

# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

RELACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA  
EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA FASE  
AGUDA Y CRÓNICA

REYES MARIDUEÑA PAOLA STEPHANIE  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

RELACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA  
FASE AGUDA Y CRÓNICA

REYES MARIDUEÑA PAOLA STEPHANIE  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

RELACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA FASE AGUDA Y CRÓNICA

REYES MARIDUEÑA PAOLA STEPHANIE  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 09 DE DICIEMBRE DE 2020

MACHALA  
09 de diciembre de 2020

# Trabajo practico para revision

*por* Paola Stephanie Reyes Maridueña

---

**Fecha de entrega:** 20-nov-2020 01:39p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1451817557

**Nombre del archivo:** TURNITI.docx (33.44K)

**Total de palabras:** 3176

**Total de caracteres:** 16754

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, REYES MARIDUEÑA PAOLA STEPHANIE, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado Relación de técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en la fase aguda y crónica, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

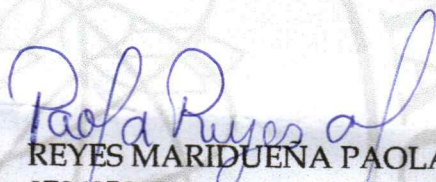
La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 09 de diciembre de 2020

  
REYES MARIDUEÑA PAOLA STEPHANIE  
0706850682

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitemia causada por el protozooario *Trypanosoma Cruzi*, que se desarrolla en dos fases clínicas; aguda y crónica, para el adecuado diagnóstico se debe determinar la etapa que atraviesa el paciente y se realizan pruebas parasitarias; estas pueden ser moleculares o inmunológicas. El presente trabajo describe la relación entre las pruebas moleculares PCR y las pruebas inmunológicas (ELISA, IFI, HAI) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y prevenir la evolución de la infección.

El método cuantitativo PCR se usa para amplificar el ADN e identificación del parásito *Trypanosoma Cruzi*. Para las pruebas de inmunoensayos se usó el método cualitativo de anticuerpos IGG para identificar antígenos anticuerpos de la enfermedad.

Se comparó las técnicas inmunológicas con las técnicas moleculares en las fases de la enfermedad de Chagas, dando como resultado que las pruebas inmunológicas son más eficaces en la fase crónica y las pruebas moleculares de PCR son más exactas en la fase aguda.

Se concluye que el PCR es el más adecuado en la fase aguda, porque existe un incremento parasitario en torrente sanguíneo y en la fase crónica la parasitemia suele disminuir por ello las pruebas inmunológicas son más exactas.

**Palabras claves:** Fases Clínicas, *Trypanosoma Cruzi*, Inmunoensayo, PCR, Prevenir.

## **ABSTRACT**

Chagas disease is a parasitemia caused by the protozoa *Trypanosoma Cruzi*, which develops in two clinical phases; for proper diagnosis, the stage through the patient should be determined and parasitary tests performed; these can be molecular or immunological. This work describes the relationship between PCR molecular tests and immunological tests (ELISA, IFI, HAI) for the diagnosis of Chagas disease and preventing the evolution of infection.

The quantitative PCR method is used to amplify the DNA and identification of the *Trypanosoma Cruzi* parasite. The qualitative method of IGG antibodies was used for immunoassay testing to identify antigens antibodies to the disease.

Immunological techniques are compared with molecular techniques in the phases of Chagas disease, resulting in immune tests being more effective in the chronic phase and molecular PCR testing is more accurate in the acute phase.

It is concluded that PCR is the most suitable in the acute phase, because there is a parasitic increase in the bloodstream and in the chronic phase parasitemia usually decreases therefore the immune tests are more accurate.

**Keywords:** Clinical Phases, *Trypanosoma Cruzi*, Immunoassay, PCR, Prevent.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo General.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	6
3. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE CASO CLÍNICO.....	7
3.1 Caso Práctico.....	7
3.2 Pregunta a resolver.....	7
3.3 Marco Teórico.....	7
3.3.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	7
3.3.2 Morfología del Vector.....	8
3.3.3 Ciclo Biológico de Trypanosoma cruzi.....	9
3.3.4 Medios de contagio del trypanosoma cruzi.....	10
3.3.5 Sintomatología.....	11
3.3.8 Técnicas de análisis para determinar la presencia del parásito.....	12
3.3.8.1 Técnicas moleculares.....	12
3.3.8.2 Técnica inmunológica (Elisa, HAI, IFI).....	13
3.3.9 Equipos.....	14
3.3.9.1 Termociclador.....	14
3.3.9.2 Microscopio de Luz Ultravioleta.....	14
3.4 Materiales y Métodos.....	14
3.4.1 Materiales de estudio.....	14
3.4.2 Métodos cualitativos y cuantitativos.....	14
3.5 Metodología.....	14
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSIÓN.....	17
6. CONCLUSIÓN.....	17
8. BIBLIOGRAFÍA.....	19

