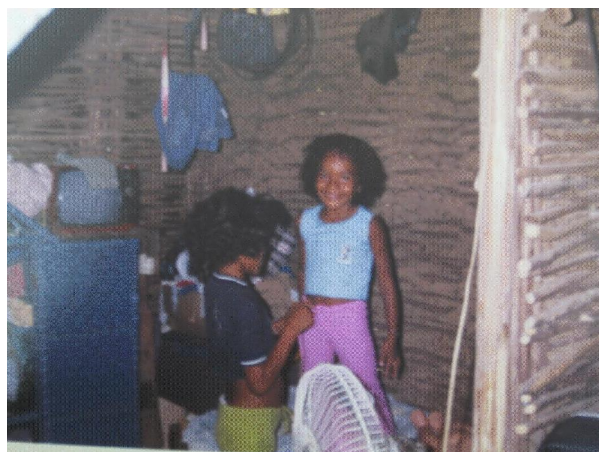
Comprendo que me será respetado mi derecho a la vida y a la intimidad; así como la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Firma
C.C _____ de _____

ANEXO E. CONDICIONES DE LAS VIVIENDAS VISITADAS QUE FAVORECEN EL ESTABLECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN DE LOS VECTORES



Dormitorio de vivienda donde los vectores establecen sus moradas



Interior de vivienda con características óptimas para los vectores.



Cocina de vivienda del sector salida hacia la peña.



Terraza de una vivienda del barrio Boca Canoa y animales domésticos.



Vivienda del barrio San Isidro



Cocina y sala de una vivienda del Barrio San Isidro.

ANEXO F. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
EN LATINOAMERICA



Fuente: <http://www.who.int/ctd/html/chageo.html>