



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

TÍTULO:

IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN LOS HABITANTES DEL
SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO.

Tesis previa a la obtención del título de
Licenciada en Laboratorio Clínico.

AUTORA:

Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

DIRECTORA:

Dra. Livia Pineda

LOJA-ECUADOR

2012-2013

CERTIFICACIÓN

Dra. Livia Pineda

Docente de la Carrera de Medicina de la Universidad Nacional de Loja.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo investigativo titulado: "IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO" elaborado por la postulante Lilia Elizabeth Jiménez Loyola, ha sido realizado bajo mi dirección, por lo que se aprueba la misma, pudiendo ser sometido a presentación pública y evaluación por parte del jurado calificador que se designe.



Dra. Livia Pineda
Directora de Tesis

AUTORÍA

Yo, Lilia Elizabeth Jiménez Loyola declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la UNL la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional Biblioteca-Virtual.

Autora: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Firma:



Cédula: 1104959000

Fecha: Loja, 7 de Octubre del 2013

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Lilia Elizabeth Jiménez Loyola, declaro ser autora de la tesis titulada "IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO", como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del Exterior, con las cuales tengan convenio la Universidad.

La Universidad no se responsabiliza por el plagio copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización en la ciudad de Loja, al 7 del mes de Octubre del dos mil trece, firma el autor.

Firma: _____



Autora: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Cédula: 1104959000

Correo Electrónico: lilia_pirita@hotmail.com

Dirección: Marcabeli El Oro-Ecuador

Teléfono: 2956-411

Celular: 0991768487

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a dios todo poderoso quien ha guiado mi camino en todo momento, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad en cada instante de mi vida y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi madre querida ya que más que madre ha sido mi amiga incondicional en cada momento de tristezas y alegrías, por los valores que me ha inculcado, por su amor, comprensión, apoyo, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, ya que gracias a sus consejos, sabiduría, conocimientos he logrado realizar este hermoso sueño, gracias a ella por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mi familia en general padres, tías, tíos, abuelitos, hermanos, primos, primas y amigos por ser lo más preciado y valioso, por estar siempre presentes apoyándome a cada instante, por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más los he necesitado y porque gracias a ellos soy lo que soy.

Lilia Jiménez Loyola

AGRADECIMIENTO

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

A la Universidad Nacional de Loja por darme la oportunidad de prepararme en mis estudios y ser una profesional.

A mi directora de tesis, Dra. Livia Pineda por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

Agradezco a mis docentes durante toda mi carrera profesional debido a que todos han aportado con un granito de arena a mi formación académica.

Quiero expresar mi agradecimiento al Laboratorio NOVA LAB en especial a la Lcda. Magali Carrión ya que gracias a su ayuda pude realizar mi trabajo de campo con éxito.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

Lilia Jiménez Loyola

1. TÍTULO

IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN
LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL
CANTÓN PORTOVELO.

2. RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una afección potencialmente mortal y constituye un importante problema de salud pública en el continente americano sobre todo en los países de Latinoamérica donde es endémica, es transmitida a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas o chinchorro. El Sector Lourdes perteneciente al Cantón Portovelo es considerado una zona endémica en el cual se ha evidenciado la presencia del vector triatoma “chinchorro” en la mayoría de las viviendas, debido a que están construidas de caña, madera y teja. Este parásito afecta tanto a niños, jóvenes y adultos que han tenido contacto frecuente con tierra, pajas, arbustos, animales domésticos sobre todo silvestres, es por ello que se realizó el presente estudio de investigación de tipo descriptivo-transversal, con el objetivo de identificar el *Trypanosoma cruzi* y determinar la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*; en una muestra de 102 habitantes que cumplieron con los criterios de inclusión, se utilizó el método directo gota gruesa y la técnica de ELISA, llegando a las conclusiones: de que el 100% de los habitantes no presenta el parásito mediante el examen de gota gruesa y una seropositividad IgG o IgM de 6 casos mediante la prueba de ELISA que representan el 6%.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Gota Gruesa, ELISA.

SUMMARY

The American tripanosomiasis or illness of Chagas is potentially an affection human and it constitutes an important problem of public health mainly in the American continent in the countries of Latin America where it is endemic, it is transmitted to the human beings mainly by the feces of insects well-known triatomíneos as vinchucas or chinchorro. The Sector Lourdes belonging to the Canton Portovelo an endemic area is considered in which the presence of the vectorial triatoma "chinchorro" has been evidenced in most of the housings, because they are built of cane, wood and tile. This parasite affects children, youths and adults that have had frequent contact with earth, so much straws, bushes, domestic animals mainly wild, it is hence that he was carried out the present study of investigation of descriptive-traverse type, with the objective of to identify *Trypanosoma cruzi* and to determine the presence of antibodies against *Trypanosoma cruzi*; in a sample of 102 inhabitants that you/they fulfilled the inclusion approaches, it was used the method thick direct drop and ELISA'S technique, reaching the conclusions: that 100% of the inhabitants doesn't present the parasite by means of the exam of thick drop and a seropositivity IgG or IgM of 6 cases by means of ELISA'S test that you/they represent 6%.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Thick Drop, ELISA.

3. INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por el *Trypanosoma cruzi*, transmitida al ser humano a través de insectos hematófagos triatomíneos (vinchuca, chinche). Es endémica en muchas áreas rurales de América Central y del Sur, y en México. En los Estados Unidos están afectados hasta 100.000 inmigrantes latinoamericanos (1). Es altamente prevalente en muchos países del mundo. Tradicionalmente confinada a Latino América, la enfermedad de Chagas actualmente se encuentra en expansión como consecuencia de los procesos migratorios y globalización de la población mundial (2). Pero en las últimas décadas se ha observado una mayor frecuencia de casos en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (3).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que a nivel mundial existen unos 8 y 10 millones de personas infectadas, más de 100 millones de personas están en riesgo de adquirir o contraer la enfermedad y alrededor de 15.000 mueren anualmente por esta causa (3).

En América Latina la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad afecta entre 16 a 18 millones de personas, (puesto que es considerada como la sexta causa de muerte en la población adulta), 35 millones de personas se encuentran infectadas, alrededor de 100 millones (25% de la población de Latinoamérica), se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (dicho riesgo está en relación directa con la pobreza), matando anualmente acerca de 20 mil personas. Se considera endémica en ciertas áreas rurales de los países en donde existe la enfermedad principalmente Brasil, Colombia Venezuela, Chile, Argentina, Uruguay, Bolivia y Perú. (3).

En Ecuador las estimaciones oficiales de prevalencia representan que alrededor del 25% de la población (2.4 a 3 millones de personas) está expuesta a la transmisión del *T. cruzi*, las áreas endémicas están en las regiones de la Costa y

Amazonía, en la provincia de Loja y en las zonas subtropicales de las provincias de la Sierra (4).

En la Provincia de El Oro según el Ministerio de Salud Pública se realizaron estudios en 8 cantones (Santa Rosa, Piñas, Marcabelí, Portovelo, Zaruma, Arenillas, Balsas, Atahualpa, Pasaje, Las Lajas), de los cuales Piñas y Zaruma mostraron de 3 a 4 casos seropositivos respectivamente.

Considerando que el cantón Portovelo, es una zona endémica y que posee mayor número de casos positivos (6 casos) en relación a los cantones ya mencionados anteriormente, existe un alto riesgo de adquirir el parásito; además que se ha observado la presencia del vector triatoma “chinchorro” en gran número dentro de las viviendas y de sus alrededores.

En el sector Lourdes perteneciente al cantón Portovelo, hay mayor probabilidad de contaminación ya que no cuenta con los servicios básicos adecuados por lo que se estima que la población infantil es la que se encuentra más propensa a adquirir la infección debido a que tienen contacto directo con tierra, arbustos, paja; además la mayoría de sus viviendas se encuentran construidas a base de caña, madera, teja, adobe lo que hace que el vector se reproduzca más rápidamente y por ende hay más riesgo de contagio. Por tal razón se realizó la presente investigación titulada: **IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO**, cuyos objetivos fueron, identificar el *Trypanosoma cruzi* mediante la aplicación del método directo gota gruesa, determinar la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de ELISA y entrega de resultados obtenidos de la investigación al personal médico de la zona VIII de Malaria y pacientes que fueron parte del estudio para su posterior tratamiento.

En el presente estudio se obtuvo los siguientes resultados: de las 102 muestras mediante el método de gota gruesa no se observó al parásito, sin embargo mediante la técnica de ELISA se determinó la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en 6 casos que fueron positivos y representan el 6%, lo que

permite demostrar que al haber encontrado casos positivos se convierte en una zona endémica para la Enfermedad de Chagas.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

TRYPANOSOMA CRUZI

Es un protozoo flagelado (trypomastigote) que se encuentra en la sangre circulante de los pacientes y de los reservorios y se transforma en las fibras musculares en parasito intracelular sin flagelos (amastigotes). (5).

Taxonomía:

El *Trypanosoma cruzi* pertenece al: Reino: Protista; Filo: Sarcomastigophora Subfilo: Mastigophorea; Clase: Zoomastigophorea; Orden: Kinetoplastida (que se caracteriza por poseer un organelo en la mitocondria de la célula que se conoce como quinetoplasto), Familia: Trypanosomatida; Subgénero: Schizotrypanum (para designar a los tripanosomas que se multiplican intracelularmente en los vertebrados). El nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. (5, 6).

Morfología:

El *Trypanosoma cruzi* tiene aproximadamente 20 μm de largo, un núcleo central, un cinetoplasto subterminal largo (el cuerpo parece que se abultara a su alrededor) en el extremo posterior aguzado y un flagelo que se dirige hacia delante para abandonar el cuerpo por el extremo anterior. El flagelo libre mide 2-11 μm y la membrana ondulante no es tan prominente como en los tripanosomas africanos. (7, 8).

Durante su desarrollo el parasito presenta distintas formas evolutivas; trypomastigote, amastigote, epimastigote.