### Tabla de Ilustraciones

Ilustración 1 Ciclo de Vida de Vector(Moriconi et al. 2019).....	9
Ilustración 2 ciclo biológico del T. cruzi(Moriconi et al. 2019).....	10



Ilustración 3 Amplificación y detección de ADN de T. Cruzi por PCR en tiempo real(Desarrollo de ADN, Test T.cruzi @ notiwienner.net n.d.) ..... 13

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es originada por la presencia de un protozooario conocido como *Trypanosoma cruzi*, el cual fue descubierto en el año 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Brasil junto a su ayudante de laboratorio el investigador Cruz realizó las investigaciones del insecto y mediante el análisis clínico procedió al aislamiento del parásito presente en la sangre de una niña de dos años, esta enfermedad es transmitida a los humanos por medio de heces u orina de insectos hemípteros triatomínicos, llamados popularmente como “vinchucas, chinchorros”<sup>1</sup>.

Debido a la gravedad de esta patología se ve la necesidad de conocer sobre estudios clínicos que permitan determinar la fase de la enfermedad.

Este padecimiento es más conocido como la enfermedad de Chagas y de mayor contagio en las zonas más vulnerables, inicialmente son áreas rurales pero las migraciones de personas contagiadas han llevado la enfermedad a países desarrollados<sup>2</sup>. El presente estudio es de relevancia para el correcto diagnóstico de la enfermedad puede prevenir el progreso de la misma, puesto que esta es silenciosa y puede causar daños significativos en el organismo de los seres humanos. El conocer la relación de las técnicas moleculares e inmunológicas en las fase aguda y crónica ayudará a prevenir la evolución de la enfermedad en el paciente.

Por otro lado la Organización Mundial de la salud (OMS) estima que alrededor de 7 a 8 millones de personas se encuentra afectada por esta parasitemia en América Latina, en el Ecuador se ha reportado casos en 20 provincias, existen 15 especies y 7 son vectores potenciales, Hasta el 2015 en la provincia se reportaron casos en los cantones de Santa rosa (zona cálida), Arenillas, Atahualpa, Piñas, Balsas, Marcabelí, Las Lajas, Zaruma, Portovelo.

Es por ello la relevancia del estudio sobre las pruebas parasitológicas en enfermedad de Chagas por medio de esta comparación de la prueba de PCR con las pruebas de inmunoensayo se puede determinar el diagnóstico temprano de la enfermedad. Durante la etapa aguda de la enfermedad, la parasitemia se la localiza solo en torrente sanguíneo y el paciente puede seguir el tratamiento farmacológico.

Un diagnóstico adecuado y anticipado del cuadro clínico puede evitar daños en sus órganos; cardíacos, digestivos y en algunos casos hasta la muerte, le permite al médico tomar decisiones terapéuticas a tiempo

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Relacionar las técnicas inmunológicas Elisa, IFI, HAI con la técnica molecular PCR mediante el análisis de técnicas diagnósticas en la fase aguda y crónica para la prevención de la evolución de la enfermedad en el paciente.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar las características morfológicas y biológicas del *Trypanosoma cruzi* mediante investigación bibliográfica para su identificación macroscópica y clínica.
- Diferenciar las características de la enfermedad de Chagas en la fase aguda y crónica por medio de la investigación bibliográfica para el diagnóstico clínico.
- Analizar las técnicas inmunológicas ELISA, HAI, IFI y molecular PCR para su correcta aplicación en el diagnóstico clínico.

### **3. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE CASO CLÍNICO**

#### **3.1 Caso Práctico**

El artículo científico se basa en el uso de las pruebas inmunológicas ELISA, HAI e IFI y el ensayo molecular PCR para la determinación de su sensibilidad con el *Tripanosoma cruzi* mediante la amplificación del ADN, en 39 pacientes confirmados con fase aguda y 42 muestras de pacientes en fase crónica, se analizaron también 20 muestras pacientes sanos y 10 de pacientes con otras patologías. Obteniendo como resultados que las pruebas moleculares son más sensibles en la fase aguda y las inmunológicas en la fase crónicas<sup>3</sup>.

#### **3.2 Pregunta a resolver**

¿Describir las pruebas inmunológicas y las técnicas moleculares de este caso explicar por qué la diferencia de resultados en una fase aguda y crónica utilizando técnicas inmunológicas y moleculares?

#### **3.3 Marco Teórico**

##### **3.3.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas es endémica de América latina y fue encontrada por el investigador Dr. Carlos Chagas en 1909, el investigador procedió a realizar el aislamiento del parásito *Trypanosoma cruzi* que se localiza en el interior de *Panstrongylus megistus* (chinchorro) después de esto, infectó a distintos tipos de mamíferos con la finalidad de observar el progreso de la enfermedad<sup>4</sup>.

Actualmente esta enfermedad se encuentra en la mayoría de los continentes a nivel mundial debido a la migración poblacional, se estima que 1 de cada 3 personas contagiadas por este parásito presenta sintomatología y daños severos en su salud, esta patología puede estar presente en el individuo por años sin manifestarse.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y los centros de investigaciones de la enfermedad de Chagas buscan erradicar o controlar el vector por medio de fumigaciones continuas en sectores endémicos, concientizando sobre la enfermedad y cambiando el estilo de vida de la población.

### **3.3.2 Morfología del Vector**

Los estudios realizados han permitido conocer más de 120 especies de hemiptera o triatominos en el mundo, los más comunes son los triatomas, *Panstrongylus* y *Rhodnius* y el de mayor contagio es el *Triatoma Infestans*<sup>5</sup>.

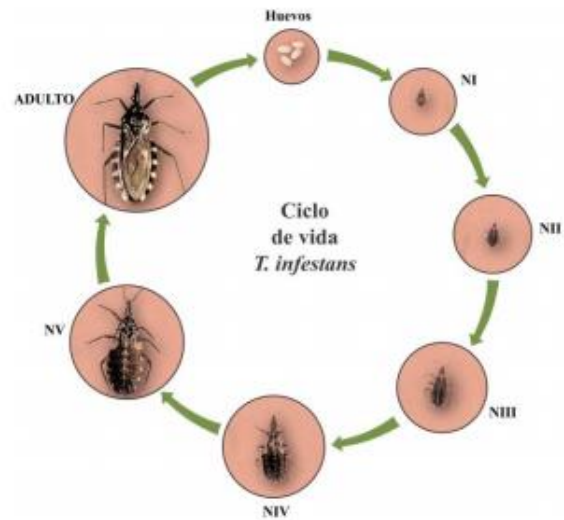
Su hábitat son los climas cálidos/secos, se alojan en adobe, paja, madera, gallineros o granjas, en condiciones de laboratorio viven a temperaturas de 27°C a 24°C con una humedad relativa de 70%, los chinchorros necesitan de estas características climáticas para su desarrollo. Las hembras depositan en la tierra o madera (lugares ocultos) hasta 200 huevos, que son de color blancos, mientras pasan su proceso de incubación va cambiando su coloración a la tonalidad rosa<sup>6</sup>.

Al momento de su nacimiento su tamaño es de 3 milímetros longitud y no contienen alas, mudan hasta 5 veces de piel y este proceso dura alrededor de 7 meses hasta llegar a su etapa adulta, su tiempo de vida es de 5 a 7 meses, se caracterizan por tener sus patas de color amarillo<sup>7</sup>.

El vector vinchucas se alimenta cada 15 días o 1 mes, su alimentación es sanguínea, succionan alrededor de 2.500mg o 600 mg de sangre, la cantidad de sangre depende mucho de la especie del chinchorro.

En las vinchucas se desarrolla el *Trypanosoma cruzi*, el proceso de contagio inicia en la 4ta o 5ta etapa del estadio del insecto, el parásito presenta 3 fases;