- **Trypomastigote:** Es una célula alargada, fusiforme y su tamaño es de alrededor de 20 μm de longitud. Posee un núcleo grande cerca de la parte central y a lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo que se inicia en el cinetoplasto y sale del parasito por el

extremo anterior. El cinetoplasto es una red fibrosa, que contiene el 20% del ADN total del parásito presente en su mitocondria y que está localizada en la región subterminal de la parte posterior del protozoo, formada por la unión del cuerpo parabasal y el blefaroplasto; el primero es el más grande y el segundo es puntiforme. (5, 9).

El tamaño notoriamente grande del cinetoplasto constituye una de las principales características morfológicas que lo diferencia de otras especies de Tripanosomas. Generalmente adopta la forma de C o S esta forma es muy móvil y en preparaciones en fresco de sangre, el desplazamiento del parásito se detecta por el movimiento de los glóbulos rojos. Los parásitos presentan marcado pleomorfismo y se conocen formas anchas (que infecta al vector), formas delgadas (establece la infección intracelular en el mamífero) e intermedias. La forma Trypomastigote no se divide. El parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces del vector es llamado en esta etapa trypomastigote metacíclico. (5, 9).

- **Amastigote:** Es esférico, redondeado u ovalado de 2-4 μm de diámetro, no posee flagelo, presenta núcleo y kinetoplasto del cual se forma el flagelo que está secuestrado en una bolsa, es intracelular y se reproduce por división binaria, estos amastigotes se aglomeran dentro de las células formando nidos. Constituye la forma de división intracelular en los tejidos del huésped mamífero, formando los llamados pseudoquistes. Las formas tisulares de estos amastigotes surgen con mayor frecuencia en el miocardio, el hígado y el cerebro. Se multiplican hasta integrar una colonia intracelular después de invadir la célula del hospedador o por fagocitosis del parásito. (4, 5, 10, 11, 12).
- **Epimastigote:** Tiene aspecto fusiforme, con cinetoplasto y flagelo anteriores al núcleo, son alargados de aproximadamente 20 y 25 μm de longitud, siendo la forma de división encontrada en el tracto digestivo del

vector así como en medios de cultivos artificiales. El epimastigote es la forma del parásito que se multiplica asexualmente en el intestino del vector, donde se produce por división binaria y también es la forma predominante en el cultivo del parásito, así mismo las formas epimastigotes de *T. cruzi* son susceptibles a la activación de la vía alterna del complemento. (5, 6, 13).

Ciclo vital:

El ciclo vital incluye animales y seres humanos como huéspedes definitivos, en los cuales los tripanosomas maduros circulan y se dividen en la sangre periférica y por último invaden el sistema nervioso central. (14).

El vector del *T. cruzi* es un insecto hematófago, de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y género Triatoma, conocidos como chinches o vinchucas. Los insectos se infectan al chupar la sangre del hombre o mamíferos con trypomastigotes sanguíneos circulantes. Estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector, se transforman y se multiplican como formas similares a promastigotos y epimastigotos en el intestino medio del insecto. Los epimastigotos aumentan de tamaño una vez que entran en el recto del a vinchuca y se transforman en trypomastigotos metacíclicos infectantes. Al cabo de 6-15 días de la ingestión de sangre infectada, la vinchuca transmite la infección. (7).

Los triatomineos infectados, al picar al hombre o a los animales y después de una ingestión abundante de sangre, defecan fácilmente sobre la superficie. Cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel, contamina el sitio de la picadura y los parásitos penetran al tejido. Cuando los trypomastigotes metacíclicos infectantes entran en el organismo, son fagocitados por los macrófagos de la región y englobados en el fagosoma, de donde se escapan y se dirigen al citoplasma, allí se transforman en amastigotes y se multiplican activamente por división binaria.

Más tarde se diferencian de nuevo en trypomastigotes, que rompen las células y llegan a la circulación sanguínea y linfática, para luego invadir diversos órganos (corazón y plexos nerviosos), en cuyas células penetran, y se transforman de nuevo

en amastigotes. Esta etapa coincide con la fase aguda de la enfermedad que se caracteriza por una elevada parasitemia. (5).

Mecanismo de transmisión:

T. cruzi se puede transmitir en orden de importancia por:

- 1. Contaminación (vectorial).**- La infección ocurre cuando un triatmino infectado se alimenta de la sangre de una persona sana, el insecto defeca generalmente cerca del lugar de la picadura dejando en sus heces el trypomastigote de *T. cruzi*, forma infectante, la hipersensibilidad producida por la picadura hace que la persona ocasione heridas, de esa forma el parásito ingresa por la piel y las conjuntivas (80-90%). La mayoría de las infecciones en el hombre se producen en zonas rurales (5, 15).
- 2. Transfuncional.**- Por transfusión de sangre y hemoderivados contaminados con el parásito. Es una vía de transmisión importante en las zonas urbanas, cuando la sangre no es controlada o tamizada contra *T. cruzi*. (5-20%). (15).
- 3. Transplacentaria congénita.**- Cuando hay pasaje del parásito a través de la placenta de la madre infectada al hijo durante el embarazo (Chagas congénito) (0.5-8%). (15).
- 4. Oral.**- Se ha demostrado la transmisión oral de Enfermedad de Chagas tras la ingestión o por consumo de alimentos contaminados (carne, jugo de caña de azúcar, palmas y frutas) con el parásito o triatominos infectados. (15, 16).
- 5. Accidental.**- El personal que trabaja en el laboratorio con parásitos vivos existe potencialmente la posibilidad de inoculación accidental. La

transmisión se da por los accidentes de laboratorio y por trasplante de órganos. (15, 16).

FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN

Para la adecuada transmisión de *T. cruzi* se requiere que existan reservorios del parásito en cercanía de los vectores y la presencia del ser humano. Los factores que influyen en la transmisión se dividen en tres grupos: biológicos, ambientales y sociales.

Factores biológicos.- La tripanosomiasis americana se encuentra muy difundida entre los animales silvestres y domésticos de las zonas tropicales y subtropicales del continente americano la transmisión depende:

- **Reservorios.-** El parásito *T. cruzi* ha sido hallado en 150 especies de reservorios tanto silvestres como domésticos. Es por lo tanto ilusorio tratar de erradicar el parásito a partir de un reservorio animal, aunque sea doméstico. Los animales con el parásito en la sangre son fuente de infección para los vectores y estos ponen en riesgo al ser humano. Entre los principales animales silvestres que actúan como reservorios están los armadillos y las zarigüeyas.
- **Parásitos.-** En la especie *T. cruzi* existen cepas con diferente virulencia o infectividad. También influye el estadio del parásito de la ingestión por el triatmino.
- **Vectores.-** El mayor riesgo de infección es intradomiciliario en donde se han asentado los triatminos hematófagos infectados. La transmisión está relacionada con los hábitos de alimentación de los vectores, su grado de antropofilia, la adaptación del insecto a las viviendas del ser humano. Está compuesto de tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. Exteriormente

podemos observar que la cabeza posee órganos sensoriales, en el tórax están insertados los órganos locomotores y en el abdomen, el aparato reproductor y aberturas respiratorias. La cabeza es alargada, fusiforme, posee un par de ojos, los ocelos y un par de antenas, órganos receptores sensaciones. En la cara ventral del tórax se insertan las patas que son delgadas y largas. (5).

Factores ambientales.- La altitud de las regiones geográficas está relacionada con las condiciones para el establecimiento y reproducción de los vectores. Se han recolectado triatomínicos a una altura de 2.000 metros sobre el nivel del mar.

Factores sociales.- El tipo de construcción de las viviendas es factor primordial para el establecimiento de los triatomínicos, sobre todo las habitaciones destinadas a dormitorio construidas inadecuadamente con palos, barro, paredes sin revocar y techos de paja, que son excelentes sitios para la colonización de los insectos. Los vectores extradomiciliarios habitan en cuevas, plantas, en donde tienen acceso a los reservorios. (5).

EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas ha sido, históricamente, una enfermedad propia de gente pobre de las áreas rurales de América Latina, donde el ser humano entro en contacto con los focos naturales, al trabajar la tierra en las áreas enzoonóticas en las que son abundantes las especies del vector adaptables a las viviendas del ser humano. Así se forzó a los triatomínicos infectados a ocupar viviendas humanas, donde estos encontraron un refugio y suficiente alimento en la sangre humana y en la de los animales domésticos. De esta manera puramente accidental, el hombre pasó a formar parte de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas. El aislamiento geográfico de estas zonas, el escaso desarrollo rural. La falta de integración, el hábitat propicio para el triatomino, la carencia de trabajo, recursos, los obstáculos para acceder a la información y a los adecuados procesos educativos consolidan un escenario difícil de abordar. Aun así y debido a

los altos índices de morbilidad descritos por esta enfermedad, comenzaron a llevarse a cabo distintas iniciativas en el control vectorial en varios países endémicos (16).

Se estima un total entre 16 y 18 millones de personas infectadas en 18 países de Latinoamérica. Se pueden evidenciar importantes diferencias entre estos países latinoamericanos, por ejemplo, en Bolivia aproximadamente el 20% de la población está infectada, esto es cerca de 1.2 millones de personas; en Brasil, el porcentaje de la población infectada es del 1.3% de la población total del país, lo que significa aproximadamente 5 millones de personas. Argentina, Honduras, Paraguay y El Salvador presentan un porcentaje entre el 5% y el 10% de la población infectada con la enfermedad, mientras que el porcentaje en Chile, Colombia, Ecuador y Venezuela está entre el 1% y el 5%. Otros países como México y Nicaragua presentan un porcentaje de infección menor al 1%.

En Estados Unidos, la infección se encuentra más frecuentemente asociada a inmigrantes de México, Centro América y Sur América. Se estima que existen entre 100 mil y 675 mil inmigrantes latinoamericanos infectados con el mal de Chagas en Estados Unidos.

Las muertes por causa de la enfermedad de Chagas, se calculan entre 45 mil y 50 mil cada año. La mortalidad se debe principalmente a la miocardiopatía chagásica crónica. La muerte repentina usualmente se debe a una fibrilación ventricular, y es la principal causa de muerte en el 60% de los casos. En Ecuador se estima que existe entre 120000 a 150000 personas seropositivas y que el costo al país por causa de la enfermedad de Chagas es de 20 millones de dólares por año. (4).

RESPUESTA HUMORAL

La respuesta inmune inducida por la infección por *T. cruzi* se caracteriza en su etapa inicial por una respuesta innata basada en la activación de *células natural killer* (NK) y *natural killer T* (NKT), así como la activación de células dendríticas,

neutrófilos y macrófagos. A esta respuesta la sigue la activación de linfocitos T CD4+, los cuales tienen un papel crucial en el control de replicación del parásito promoviendo la activación y proliferación de linfocitos TCD8+ y linfocitos B. Esta compleja respuesta se desarrolla en distintos compartimentos del sistema inmune, y se caracteriza principalmente por la expansión o proliferación celular, producción de citosinas e inducción de mecanismos de muerte celular. Como consecuencia de la respuesta desencadenada, el parásito pasa a ser combatido continuamente y su multiplicación en los tejidos del hospedador vertebrado es reducida. Sin embargo, el parásito es capaz de persistir indefinidamente en el hospedador, dado que puede contrarrestar las presiones selectivas generadas por los efectores celulares y humorales producto de la respuesta inmune desencadenada. Dado que los amastigotes de *T. cruzi* se replican intracelularmente, la inmunidad celular y en particular, la mediada por los linfocitos TCD8+ son un componente indispensable en la respuesta inmune frente al parásito (17).

La respuesta elevada de inmunoglobulinas aparece el día 14 pos infección, incrementándose hasta el día 28 y persistiendo durante la fase crónica (a partir de 60 días), predominando sobre todo el isotipo IgG2a (incrementándose hasta 10 veces su nivel), e incrementándose las IgM, IgG1, IgG3 e IgG2b. La respuesta más específica frente a *T. cruzi* sucede aproximadamente 2 semanas pos infección cuando la parasitemia aparece como más elevada, siendo máxima después de 4 semanas de infección y manteniéndose durante un largo tiempo durante prácticamente toda la fase crónica.

La infección por *T. cruzi* induce una marcada pérdida de células B inmaduras en la médula ósea (MO), comprometiendo a las células recientemente emigradas en la periferia. Esta pérdida se asocia, a un aumento de la apoptosis de las células B en un mecanismo dependiente del aumento de expresión del ligando Fas/FasL el cual promueve la apoptosis de la célula en que se activa, sobre todo en células B IgG+ específicas para el parásito, no sufriendo éste proceso las células auto reactivas (2).

PATOLOGÍA Y PATOGENIA

Después de la entrada de los parásitos, se localizan en piel y luego circulan en la sangre. Los macrófagos los fagocitan y en su interior se transforman en amastigotes. También se localizan intracelularmente dentro de las fibras musculares, incluyendo el miocardio, en donde forman pseudoquistes. Los parásitos alteran las fibras musculares y comprometen la conducción nerviosa del corazón. Los daños en las vísceras huecas, como esófago y colon, llevan a dilataciones e hipertrofia de estos órganos. (5, 6).

Enfermedad de Chagas:

Denominada también tripanosomiasis americana. Es una enfermedad producida por *Trypanosoma cruzi*, transmitido al hombre y a otros mamíferos por insectos hematófagos (triatominos) que pertenecen a la subfamilia Triatominae. Puede causar síntomas o bien producir un cuadro agudo o crónico. Uno de los primeros síntomas es el desarrollo de un área eritematosa e indurada en el sitio de la picadura por la chinche, llamada chagoma. Muchas veces aparecen después edema y exantema alrededor de los ojos y en el resto de la cara. La enfermedad es más grave en niños menores de 5 años, en los que se presentan con frecuencia como un proceso agudo que afecta al Sistema Nervioso Central. En la enfermedad se describen 3 fases que presentan características clínico-patológicas variables entre ellas tenemos las siguientes: (10, 11, 18, 19).

- **Fase aguda.-** La fase aguda comienza cuando el parásito ingresa en el organismo después de la picadura del vector. El cuadro general produce fiebre, poliadenopatías, hepato y esplenomegalia (20). Esta fase de la enfermedad pasa desapercibida la mayoría de las veces, es asintomática. Pero suele aparecer entre los 5 y los 14 días tras la infección. Se caracteriza por presentar parasitemia circulante detectable en sangre periférica y en aproximadamente el 90% de los casos. Los amastigotes de *T. cruzi* se reproducen dentro de las células, especialmente macrófagos, fibroblastos, células de Schwann, miocitos estriados y lisos, y luego las

destruyen. Los parásitos libres invaden otras células que también se rompen y causan reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos. (5, 21).

- **Fase indeterminada o de latencia.-** Se caracteriza por ausencia de síntomas y presencia de signos con serología positiva de anticuerpos contra *T. cruzi* o parasitemia positiva. Hay baja parasitemia entre 20% y 60% de los casos. Este periodo se inicia de ocho a diez semanas después de la fase aguda y puede durar meses o años, antes de manifestarse la forma crónica (5, 21). La fase indeterminada representa entre 50 y 70% de todos los pacientes chagásicos. Los pacientes tienen parasitemia y serología positiva (títulos de IgG bajos), pero otros exámenes de laboratorio son normales, tales como: electrocardiograma y radiografías. (22).
- **Fase crónica.-** Generalmente esta fase de la enfermedad aparece tardíamente y las localizaciones principales corresponden a miocarditis y a visceromegalias. Así mismo disminuye notablemente la cantidad de los parásitos en la sangre y hay lesiones típicas en el corazón o en el tubo digestivo. La miocarditis crónica es la forma más frecuente de la enfermedad de Chagas y puede pasar asintomática mucho tiempo.

Las manifestaciones clínicas del corazón dependen de la extensión de las lesiones de este órgano. Frecuentemente se presentan trastornos del ritmo, la insuficiencia cardiaca congestiva y el tromboembolismo. La cardiomiopatía se caracteriza por cardiomegalia, disnea de esfuerzo, arritmias y muerte súbita. Entre los órganos más afectados del tracto digestivo son (megaesófago y megacolon), los pacientes presentan disfagia (dificultad para deglutir), odinofagia (dolor a la deglución), dolor torácico y tos. El sistema nervioso central y periférico también son afectados, las lesiones incluyen denervación, y desórdenes funcionales. (4, 5, 16).

Chagas congénito.- En general la enfermedad es responsable de alrededor del 10% de los abortos espontáneos y partos prematuros. Es general la enfermedad congénita es poco frecuente y puede ser asintomática. El cuadro clínico se caracteriza por hepato y esplenomegalia con o sin fiebre. Pueden presentarse convulsiones, hiporreflexia, hipotonía, temblores de las extremidades y apnea. La mayoría de los casos severos tienen manifestaciones hemorrágicas, por ejemplo, petequias, equimosis, erosión y mueren antes de cumplir el primer año de vida, otros sufren de meningoencefalitis desde formas leves hasta convulsiones. Son pocos los que presentan ictericia o chagomas diseminados. (5, 16).

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico clínico de la enfermedad varía de acuerdo a la forma clínica en la que se encuentre el paciente. En la fase aguda puede confundirse con varias enfermedades infecciosas febriles, sin embargo la presencia del chagoma son signos que contribuyen al diagnóstico. En la forma crónica es más difícil orientar el diagnóstico. El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* puede realizarse por:

- ✓ **Métodos directos.-** En los cuales se comprueba la presencia de del parásito en la muestra.
- ✓ **Métodos moleculares.-** En los cuales se comprueba la presencia de material genético del parásito en la muestra.
- ✓ **Métodos indirectos.-** Que detectan la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en la muestra. (23).

Diagnóstico de Laboratorio por Método Directo.- Es posible detectar los parásitos en sangre principalmente en la fase inicial de la infección, mediante exámenes en fresco, gota gruesa, extendidos coloreados, métodos de concentración, biopsia, cultivos y xenodiagnóstico.

- **Examen en fresco.**- Identifica la presencia de trypomastigotes de *T. cruzi*, por observación directa, en una muestra de sangre periférica fresca u otro fluido. Consiste en colocar una gota de sangre obtenida por punción digital con lanceta, entre lámina y laminilla. En la fase aguda se puede encontrar el parasito hasta en un 90 %, pero en la crónica la sensibilidad es menor del 10%. (5, 23).

- **Extendido sanguíneo o frotis.**- Es un procedimiento técnico con el que se separan los elementos formes de la sangre en una capa delgada de células separadas entre sí, las cuales una vez coloreadas facilitaran la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en el interior de los glóbulos rojos, sobre todo permitirá identificar la especie del parasito y otras características relacionadas con los estadios y especie de los mismos. Los extendidos delgados o frotis de sangre o plasma, en láminas o laminillas, se pueden colorear con los derivados de Romanowsky, especialmente Giemsa, lo cual es importante para la identificación morfológica. Su sensibilidad para el diagnóstico es menos del 60% en la fase aguda. (24).

- **Gota gruesa.**- Este método permite estudiar un mayor volumen de sangre y es más útil que el extendido, cuando la parasitemia es baja. Es recomendable hacer repetidas preparaciones para lograr mayor eficacia y su porcentaje de sensibilidad llega hasta el 70% en la fase aguda. Permite la concentración de la muestra de sangre. Se colocan de 3 a 4 gotas de sangre sin anticoagulante en un portaobjeto, las que luego se desfibrinan para posteriormente teñirse con Giemsa durante 30 minutos y ser observadas al microscopio, en busca de trypomastigotes de *T. cruzi*. (4, 5, 23).