- Trypomastigote
- Epimastigote
- Amastigote



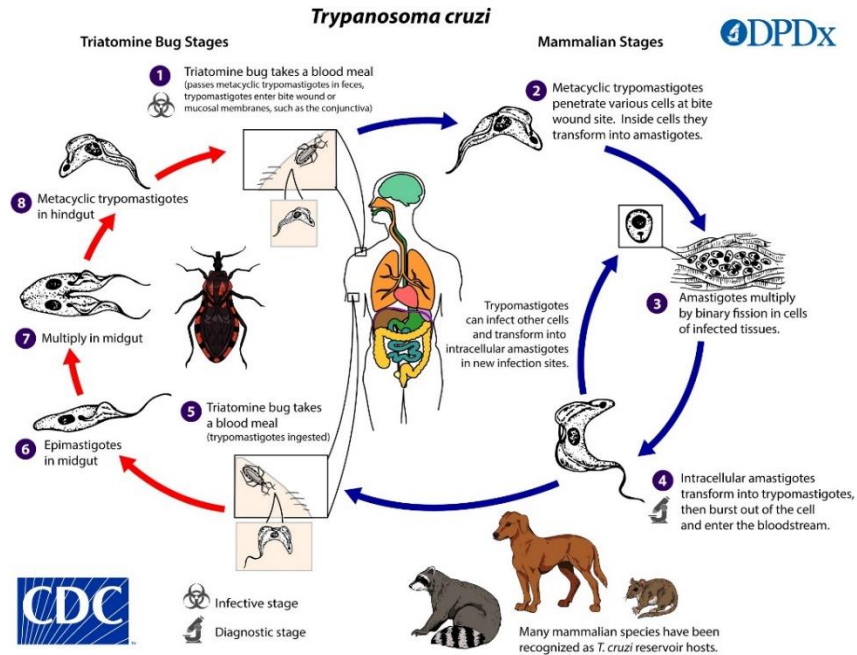
*Ilustración 1 Ciclo de Vida de Vector<sup>8</sup>*

### **3.3.3 Ciclo Biológico de Trypanosoma cruzi**

Las vinchucas al picar al huésped depositan su orina y heces en la superficie de la piel, al frotarse la persona, el protozooario *Trypanosoma cruzi* ingresa al organismo en forma de Amastigote, presenta una forma semiesférica y sus medidas son 2  $\mu\text{m}$  diámetro a 2  $\mu\text{m}$  longitudinales.

tripomastigote tiene forma de "S - C" y sus medidas longitudinales son de 18 a 21  $\mu\text{m}$ , en esta etapa el parásito solo es detectado en sangre y el tiempo de incubación dura alrededor de 7 a 14 días hasta llegar al intestino, se convierte en epimastigote<sup>9</sup>.

El Epimastigote, tiene forma de "huso" y su medida es de 16 a 18  $\mu\text{m}$  en esta etapa el parásito habita en el intestino de la persona infectada donde se reproduce por fisión binaria.



*Ilustración 2 ciclo biológico del T. cruzi<sup>8</sup>*

### 3.3.4 Medios de contagio del trypanosoma cruzi

Las vías de transmisión del trypanosoma cruzi pueden ser:

- **Vía Vectorial:** Cuando la enfermedad es transmitida por un vector y el 80% de casos reportados de la enfermedad de Chagas es por medio de esta vía de transmisión.
- **Vía oral:** Cuando el parásito es transmitido por medio de frutas o alimentos contaminadas de heces y orinas, en Brasil y Colombia esta es la segunda vía de contagio más frecuente en su comunidad.
- **Vía vertical:** Es cuando la madre (contagiada) le transmite la infección al feto en desarrollo.
- **Vía por trasplante de sangre u órganos:** Se produce cuando la persona está infectada y al donar su sangre u órganos, no se realiza los correctos análisis de laboratorios y se produce el contagio<sup>10</sup>.
- **Accidentes de laboratorio:** Cuando el investigador no toma las medidas necesarias con el manejo de las muestras, del parásito o del vector<sup>11</sup>.

### **3.3.5 Sintomatología**

El periodo de incubación de la Enfermedad de Chagas dura alrededor de 1 a 2 semanas después del día de la picadura, generalmente este tiempo el paciente es asintomático, pasado este tiempo se inicia la fase aguda<sup>11</sup>.

### **3.3.6 Fase aguda**

La fase aguda tiene una duración de 6 a 8 semanas, al presentar su sintomatología, por lo general el diagnóstico en esta fase puede ser confundido con una infección o un proceso gripal, puesto que la persona contagiada presenta estados febriles, astenia, adenopatías a nivel cervical, inguinales y axilares, en unos casos los pacientes son asintomáticos y en otros casos presentan lesiones cutáneas en el área afectada por la picadura del vector<sup>11</sup>.

Existen casos de personas que presentan signos de Romaña, puesto que el vector busca zonas de mayor vascularidad del cuerpo para efectuar la picadura. Los signos de Romaña son característicos de la picadura del vector, los médicos realizan los análisis para confirmar o descartar un contagio del parásito.

Durante el progreso de la enfermedad los síntomas tienden a ir desapareciendo luego de las 8 semanas, rara vez se ha reportado muertes en esta fase, los casos de mortalidad reportados se producen en niños menores de 2 años, para el diagnóstico de Chagas se realiza exámenes de laboratorio confirmativos de la patología estos pueden ser por métodos directos; PCR, como también pueden ser métodos indirectos como ELISA, IFI, HAI anticuerpo Igg<sup>9</sup>.