Procedimientos de la toma de muestra:

- Después que los datos del paciente han sido registrados en forma apropiada en el formulario de registro individual para malaria, se deberá proceder de la siguiente manera:
- Preparar previamente los insumos y materiales necesarios para la toma de la muestra hemática, 1 ó 2 muestras por paciente, torundas de algodón secas y embebidas en alcohol, portaobjetos desengrasados, lanceta estéril y guantes.
- Explicar al paciente a cerca de los procedimientos que se van a realizar para la obtención de la muestra hemática.
- Sostener firmemente la mano menos hábil del paciente, elegir el dedo anular o medio parte lateral externa con la palma dispuesta frente al examinador y solicitar la flexión del resto de los dedos de la mano. En el caso de pacientes pediátricos se puede tomar la muestra del pie: borde lateral externo o la parte angular del talón.
- Limpiar la zona de elección con una torunda de algodón embebida en alcohol, utilizando golpes firmes para eliminar la grasa, la suciedad y al mismo tiempo estimular la circulación de la sangre.
- Secar la zona con una torunda de algodón seca y limpia.
- Puncionar la zona de elección con una lanceta estéril a través de un movimiento rápido y presionar suavemente el dedo para extraer las primeras gotas de sangre. Eliminar las dos primeras gotas de sangre limpiándolas con una torunda de algodón seca y asegurar que ninguna hilacha de algodón pueda mezclarse posteriormente con la sangre.
- Colocar el portaobjetos abajo y la zona de toma de la muestra arriba de este, colecte rápidamente la sangre apretando suavemente el dedo cuidando que el pulpejo no toque la lámina portaobjetos, depositar 1 gota de sangre en el centro de uno de los extremos de la lámina para la gota gruesa.

- Limpiar la zona con una torunda de algodón humedecida en alcohol y solicitar al paciente que presione el lugar de la punción para que la compresión impida el sangrado.
- Utilizar un ángulo del portaobjetos extensor y mezclar rápidamente la gota de sangre a través de movimientos giratorios y suaves, se debe proceder a la desfibrinización por 30 segundos para obtener una película homogénea, de 1 cm. de diámetro. De preferencia, realizar la homogenización de la muestra en una sola dirección, en forma concéntrica (de adentro hacia afuera). Identificar la muestra con lápiz negro en el sector inicial de la gota gruesa.
- Dejar secar las muestras a temperatura ambiente, en posición horizontal, cuidando de no dejar expuestas al sol, al polvo y protegida de los insectos (24).

Procesamiento Técnico de la muestra hemática:

- **Deshemoglobinización.-** Introducir la mitad del portaobjetos que contiene la muestra de gota gruesa en un recipiente que contenga agua corriente limpia cuidando de que la parte que contiene la muestra no entre en contacto con la pared del recipiente. La muestra debe permanecer en el agua hasta tornarse totalmente transparente, en caso de una mala desfibrinización o de muestras guardadas por mucho tiempo pueden encontrarse restos de hemoglobina.
- **Secar.-** Sacar la muestra del recipiente y dejar secar a temperatura ambiente en posición vertical, la gota gruesa siempre debe estar en la parte inferior.
- **Fijación.-** Una vez seca, colocar el portaobjeto en posición horizontal y utilizando una pipeta cubrir toda la muestra con alcohol al 96% por espacio de 3 a 5 minutos. Otra opción para efectuar este

procedimiento consiste en sumergir la muestra en metanol por espacio de 30 segundos.

- **Secado.-** Dejar secar la muestra a temperatura ambiente. Antes de la coloración asegúrese que la gota gruesa esté seca.
- **Coloración.-** Colocar la lámina portaobjetos en posición horizontal sobre la parrilla de tinción. Cubrir completamente la muestra hemática con el colorante preparado utilizando una pipeta. Dejar actuar el colorante por 30 minutos. Descartar el colorante y lavar la lámina con agua corriente bajo un chorro suave cuidando de que el agua no desprenda la muestra. Dejar secar las placas en una gradilla a temperatura ambiente. Observar al Microscopio óptico (24).

Calidad de la gota gruesa.- Una buena gota gruesa macroscópicamente debe tener las siguientes características: a simple observación, debe ubicarse en el centro de una de las mitades del portaobjetos, estar completa, medir 1 cm. de diámetro. Microscópicamente no se deben observar glóbulos rojos ni restos de hemoglobina, debe tener fondo claro y una concentración adecuada de 10 a 20 leucocitos por campo (24).

Lectura de la gota gruesa.- Enfocar con el objetivo de 10X, luego, colocar una gotita de aceite de inmersión sobre la muestra y examinar con el objetivo de inmersión 100X. Examinar toda la lámina en el microscopio.

Resultado.- Informar la presencia o ausencia de formas trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (25).

- **Método de concentración (Método de Strout).-** Esta técnica se basa en la concentración de los parásitos en la muestra sanguínea por centrifugación y examen del sedimento al microscopio en busca de trypomastigotes móviles de *Trypanosoma cruzi*. Es una técnica simple y de

buena sensibilidad en casos agudos de enfermedad de Chagas y en el seguimiento de congénitos. El método consiste en:

- Extraer de 5-10 ml de sangre venosa en un tubo sin anticoagulante.
 - Dejar a temperatura ambiente hasta que se coagule y separar el suero.
 - Centrifugar este suero a 800 rpm durante dos minutos para descartar los glóbulos rojos.
 - Centrifugar nuevamente el sobrenadante a 2000-2500 rpm durante 10 minutos.
 - Separar el sobrenadante (suero) y conservarlo a 4°C para el análisis serológico.
 - Colocar una alícuota del sedimento obtenido en una lámina portaobjetos.
 - Cubrir la muestra con una laminilla y proceder a la lectura.
 - Observar en el microscopio la presencia de trypomastigotes móviles de *Trypanosoma cruzi*, con objetivos de 10X o 40X de aumento. (25).
-
- **Método de microconcentración.**- La técnica consiste en concentrar los parásitos de una muestra de sangre colectada en tubos capilares heparinizados por centrifugación. Los elementos de la sangre se separan por gradiente de densidad, concentrándose los glóbulos rojos en la parte inferior capilar, sobre ella se ubica un anillo blanquecino de 1mm de altura conformado por glóbulos blancos y en la parte superior líquida transparente constituida por el plasma. Los tripanosomas presentes en la muestra se ubicarán entre los glóbulos blancos y el plasma. El procedimiento consiste en:
 - ✓ Obtener la sangre en los capilares heparinizados.
 - ✓ Centrifugar la muestra durante un minuto a 5000 rpm.
 - ✓ Sujetar el capilar a una lámina portaobjetos con cinta adhesiva
 - ✓ Conservar el capilar en forma vertical hasta el momento de la lectura.

- ✓ Observar directamente en el microscopio la zona del plasma aproximadamente a 10 mm de los glóbulos blancos.
 - ✓ Focalizar inicialmente con el objetivo de 10X aumento y luego buscar las formas trypomastigotes móviles del parásito con el objetivo de 40X. (25).
-
- **Biopsia.-** Se utiliza para comprobar las formas tisulares de *T. cruzi*. Se pueden ver en los tejidos los llamados nidos amastigotes en su interior. Sirve en algunos casos para el diagnóstico de la enfermedad, a pesar de no encontrarse parásitos en la sangre circulante.

 - **Cultivos.-** Se encuentran positivos en el 100% de los casos agudos y entre 3% a 55% en los pacientes con infección indeterminada y crónica. El medio más utilizado en la actualidad es el medio de LIT (Liver-Infusion-Tryptose), debido a que se puede obtener una sensibilidad muy alta en la fase aguda de la enfermedad y de un 40% a 50% en la crónica. Se ha demostrado que al sembrar en el sedimento, después de la remoción del plasma de sangre defibrinada de pacientes en la fase crónica, se obtiene positividad del 55%. Es más eficaz en la fase indeterminada debido a que la parasitemia es baja. (5, 25).

 - **Xenodiagnóstico.-** Consiste en utilizar los insectos vectores limpios de la infección, mantenidos en colonias en el laboratorio. Con ellos se hace picar a los pacientes sospechosos; si en la sangre ingerida existen parásitos, se obtiene su multiplicación dentro del tubo digestivo del vector. Se emplea en la fase indeterminada ya que la presencia de parásitos es muy baja. Presenta una efectividad entre 85% y 100% en las formas agudas, 80% en las congénitas y entre 20% en las crónicas.

Diagnóstico de Laboratorio por Método Molecular:

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**- Es una técnica de biología molecular que utiliza partidores específicos para amplificar en segmento del ADN de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes. El ADN del núcleo y del cinetoplasto contienen varias secuencias repetitivas que son de utilidad para el uso de la técnica de PCR. Con este método se detecta parasitemia en las fases aguda, indeterminada y crónica.

La sensibilidad de la PCR es mayor que con otras técnicas parasitológicas y varía según la fase de la infección, la edad del paciente y el volumen de la muestra. La PCR *T. cruzi* utilizada principalmente en nuestro medio es de tipo cualitativa, es el examen confirmatorio en inmunodeprimidos y en menores de 9 meses y requiere de dos resultados consecutivos para descartar falsos positivos de la técnica. En el caso de pacientes inmunocompetentes o mayores de 9 meses el resultado de PCR positivo debe ir acompañado de un resultado de búsqueda de anticuerpos positiva, lo que da confirmado el resultado.

La PCR cuantitativa permite medir la carga parasitaria circulante y es útil especialmente en los pacientes inmunodeprimidos y donantes de órganos en los cuales la serología no resulta útil por bajos niveles de CD4. Con ella también se puede realizar el seguimiento posterior al tratamiento. (5, 23).

Diagnóstico de Laboratorio por Métodos Indirectos.- Estas técnicas permiten cuantificar la concentración de inmunoglobulinas específicas contra antígenos de *T. cruzi*. Los diferentes procedimientos serológicos que detectan la presencia de anticuerpos, indican indirectamente la existencia, presente o pasada, del parásito en el organismo. Estas pruebas se utilizan en especial en las etapas latente y crónica de la infección, cuando es difícil encontrar los parásitos (5). Este tipo de técnicas además tienen en común que todas requieren un anticuerpo (antisuero)

para detectar un antígeno específico del microorganismo buscado (19). Las principales pruebas serológicas utilizadas son:

- **Hemaglutinación indirecta (HAI).**- Se utilizan glóbulos rojos tamizados a los cuales se les adhiere un antígeno con polisacáridos o glicoproteínas. El micrométodo semicuantitativo se utiliza como prueba inicial de selección en grupos grandes de población. Es decir este método se basa en la reacción de glóbulos rojos sensibilizados con *T. cruzi* que entran en contacto con anticuerpos específicos del parásito produciéndose aglutinación (reacción positiva). La sensibilidad es mayor en las formas crónicas que en las agudas y la especificidad se considera buena. (5, 23).
- **Fijación del complemento (FC).**- La técnica más usada ha sido la fijación del complemento del 50% de hemólisis, usando antígenos específicos de *T. cruzi* de mayor aplicación, en las formas indeterminadas y crónicas de la enfermedad. Estos antígenos son extractos acuosos o con metanol obtenidos del parásito completo. La especificidad depende del tipo de antígeno utilizado y es casi del 100% con antígenos proteicos; también se emplean fracciones purificadas del parásito. La sensibilidad es de 20% en las fases latente y crónica. Por la complejidad técnica de esta prueba se sustituyó por la inmunofluorescencia indirecta. (5).
- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI).**- Es una prueba sencilla y altamente específica que ha reemplazado a la clásica reacción de fijación del complemento. Esta técnica permite determinar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en diferentes muestras biológicas. Para estos efectos se preparan placas de vidrio con pocillos a las que se le adhieren epimastigotes de *T. cruzi* (parásito completo) obtenidas de cultivo. Si el suero del paciente tiene anticuerpos, se produce una reacción antígeno-anticuerpo, la que se detecta con la adición de un segundo anticuerpo

marcado con sustancias fluorescentes. Esta reacción se observa posteriormente en un microscopio de fluorescencia. (5, 23).

- **Pruebas de látex.-** Las partículas de polietileno se unen a diferentes tipos de antígenos obtenidos por lisis de parásitos. Esta prueba muestra una alta sensibilidad para el diagnóstico, tanto en las formas agudas como en las crónicas. Cada lote de antígeno debe ser valorado en su sensibilidad, especificidad y estabilidad, para poder conseguir una buena reacción. En general se puede considerar como una prueba de tamizaje de pacientes. (4, 5).
- **Aglutinación directa.-** Esta prueba es poco específica. Tiene especial valor para demostrar la presencia de anticuerpos en los estados agudos. El antígeno consiste en epimastigotes tratados con tripsina y formol. Se usa con o sin 2-mercaptoetanol para discriminar el tipo de anticuerpo. (5).
- **Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).-** La técnica de ELISA emplea antígenos solubles de *Trypanosoma cruzi*, adheridos a soportes inertes (placa de microtitulación) y antiglobulinas humanas conjugadas, con detectores de la reacción antígeno-anticuerpo. Es una prueba muy sensible para detectar anticuerpos IgG o IgM, de especial utilidad para bancos de sangre. (5, 19).

La reacción de ELISA consiste en pegar antígenos solubles del *Trypanosoma cruzi* (totales o recombinantes) en placas de poliestireno. Sobre cada uno de los reservorios de la placa se coloca suero de pacientes que, si tienen anticuerpos se unen a los antígenos del *Tripanosoma*. Luego de lavar para eliminar proteínas séricas no involucradas en la unión antígeno-anticuerpo, se agrega un reactivo constituido por anticuerpo anti inmunoglobulinas humanas marcado con una enzima (usualmente peroxidasa o fosfatasa alcalina). Después de un período de incubación y

nuevos lavados, se agrega un sustrato de la enzima que, si en la fase sólida se encuentra el doble complejo antígeno- anticuerpo del paciente- anticuerpo marcado, desarrolla un color cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos del paciente y a la afinidad de los mismos. Para la medición de esta intensidad de color es necesario contar con un espectrofotómetro de lectura vertical. (26)

La técnica de ELISA tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y mediante el uso de la fase sólida, consigue una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. (27)

Fases de un ensayo ELISA:

- **Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina).**- El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sándwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.
- **Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.**- La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
- **Formación de una o más capas de inmunocomplejos.**- En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo

unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.

- **Revelado de la reacción enzimática.-** Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría. (27).

Tipos de ensayos ELISA.- Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución o la determinación de la subclase de un anticuerpo. (27). Hay dos métodos básicos. El ELISA directo detecta antígenos y el ELISA indirecto detecta anticuerpos. En ambos procedimientos se utiliza una placa de microtitulación con numerosos pocillos poco profundos. (28).

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas).- Las placas se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido). (27).

ELISA indirecto.- Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor

sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. (27).

- **Western blot (Inmunoelectrotransferencia).**- Permite detectar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* que han sido separados mediante electroforesis y luego transferidas a una membrana sobre la cuales e realiza una reacción enzimática, que según sea el conjugado empleado, detecta la presencia de anticuerpos IgA, IgM o IgG por separado o simultáneamente. Las reacciones positivas se observan como bandas de precipitación en tiras de membranas sensibilizadas. (23).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

La presente investigación fue de tipo descriptivo-transversal

Universo

Los 400 habitantes del sector Lourdes perteneciente al sitio Nueva Unión ubicado en el Cantón Portovelo de la Provincia de El Oro.

Muestra

La conformaron los 102 habitantes del sector Lourdes del Cantón Portovelo que cumplieron con los criterios de inclusión del presente estudio.

Criterios de inclusión

- Personas que desearon formar parte del estudio y que firmaron el consentimiento informado.
- Aquellos que posiblemente sufrieron alguna picadura por triatoma.
- Habitantes que ingirieron alimentos como carne de zarigüeya.
- Pobladores que habitaron o habitan en viviendas de caña, madera, techo de teja.
- Aquellos que presentaron los síntomas en los 15 días posteriores a la picadura.

Criterios de exclusión

- Muestras hemolizadas, hiperlipémicas.
- Personas que han sido diagnosticadas de leishmaniasis, paludismo, toxoplasmosis y Trypanosoma rangeli.

MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS:

MÉTODOS DE LABORATORIO:

- Método directo (gota gruesa)
- Métodos Serológicos (técnica de ELISA)

PROCEDIMIENTOS:

Fase pre-analítica.- Primeramente se llevó a cabo la visita a las diferentes comunidades donde se realizó la investigación.

- Oficio dirigido a la Lcda. Magali Carrión Directora del Laboratorio NOVA LAB. **(Anexo 1).**
- Consentimiento informado que se aplicó a cada uno de los habitantes participantes del estudio. **(Anexo 2).**
- Se brindaron charlas educativas y entrega de trípticos informativos. **(Anexo 3).**
- Protocolo de toma de muestras. **(Anexo 4).**
- Una vez recolectadas las muestras mediante venopunción con la utilización de jeringas de 5ml, se colocó la sangre en los tubos sin aditivo (tubo rojo), debidamente etiquetadas con la ayuda de gradillas manteniendo los tubos en posición vertical para evitar su movimiento, de tal manera que impidió que las mismas se deterioren. Las muestras fueron transportadas en los contenedores adecuados con geles o unidades de refrigeración apropiados.
- Se elaboró una hoja de registro de resultados. **(Anexo 5).**

Fase analítica.- Se procedió a la realización de los análisis respectivos en el Laboratorio NOVA LAB del cantón Balsas mediante los siguientes procedimientos:

Método directo (gota gruesa)

Es un método que permite la concentración de la muestra de sangre. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- ✓ Se colocó una gota de sangre sin anticoagulante en una placa portaobjetos.
- ✓ Empleando la esquina de otra lamina, realizamos movimientos circulares, desde el centro de la gota, de modo que la sangre se distribuyó uniformemente (en un área de 1cm²).
- ✓ Se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente desfibrinarlas (introduciendo el portaobjetos que contiene la muestra de gota gruesa en un recipiente que contenga agua corriente limpia cuidando de que la parte que contiene la muestra no entre en contacto con la pared del recipiente. La muestra debió permanecer en el agua hasta tornarse totalmente transparente y se dejó secar a temperatura ambiente).
- ✓ Luego se fijó con alcohol durante 3-5 min.
- ✓ Las muestras fueron teñidas con tinción de Giemsa, colocando las láminas sobre la varilla de coloración.
- ✓ Se preparó el volumen necesario de solución Giemsa diluida, aproximadamente 2 ml por lámina. En la probeta se colocó 2 gotas de solución de Giemsa stock por cada 1ml de solución amortiguadora y se homogenizó la solución colorante.
- ✓ Posteriormente se cubrió la muestra con la solución Giemsa diluida.
- ✓ Se dejó actuar durante 30 minutos, luego se lavó con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente.
- ✓ Se observó al microscopio en busca de trypomastigotes de *T. cruzi*. **(Anexo 6)**.

Técnica de ELISA.