### **3.3.7 Fase crónica**

La fase crónica en la enfermedad de Chagas puede presentar de hasta 50 años después de su fecha de contagio (picadura del vector) todo este tiempo puede durar la enfermedad sin presentar síntoma, durante el transcurso el parásito causa daños en el sistema nervioso craneal, periférico, destrucción de células y aumenta el tamaño de los órganos<sup>12</sup>.

Los órganos más afectados son:



- **Daños cardíacos;** los parásitos invaden el músculo cardíaco, causando arritmias, insuficiencias cardíacas o tromboembólico;
- **Daños digestivos;** síndrome de megacolon, o síndrome de megaesófago.
- **Daños neuronales;** causan daños significativos a nivel neuronal.

### **3.3.8 Técnicas de análisis para determinar la presencia del parásito**

#### **3.3.8.1 Técnicas moleculares**

##### **3.3.8.1.1 PCR Convencional**

La prueba de laboratorio PCR, es una técnica molecular que nos permite la amplificación selectiva de un fragmento del ADN. Al realizar este procedimiento; se usa los denominados cebadores para la creación de la doble región de la cadena, estos cebadores son una pareja de oligonucleótidos que se forman de una manera complementaria en cada extremo del fragmento que deseamos amplificar <sup>13</sup>.

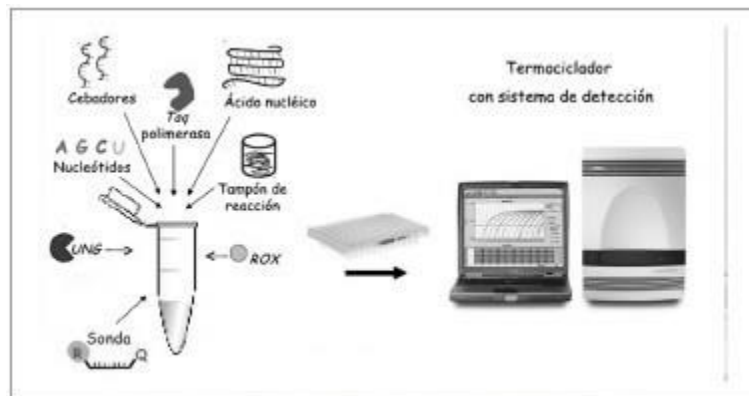
La amplificación de ADN se basa en una repetición de ciclo formado de 3 etapas:

- Desnaturalización del ADN de doble cadena; Durante este proceso la cadena de doble hélice ADN es sometida a altas temperaturas (93-97°C) para que se produzca separación de las hélices.
- La Hibridación de los cebadores se unen de zona 3´ específica de cada una de la hebra, flaquean el segmento que deseamos amplificar este proceso sucede a (50-65°C).
- El tercer proceso para la amplificación del ADN toma el nombre de elongación es la extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa durante este proceso se sintetiza una cadena sencilla la cual inicia en el fragmento 5´a 3´con la ayuda de ADN polimerasa, va incorporando los desoxinucleótidos que se encuentra presente en la cadena molde <sup>14</sup>.

La renaturalización de la cadena se producirá cuando la temperatura disminuya.

La PCR en tiempo real es usada para la amplificación y detección durante el mismo procedimiento, es realizada en el termociclador, este puede detectar las señales de los ciclos duplicados por medio de la fluorescencia usada en el proceso<sup>13</sup>.

En el fragmento que se va a amplificar se ubica cebadores y sonda en dirección 5´ a 3´, esta sonda contiene un fluoróforo en región 5´ el cual es liberado cuando la polimerasa llega a esta porción, esto se da por hidrólisis de la exonucleasa 5´ - 3´, en el extremo 3´ se encuentra el quencher el cual provoca que el fluoróforo este apagado hasta que se realice la liberación<sup>15</sup>.



*Ilustración 3 Amplificación y detección de ADN de T. Cruzi por PCR en tiempo real<sup>16</sup>*

### **3.3.8.2 Técnica inmunológica (Elisa, HAI, IFI)**

#### **3.3.8.2.1 ELISA**

La técnica de ensayo inmunoenzimático nos permite la identificación de antígenos de *Trypanosoma cruzi* mediante el depósito de la sangre en los pocillos de una placa de plástico para luego incubarlos y se aprecia una coloración amarilla cuando el resultado es positivo y se da mediante una reacción enzimática. La lectura de resultados se obtiene mediante un equipo especializado que mide la densidad óptica<sup>17</sup>.