Esta técnica se basa en la posibilidad de inmovilizar el antígeno a una fase sólida, sobre la cual se permite en una primera etapa la unión del anticuerpo. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se colocó el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejamos el primer pocillo vacío para el blanco.
- Se dispensó 200µl del control Negativo por triplicado, 200µl del calibrador por duplicado y 200µl del control Positivo.
- Seguidamente se adicionó 200µl del diluyente de la muestra (DILSPE) a todos los pocillos; a continuación se dispense 10µl de la muestra en los pocillos correspondientes. Se agito suavemente la placa para mezclar la muestra con el diluyente, evitando contaminar los pocillos adyacentes.
- Posteriormente se dispensó 50µl del diluyente de ensayo (DILAS) en los pocillos de los controles, calibrador y muestras. Se comprobó que los pocillos de las muestras estén coloreados de azul oscuro.
- Se procedió a incubar la microplaca durante 45 min. a 37°C.
- Después se lavó la microplaca con el lavador automático aspirando y dispensando 350µl/pocillo de solución de lavado diluida.
- Se dispensó 100µl del conjugado enzimático en cada pocillo, excepto en A1 y se cubrió con la hoja adhesiva.
- Se incubó la microplaca durante 45 min. a 37°C.
- Se lavó los pocillos de 4-5 ciclos con 350µl de solución de lavado.
- Se dispense en cada pocillo 10µl de la mezcla Cromógeno/Substrato, incluyendo el blanco. Seguidamente se incubó la microplaca a temperatura ambiente (18°C-24°C) durante 15 min.
- Se dispense 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática.
- Finalmente se midió la intensidad de color de la solución en todos los pocillos mediante el lector de microplacas ELISA.

Cálculo del punto de corte (CUT-OFF).- Los resultados del test fueron calculados por medio de un valor de corte (cutt-off), determinado con la fórmula referida bajo un valor medio de OD450nm del control negativo (NC).

$$\text{Valor de Corte} = \text{NC} + 0.350$$

En este caso el Punto de Corte fue de 0.372 DO450nm. Este valor encontrado se usa para interpretar los resultados.

Interpretación de los resultados.- La interpretación de los resultados se realizó mediante el cociente entre las DO a 450nm de las muestras (M) y el valor de corte (Co), es decir M/Co. Un resultado negativo es considerado <0.9 y un resultado positivo es considerado >1.1 lo que indica infección por *T. cruzi*. **(Anexo 7)**.

Fase pos-analítica.- Se realizó la tabulación de los resultados obtenidos mediante tablas de frecuencia.

- Los resultados fueron entregados a la población de estudio y al personal médico de la zona VIII de Malaria.
- Se elaboró el reporte de resultados. **(Anexo 8)**.
- Certificado de haber realizado el trabajo de campo en el laboratorio **(Anexo 9)**.
- Imágenes sobre la realización del trabajo investigativo **(Anexo 10)**.

ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Para el informe de los resultados obtenidos, se procedió a la tabulación respectiva de los mismos mediante el programa Microsoft Excel 2010, utilizando tablas de frecuencia y gráficos estadísticos en los que se representaron los valores obtenidos.

6. RESULTADOS

Tabla N° 1

**PRESENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE EL MÉTODO DIRECTO
GOTA GRUESA EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL
CANTÓN PORTOVELO EN FEBRERO-MARZO 2013**

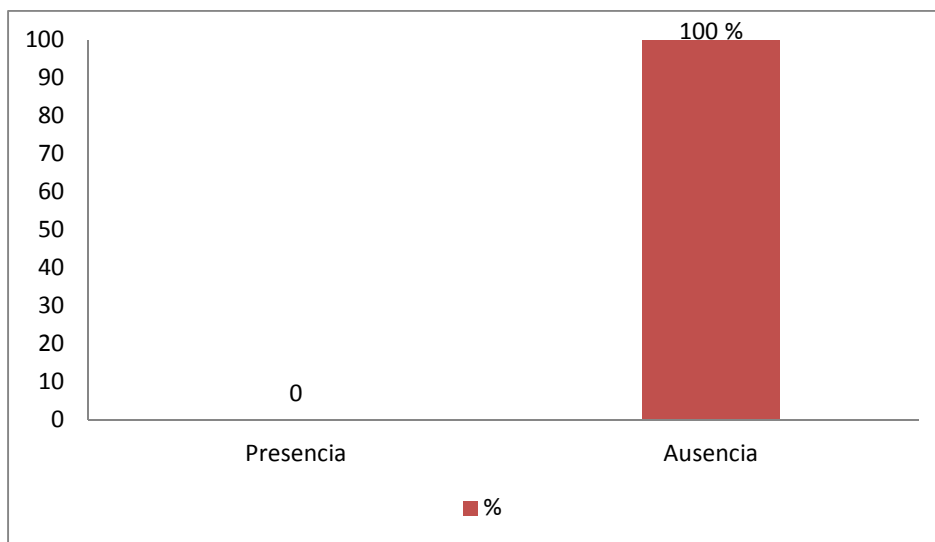
Gota gruesa	Frecuencia	%
Presencia	0	0
Ausencia	102	100
Total	102	100

Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Gráfico N° 1

**PRESENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE EL MÉTODO DIRECTO
GOTA GRUESA EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL
CANTÓN PORTOVELO EN FEBRERO-MARZO 2013**



Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Interpretación.- En el gráfico expuesto se observa que el 100% de los habitantes investigados no presentaron el parásito.

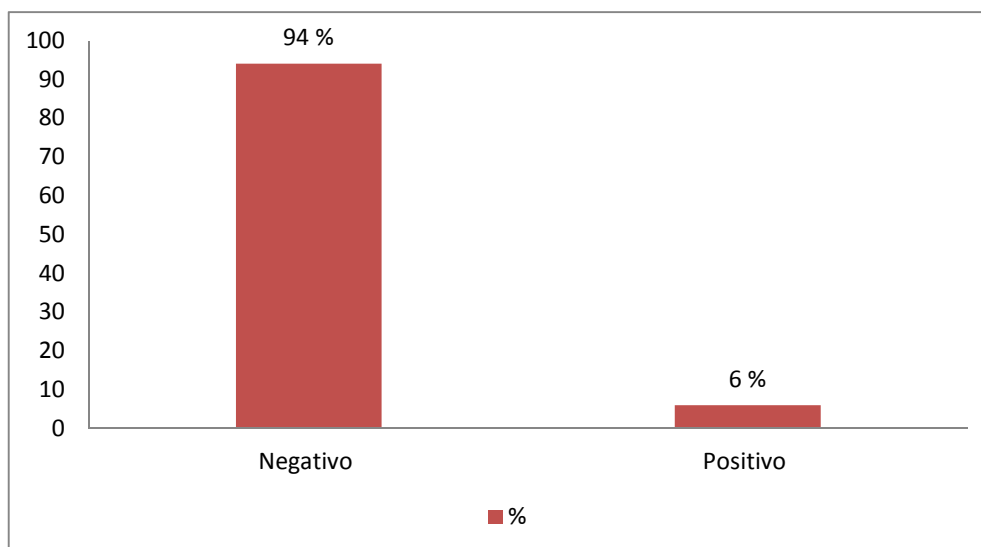
Tabla N° 2
DETERMINACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO EN FEBRERO-MARZO 2013

ELISA	Frecuencia	%
Negativo	96	94
Positivo	6	6
Total	102	100

Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Gráfico N° 2
DETERMINACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) EN LOS HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO EN FEBRERO-MARZO 2013



Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Interpretación.- En el presente cuadro se observa que existe una seropositividad del 6% mediante la técnica de ELISA.

Tabla N° 3

CASOS POSITIVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) DE ACUERDO AL SEXO DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO EN FEBRERO-MARZO 2013

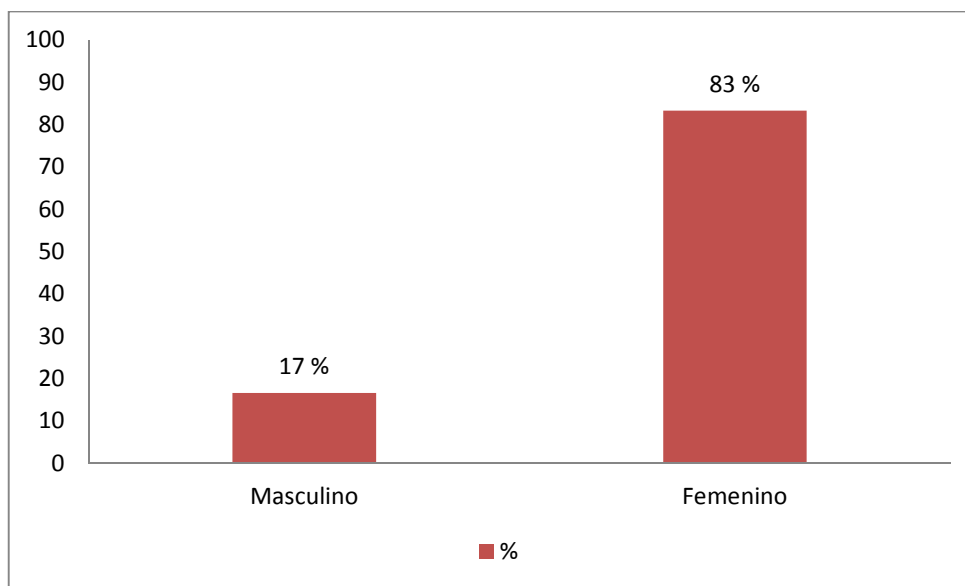
Sexo	Frecuencia	%
Masculino	1	17
Femenino	5	83
Total	6	100

Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio.

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Gráfico N° 3

CASOS POSITIVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) DE ACUERDO AL SEXO DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO EN FEBRERO-MARZO 2013



Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Interpretación.- En el gráfico expuesto se observa que del total de casos positivos el 83% corresponden al sexo femenino.

Tabla N° 4

CASOS POSITIVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) DE ACUERDO A LA EDAD DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO EN FEBRERO-MARZO 2013

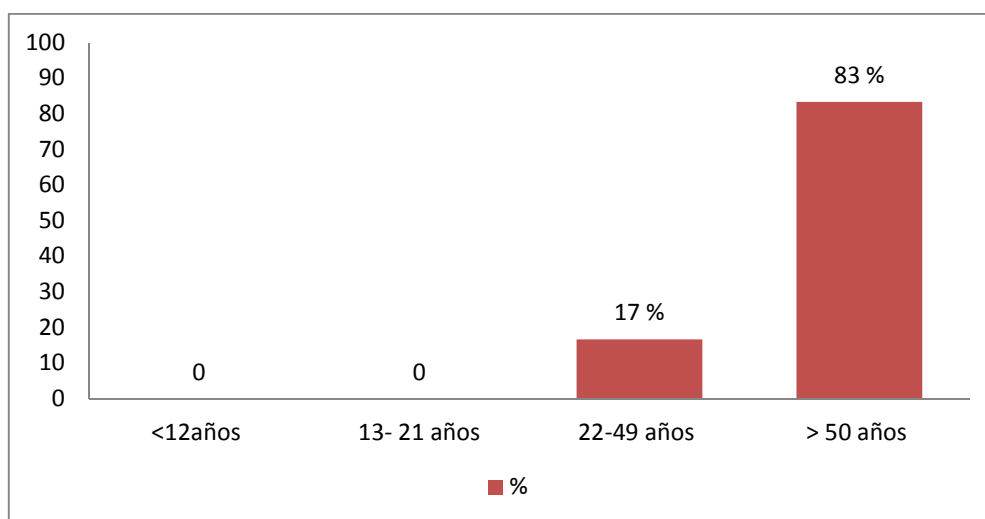
Edad	Frecuencia	%
<12años	0	0
13- 21 años	0	0
22-49 años	1	17
> 50 años	5	83
Total	6	100

Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el Laboratorio.

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Gráfico N° 4

CASOS POSITIVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA (IgG-IgM) DE ACUERDO A LA EDAD DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO EN FEBRERO-MARZO 2013



Fuente: Valores obtenidos de los análisis en el laboratorio

Elaborado por: Lilia Elizabeth Jiménez Loyola

Interpretación.- Se puede observar que del total de casos positivos el 83% corresponden a los mayores de 50 años.

7. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra sobre todo en América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica. A nivel mundial, se calcula que unos 10 millones de personas están infectadas, principalmente en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica. Más de 25 millones de personas están a riesgo de adquirir la enfermedad. (3)

El sector Lourdes perteneciente al cantón Portovelo es una zona endémica en el cual se ha comprobado la presencia del vector triatoma conocido como chinchorro en la mayoría de las viviendas. Este sector es un lugar retirado del subcentro de salud, no cuenta con todos los servicios básicos y se estima que la población infantil es la que se encuentra más propensa a adquirir la infección debido a que tienen contacto directo con la tierra, madera y arbustos. Es por ello que se realizó el presente estudio el cual se basó en la identificación de *Trypanosoma cruzi* en los habitantes del sector Lourdes del Cantón Portovelo, se utilizó el método directo gota gruesa y la técnica de ELISA contra *Trypanosoma cruzi*, de los cuales se obtuvo como resultados del estudio ausencia del parásito a través del método de gota gruesa y una seropositividad de 6 casos representado el 6% en los 102 habitantes.

Datos similares encontrados en el estudio realizado por Castillo. S. en el 2004 en el Municipio Nirgua Estado Yaracuy, con una muestra de 852 habitantes entre 5 y 50 años a los cuales se investigó la presencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* mediante: ELISA, obteniendo una seroprevalencia global de anticuerpos de 5,6%, donde el grupo de edad entre >41 y <50 años se ubicó en 16,4%. Los resultados obtenidos por Nirgua mostraron una seroprevalencia mediante la técnica de ELISA de un 5,6% comparable con los de nuestro estudio ya que se presentó en un 6%. (29).

Datos similares encontrados en un artículo publicado por Ríos., F. en Turbo, Antioquia. En este artículo se reporta que se realizó un estudio descriptivo. Se evaluaron 156 personas, y se identificaron 11 casos agudos de enfermedad de Chagas, 10 con títulos de anticuerpos IgM e IgG contra *Trypanosoma cruzi* por IFI y ELISA. A las muestras positivas para IFI-IgM se les practicó gota gruesa extendido. Se observó una elevada prevalencia de enfermedad de Chagas y anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en este estudio y una similitud con los de esta investigación, se empleó la técnica de ELISA dando como resultado 10 casos positivos para Antioquia y 6 casos para los de esta investigación. (30).

Datos encontrados en un estudio realizado por Berrizbeitia M. en la población rural de Miraflores, estado Monagas en el que participaron 62 individuos del sexo masculino (58,5%) y 44 del sexo femenino (41,5%). El diagnóstico serológico fue realizado mediante la prueba de ELISA utilizando antígenos fijados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*. De los 106 individuos evaluados, sólo 3 resultaron seropositivos para anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi*, representando un 2,8% de seropositividad. De estos individuos, 2 fueron del sexo femenino y 1 del sexo masculino.

Esto deduce que los estudios no fueron similares pese a la utilización de la misma técnica y de la población de estudio, por lo que se obtuvo como resultado en el estado de Monagas una seropositividad de un 2,8% a diferencia del presente estudio que fue de un 6%. (31).

8. CONCLUSIONES

Finalizado el trabajo investigativo se llegó a las siguientes conclusiones:

- Los resultados mediante el examen de gota gruesa realizada a la población de estudio se determinó ausencia del parásito, lo que nos indica que no existió enfermedad de Chagas en etapa temprana.
- Referente a los resultados obtenidos de las muestras analizadas mediante la técnica de ELISA, se obtuvo una positividad de 6 casos representando el 6% del total de las muestras recolectadas. El total de casos positivos encontrados es considerable ya que establece un punto de alerta epidemiológica frente a esta enfermedad y por ende constituye una zona endémica debido a la presencia del vector triatoma en la comunidad.
- El mayor porcentaje de personas seropositivas para *T. cruzi* mediante la técnica de ELISA corresponden al sexo femenino con un 83%.
- Se entregó los resultados de los exámenes de laboratorio y trípticos informativos sobre la enfermedad de Chagas a la población investigada y al personal médico de la zona VIII de Malaria, para que se dé el tratamiento adecuado en base a los resultados obtenidos.

9. RECOMENDACIONES

Una vez establecidas las conclusiones se recomienda lo siguiente:

- Impulsar a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico a la realización de nuevos estudios investigativos profundizando cada vez más sobre este tema la transmisión de *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, con el propósito de disponer de estadísticas o datos reales tanto a nivel regional como local, que permitan tomar las medidas necesarias para resolver la problemática existente y por ende disminuir el riesgo de contraer la enfermedad.
- Implementar en los Centros Educativos programas informativos sobre el reconocimiento del vector y la prevención de la Enfermedad de Chagas.
- Fortalecer la vigilancia e información epidemiológica de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas a fin de que los pacientes sean tratados oportunamente y de esta forma evitar las complicaciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fitzpatrick., T. Dermatología en Medicina General. 7ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Año 2009. Pág.: 2008-2009.
2. Pablos., Torro., L., M. Análisis global dela familia multigénica MASP de Trypanosoma cruzi. [en línea]. Editorial de la Universidad de Granada. Publicado: En el 2010. Disponible en: (<http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/5657/1/18896650.pdf>).
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). [en línea]. Publicado: Agosto del 2012. Disponible en: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>).
4. Álava., L. Incidencia de la enfermedad de Chagas en las muestras recolectadas de la comunidad el Bejuco en el Instituto Nacional de Higiene Portoviejo Mayo-Octubre del 2011. [en línea]. Publicado: 2011. Disponible en:(<http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/388/1/TESIS%20DE%20GRADO.pdf>).
5. Botero. D. Parasitosis humanas-Tripanosomiasis. 5ª edición; Medellín, Colombia. Año 2012. Pág.: 277-312.
6. Altamirano., K. Tesis sobre Estudio Seroepidemiológico de la infección por Trypanosoma cruzi en habitantes de tres comunidades rurales del municipio de Cinco Pinos, Chinandega. Publicado: en el 2009. Pág.: 14-28.
7. Lawrence., A. y Orihel., T. Atlas de parasitología humana. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. Impreso en enero del 2010. Pág.: 161-162.

8. Wanace., P. y Geoffrey P. "Atlas de medicina tropical y parasitología".6ª edición. Madrid, España 2008. Pág.: 227-232.
9. Pretell. E. Ministerio de Salud Pública. Enfermedad de Chagas. Un proyecto conjunto de la Oficina General de Epidemiología (OGE). Edición: reimpresso en el 2008. Pág.: 9-37.
10. Romero., C. R. Microbiología y parasitología humana. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Año 2007. Pág.: 1427-1429.
11. Brooks., G. Microbiología Médica. 25ª edición. Impreso en China en el 2010. Pág.: 674-675.
12. Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico-Parasitología. Capítulo 49. 12ª edición. Editorial Médica Panamericana. Impreso en enero del 2007. Pág.: 558-560, 575-578, 606-608.
13. Geffner., J. Fainboim., L. Introducción a la inmunología humana. 5ª edición, Editorial Médica Panamericana. 1ª reimpresión-Buenos Aires, junio del 2008. Pág.: 401-402.
14. Koneman., E. Diagnóstico Microbiológico-Texto y Atlas en color. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Impreso en enero del 2008. Pág.: 1244-1246.
15. Guhl. F. Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. Revisión 2009. [en línea]. Publicado: en Septiembre-Diciembre del 2009. Disponible en: (<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092037.pdf>).
16. Ministerio de Salud. Protocolos de vigilancia epidemiológica. Parte I; 2da edición reimpressa en el 2008. Publicado: en Lima en Noviembre del 2008. Disponible en:

(http://www.hsr.gob.pe/epidemiologia/pdf/protocolo_vigilancia_epidemio_1.pdf).