La sensibilidad y especificidad depende de la composición antigénica y la fuente del antígeno. La composición antigénica puede ser desde antígenos totales (ELISA convencional), o antígenos recombinantes. Se recomienda una prueba con sensibilidad y especificidad  $\geq 95\%$  para tamizaje y para diagnóstico se recomienda el par serológico con una prueba altamente sensible y otra altamente específica aplicadas simultáneamente.

### **3.3.8.2.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Esta prueba permite detectar la reacción que provocan los anticuerpos y antígenos de superficie del *T. cruzi*, mediante la coloración resultante a través de una sustancia fluorescente y para la observación de los resultados se requiere de un microscopio de luz ultravioleta<sup>18</sup>.

### **3.3.8.2.3 Hemoaglutinación Indirecta (HAI)**

Esta prueba se basa en la aglutinación de glóbulos sensibilizados con antígenos de *T. cruzi*. Aunque presenta baja especificidad por ello es mejor como prueba de tamizaje en zonas de alta prevalencia y como prueba confirmatoria se debe añadir un análisis altamente específico para el diagnóstico<sup>18</sup>.

## **3.3.9 Equipos**

### **3.3.9.1 Termociclador**

Los termocicladores son equipos especializados para la realización de pruebas de PCR, su programación nos facilita el cambio de temperatura de los ciclos durante la amplificación del segmento de ADN que se desee estudiar<sup>19</sup>.

### **3.3.9.2 Microscopio de Luz Ultravioleta**

El microscopio de luz ultravioleta es usado para determinar proteínas presentes en determinados aminoácidos a estudiar, la luz ultravioleta puede dañar la retina ocular.

## **3.4 Materiales y Métodos**

### **3.4.1 Materiales de estudio**

- Revisión bibliográfica primaria y secundaria.
- Instructivo de uso para técnicas de laboratorios.

### **3.4.2 Métodos cualitativos y cuantitativos**

- Método cuantitativo: PCR
- Método cualitativo: ELISA, IFI, HAI

## **3.5 Metodología**

En el caso práctico analizado se llevó a cabo la investigación de 111 muestras para la determinación de la sensibilidad y especificidad que tienen las técnicas inmunológicas y moleculares ante el parásito *trypanosoma cruzi*, estas muestras

fueron extraídas de 39 pacientes con la enfermedad de Chagas en fase aguda, 42 en fase crónica, 20 pacientes sanos y 10 con otras patologías.

- Obtención de muestra; se evaluó 39 muestras de sangre y suero de pacientes confirmados con la enfermedad en la fase aguda, 42 en la fase crónica, 20 personas sanas y 10 pacientes con enfermedades relacionadas.
- Cultivo del parásito; se empleó el medio LIT con suero fetal bovino para el cultivo del parásito.
- Preparación del antígeno Maeckelt esto se llevó a cabo a partir de la centrifugación y congelación del cultivo previamente realizado, a este antígeno se lo sometió a deslipidación con benceno y se almacenó hasta su uso.

### **Hemaglutinación (HAI)**

- Esta técnica se llevó a cabo mediante el tratamiento de eritrocito de carnero más ácido tánico sensibilizándolo con el antígeno de Maeckelt, este proceso se ejecutó en placas con suero de paciente del cual fue previamente diluido, buffer fosfato salino, incubado de 2 a 3 horas a temperatura ambiente dando como resultados la aglutinación.

### **Hemoaglutinación indirecta (IFI)**

- Se realizó la observación mediante el microscopio de fluorescencia de los epimastigote que fueron previamente fijados a la placa e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente además de lavado PBS- Tween 20 y relacionados con la Anti Igg humana más fluoresceína presidida de una segunda incubación de 1 hora a 37°C en cámara de humedad.

### **Inmunoensayo enzimático**

- se realizó la sensibilización de las placas luego agregar 100ul de suero diluido durante 1h a 37°C, posteriormente adicionaron 100ul de conjugado humano Anti Igg, lo incubaron que se realizó después del lavado de las

placas para ello se empleó 100ul de sustrato ácido 2-2'azo bis 3-etil-benzotioasico (ABTS) por 20min con una densidad de 405nanometros.

### **Extracción del ADN**

Para la extracción del ADN se llevó a cabo la mezcla de 200ul de sangre y agua destilada en un microtubo el cual se incubó por 30 min posteriormente se centrifugó la muestra para dejar 50ul y se añade 20ul de resina Chelex 100 al 5% y se incubó por segunda vez a 56°C por media hora más, se agitó por 10 segundos para una tercera incubación a 100°C por 10 min y se recolectó el sobrenadante.

### **Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de ADN de minicirculo de kinetoplasto de T. cruzi**

- Para este proceso se empleó el protocolo de wincker et. Al cual fue modificado según las condiciones que presenta el laboratorio y se procedió a la detección del ADN de cinetoplasto del parásito mediante la amplificación de 330 pares de base que conformaba una banda, se utilizaron el cebador; 122 5'GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3' y cebador 121 5' AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA3'
- Para la reducción de la reacción en cadena de la polimerasa se empleó una mezcla de 200ul de desoxinucleotidos de tri-fosfato 2Mm de MgCl<sub>2</sub> 0,5 uM de cebadores y 1u Taq polimerasa.

### **Técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de ADN satélite.**

- Para la detección del ADN satélite se emplea el protocolo de Moser el cual solo permite 188 pares de bases de ADN para la amplificación de cebador TCZ1 5'CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y del cebador TCZ2 5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' más desoxinucleotidos tri-fosfato de 2mM de MgCl<sub>2</sub> y la Taq polimerasa se programa el termociclador para 30 ciclos.

#### **4. RESULTADOS**

Los resultados que obtuvieron en la investigación mediante el cálculo del valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo fue que las técnicas moleculares son mayores en la fase aguda y las inmunológicas en la crónica, seguidamente pudieron medir la reproducibilidad por medio del índice Kappa arrojando un valor de 0,66 en la fase aguda con las dos técnicas a diferencia de las fase crónica que solo dio un 0,40, además de estos valores también pudieron conocer la especificidad en cada proceso siendo de un 100% con la técnica molecular ya que la técnica inmunológica encontró otras enfermedades fuera de Chagas, en lo que refiere a sensibilidad obtuvieron que varía dependiendo de la fase, es decir que la técnica molecular presento mayor sensibilidad con la enfermedad en la fase aguda y las inmunológicas en la fase crónica.

Cabe resaltar que las técnicas IFI y ELISA arrojaron gran cantidad de positivos que se encontraban tanto en la fase aguda como en la crónica, pero no tenían especificidad porque también reconocieron dos falsos positivos.

#### **5. DISCUSIÓN**

Para la especificidad de la técnica PCR en el diagnóstico de tripanosoma cruzi el investigador Sánchez determina que existe gran relevancia de su aplicación al alto porcentaje que refleja en los resultados en la fase aguda<sup>13</sup> Corroborando esto el Lic. Tapia agrega que las técnicas PCR son más sensible en la fase aguda <sup>21</sup>. Por otro lado la investigadora Lourdes Cañadas menciona que las pruebas inmunológicas presentan mayor sensibilidad en la fase crónica <sup>20</sup>, además la doctora Villalva y su grupo de investigación señala que para la reproducibilidad se obtienen mejores resultados en la fase aguda indistintamente de la técnica que se aplique<sup>22</sup>.

#### **6. CONCLUSIÓN**

Se concluye que para el diagnóstico en la fase aguda la técnica PCR es más sensible ya que el parásito se presenta aún a nivel sanguíneo, pero para evidenciar la enfermedad en la fase crónica es adecuado emplear las técnicas inmunitarias debido a que el parásito ha avanzado a los órganos.

Aunque cabe recalcar que en el diagnóstico correcto de la enfermedad se realiza tanto la prueba cualitativa como la cuantitativa.

## **7. RECOMENDACIONES**

Se debe tener en cuenta que las técnicas inmunológicas pueden presentar reacción cruzada con otros organismos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Murillo Godinez G. Chagas disease ( American trypanosomiasis ). Enfermedad de Chagas ( tripanosomiasis americana ). *Med Interna Mex.* 2018;34(6):959-970. <http://www.scielo.org.mx/pdf/mim/v34n6/0186-4866-mim-34-06-959.pdf>
2. Rauda-esquivel L, López-arroyo JL, Castillo-gamboa DA, et al. Enfermedad de Chagas en Ciudad Juárez , México , migración y pobreza . Investigación preliminar 2019 migration and poverty . Preliminary research. 2020;36(5):641-651. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2020/mim205f.pdf>
3. S0213005X12002820 @ [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X12002820>
4. Rojo-medina J, Ruiz-matus C, Salazar-schettino PM. Enfermedad de Chagas en México. Published online 2018:605-612. doi:10.24875/GMM.18004515
5. Campos AA, Rubio Ortiz M, Itandehui T, et al. Enfermedad de Chagas: Vectores. *Ciencia*. Published online 2017:30-33. [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68\\_1/PDF/Enfermedad\\_de\\_Chagas\\_vectores.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/Enfermedad_de_Chagas_vectores.pdf)
6. Anahí N. Tesis Doctoral Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas : transmisión vertical y cardiopatía chagásica crónica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Factores genéticos del hospedero asociados a la enfermedad de Chagas: tran. Published online 2017. [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n6171\\_Juiz.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6171_Juiz.pdf)
7. Hodo CL, Hamer SA. Toward an ecological framework for assessing reservoirs of vector-borne pathogens: Wildlife reservoirs of trypanosoma cruzi across the southern United States. *ILAR J.* 2017;58(3):379-392. doi:10.1093/ilar/ilx020
8. Moriconi DE, Dulbecco AB, Juárez MP, Calderón-Fernández GM. A fatty acid synthase gene (FASN3) from the integument tissue of *Rhodnius prolixus* contributes to cuticle water loss regulation. *Insect Mol Biol.* 2019;28(6):850-861. doi:10.1111/imb.12600
9. Ferrer E. Técnicas Moleculares Para El Diagnóstico De La Enfermedad De Chagas. *Saber, Univ Oriente, Venez.* 2015;27(3):359-371. <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427743080002.pdf>
10. Audoux D. Indre. *ADLFI Archéologie la Fr - Informations*. Published online 2015. doi:10.4000/adlfi.14067
11. Sánchez E, Vélez MC, Restrepo M, Marin JS, Gallego D. Tripanosomiasis americana, una mirada desde eltratamiento TT - American trypanosomiasis, a new look at its treatment. *An Fac Med.* 2016;77(1):39-44. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/115>



51/10453

12. Salgado U, Raquel A, Raquel A, Salgado U. Miocardiopatía aguda por Chagas: Reporte de Caso y Revisión de la Literatura Acute Chagas Cardiomyopathy : Case Report and Literature Review. Published online 2017. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/153/153814005/153814005.pdf>
13. Sánchez Huerta JL, Parra Ortega I, Hernández Sánchez C, et al. Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab.* 2018;65(3):167-174. [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
14. Cura CI, Ramírez JC, Rodríguez M, et al. Comparative Study and Analytical Verification of PCR Methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *J Mol Diagnostics.* 2017;19(5):673-681. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.05.010
15. Karina A, Vannucci I. *Caracterización Molecular y Funcional de Las Prohibitinas 1 y 2 de Trypanosoma Cruzi Caracterización Molecular y Funcional de Las Prohibitinas 1 y 2 De.;* 2019. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/55926/56875.pdf?isAllowed=y&sequence=4>
16. Desarrollo de ADN, Test T.cruzi @ [notiwiener.net](http://notiwiener.net). <https://notiwiener.net/2017/12/desarrollo-del-t-cruzi-dna-test/>
17. T F, Iga L. ENZIMOINMUNOENSAYO ( ELISA ) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IgA EN SALIVA. [https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/64299/1/ELISA para la cuantificación de IgA en saliva.pdf](https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/64299/1/ELISA_para_la_cuantificacion_de_IgA_en_saliva.pdf)
18. Chagas D. de Chagas. 2015;11(3):141-145.
19. Bahena-García E, García-Cordero JL. Termociclador de Bajo Costo para Amplificar DNA Mediante Técnica de PCR en Microdispositivos. *Memorias del Congr Nac Ing Biomédica.* 2017;1(1):152-155. <http://memorias.somib.org.mx/index.php/memorias/article/view/196>
20. Cañadas L. Resultados y escalas. 2017;31(4):2512. [https://eprints.ucm.es/51329/7/LOURDES CAÑADAS FERNANDEZ %281%29.pdf](https://eprints.ucm.es/51329/7/LOURDES_CANADAS_FERNANDEZ%281%29.pdf)
21. Memoriam I. VII FORO DEL INSTITUTO DE CIENCIAS 2019. Published online 2019. [https://icuap.buap.mx/sites/default/files/documentos/Memorias VII Foro ICUAP 2019 Final 11 febrero 2020.pdf#page=56](https://icuap.buap.mx/sites/default/files/documentos/Memorias_VII_Foro_ICUAP_2019_Final_11_febrero_2020.pdf#page=56)
22. Fundaci E. LASIRC. 2020;1(4). <http://fundacionlasirc.org/images/Revista/REVISTALASIRCvolumen1.No.4.pdf#page=21>