17. Rodríguez., V. La lucha frente a las enfermedades de la pobreza: responsabilidad y necesidad. 1ª edición. Editorial Biblioteca Nueva. Impreso en España en el 2011. Pág.: 109-112.
18. Murray., P. Microbiología Médica. 6ta edición. Edición original y Española. Año 2009. Pág.: 848-852.
19. Guillem., P. Microbiología clínica. 1ª edición. Editorial Médica Panamericana. Reimpreso en Octubre del 2007. Pág.: 130-133.
20. Pulpón., A. L. Trasplante cardíaco. Editorial Médica Panamericana S.A. Impreso en España 2009. Pág.: 148-149.
21. Gobierno de España. Ministerio de Sanidad y Política Social. Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. [en línea]. Publicado: en el 2009. Disponible en: (<http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/promocion/migracion/docs/enfermedadChagas.pdf>).
22. Werner Apt., B. Comité de Parasitología, Departamento de Enfermedades Emergentes y Re-emergentes- Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. [en línea]. Publicado: En el 2008. Disponible en: (<http://www.scielo.cl/pdf/rci/v25n3/art09.pdf>).
23. Ministerio de Salud. Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas. Chile-Santiago; [en línea]. Publicado: Febrero 2011. Disponible en: (http://ivl.ispch.cl/_Documentos%5CTrypanosoma%5CGu%C3%ADa_Clinica_Enf_de_Chagas_2011.pdf).

24. Jiménez M. Guía práctica del diagnóstico de Malaria. [en línea]. Impreso en Bolivia 2010. Disponible en: (http://www1.msh.org/projects/sps/SPS-Documents/upload/bolivia_malaria_diagnosis_guide.pdf).
25. Vega., S. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Trypanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). Lima 2005. Pág.: 29-57.
26. Dra. Basso., B. El laboratorio en el diagnóstico de la infección chagásica. [en línea]. Publicado: 2006. Disponible en: (<http://enfermedadchagas.com.ar/labdiag.pdf>).
27. Coello. D. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Técnica ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). Publicado: El 10 de Septiembre del 2010. Disponible en: (<http://www.slideshare.net/dicoello/metodo-de-elisa-y-microelisa>).
28. Tortora., G. y Funke., B. y Case., C. Introducción a la Microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2007. Pág.: 361, 543, 544.
29. Castillo., S. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* y factores de riesgo en comunidades rurales del Municipio Nirgua Estado Yaracuy 2003. [en línea]. Publicado: Venezuela, Abril-Junio del 2004. Disponible en: (http://bibmed.ucla.edu.ve/DB/psm_ucla/edocs/BM2002/BM200205.pdf).
30. Ríos., F. J. Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. [en línea]. Artículo original. Revista Biomédica Publicado: En Junio 2011. Disponible en: (<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84322466005>).
31. Berrizbeitia., M. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. [en línea]. Artículo original. Revista

de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Publicado: El 9 Junio del
2010. Disponible en:
(http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/viewFile/3050/2915).

11. ANEXOS

Anexo 1

Loja, 26 de Diciembre del 2012

Lcda.

Magali Carrión

DIRECTORA DEL LABORATORIO NOVA LAB

BALSAS

De mis consideraciones:

Yo Lilia Elizabeth Jiménez Loyola, de identidad 1104959000, al estar cursando el último año de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja y cumpliendo con los requisitos para la obtención del título de grado se me ha sido necesario realizar un proyecto de tesis relacionado con "Identificación de Trypanosoma cruzi en los habitantes del sector Lourdes del Cantón Portovelo", para lo cual solicito a Ud. muy comedidamente se me brinde todo el apoyo necesario para la realización de este proyecto investigativo, colaborándome con las instalaciones y equipamiento del laboratorio clínico incluyendo el equipo para realizar las pruebas de ELISA, asesoramiento logístico y demás material didáctico de la institución que usted oportunamente dirige, necesario para llevar a cabo los análisis para la detección del Trypanosoma cruzi, cuyos estudios los efectuaré en el período febrero-marzo del 2013.

Sin más por el momento y segura de contar con su apoyo para la realización de este proyecto de real importancia social, agradezco de antemano la atención brindada.

Atentamente.



.....
C.I. 1104959000



.....
0703070797.
AUTORIZACIÓN

Recibido 3:58: 27-12-201

Anexo 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo.....portador/a de la cédula número..... manifiesto que he recibido información acerca del examen de *Trypanosoma cruzi* que se me realizará con la finalidad de diagnosticar la enfermedad de Chagas causada a su vez por este parásito.

Posteriormente se me hará la entrega de los resultados obtenidos para un tratamiento oportuno en caso que lo requiera.

He leído y entendido perfectamente la información presentada anteriormente con relación a la determinación del análisis de *Trypanosoma cruzi*. Mis preguntas han sido contestadas y voluntariamente autorizo a la estudiante del VII Módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico, para que me sea realizado el examen.

Fecha: Loja / / / 2013

.....

Firma del paciente o persona responsable

C.I.

Anexo 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

CONSENTIMIENTO INFORMADO DIRIGIDO A LOS PADRES DE FAMILIA

En forma libre y voluntaria yo _____ identificado (a) con la cédula de ciudadanía número _____ manifiesto que:

1. He recibido información, con el fin de que se le realice a mi hijo/a el análisis de *Trypanosoma cruzi* para detectar la presencia de parásitos causantes de la enfermedad de Chagas.
2. Para garantizar el derecho a la privacidad de mi representado, la información y datos, así como los resultados del análisis, estarán sometidos a confidencialidad.

Fecha: Loja / / / 2013

.....

Firma del paciente o persona responsable

C.I.

¿CÓMO SE PUEDE PREVENIR EL MAL DE CHAGAS?

Mejoramiento de la vivienda

- Conjar las techos de manera regular por juntas e hienas de zinc.
- Firmar las grietas en el adobe de las paredes.
- No dejar albas, cajas, leña y materiales de construcción en el patio y portal de la casa.
- Enlucir las paredes de cotto por interiores e exteriores.

Limpieza y desmontaje de la vivienda

- Mantener la casa siempre limpia y ordenada.
- No dejar en los alrededores (perreros, gallos, gallinas, etc.) heces de la vivienda.
- Bajar los escombros de la pared.

Esquema de Chichorros

- Revisar que en la leña y otros materiales no haya chichorros.
- Revisar frecuentemente la casa en busca de chinchorros, para **RECORDAR DIRECTAMENTE CEN**

"SIN CHINCHORROS NO HAY MAL DE CHAGAS"

TRANSMISORES DE MAL DE CHAGAS



"CHINCHORROS"

PARA EVITAR EL MAL DE CHAGAS

Busque y lleve los chinchorros al Colaborador Voluntario o al centro de salud.

- 1) Capture los chinchorros protegiéndose con una bolsa plástica y deposítelos en la misma bolsa.
- 2) En un papel escriba nombre y dirección del jefe de familia.
- 3) Ponga el papel en la bolsa y déndela muy bien sin abrirlo nadie más.
- 4) Llévela al Colaborador Voluntario o al centro de salud.





¿QUÉ ES EL MAL DE CHAGAS?

Es una enfermedad transmitida por insectos que se alimentan de sangre y se les conoce con el nombre de: "Chincheros".



¿CÓMO SE MANIFIESTA LA ENFERMEDAD?

De 1 a 2 semanas después de contraer la enfermedad se presentan los siguientes síntomas:

- Malestar general
- Fiebre o calenturas
- Escalofríos o cansancio
- En la mayoría de los casos no hay síntomas.

Cuando el parásito ha entrado por el ojo, se inflaman los párpados durante 4 o 6

semanas. Esto se llama: **SIGNO DE ROMANA.**

Después de un tiempo se manifiestan daños graves en el corazón que pueden causar la muerte.



¿Cómo se transmite el Mal de Chagas?



1. Con las heces infectadas con microbios del Mal.
2. Transfusiones de sangre con microbios del Mal de Chagas.
3. Las mujeres infectadas durante el embarazo pueden transmitir Mal de Chagas a sus hijos.

SITIOS PREFERIDOS DE LOS CHINCHORROS

1. Techos de teja o hño.
2. Detrás o debajo de los insectos.
3. Detrás de los cuadros.
4. En las rejillas de los paredes de cocha.
5. En paredes agrietadas de adobe.
6. Debajo de los colchones.
7. Marco de ventanas y puertas.



Anexo 4

PROTOCOLO PARA LA TOMA DE LA MUESTRA

- ✓ Utilizar todo el traje de protección personal
- ✓ Pedirle al paciente que adopte una posición cómoda (sentado).
- ✓ Elegir una vena apropiada palpándola a su vez con el dedo índice.
- ✓ Se le pedirá al paciente que haga puño para que las venas resalten y se hagan palpables.
- ✓ Colocar el torniquete varios centímetros por encima de la zona escogida, es importante que este torniquete no permanezca mucho tiempo.
- ✓ Previa asepsia de la zona de la punción con una solución antiséptica, generalmente alcohol isopropílico al 70 % embebido en una torunda de algodón.
- ✓ Introducir la aguja con el bisel hacia arriba a un ángulo de 45° y cuando comience a fluir la sangre, se debe liberar el torniquete.
- ✓ Cuando se haya extraído toda la sangre necesaria, se le solicitará al paciente que relaje el puño.
- ✓ Se coloca un algodón estéril sobre la zona de la punción, mientras se retira la aguja.
- ✓ Colocar una gota de sangre extraída en una placa portaobjetos para realizar el análisis de la gota gruesa.
- ✓ Posteriormente colocar la sangre en un tubo indicado como es el de tapa roja y desechar los residuos en su respectivo lugar.
- ✓ Colocar una curita sobre el lugar de la punción.

Procesamiento de muestras:

- ✓ Una vez coagulada la sangre se debe colocar los tubos en la centrífuga.
- ✓ Debe centrifugarse al menos 5 minutos a 3500 rpm
- ✓ Transcurrido este tiempo se separa el suero de los corpúsculos sanguíneos con la ayuda de micropipetas.
- ✓ Se retirará suero necesario para el análisis de *Trypanosoma cruzi*.

Anexo 6

Procedimiento del Método directo (Gota gruesa)

Este procedimiento, comprende la eliminación de hemoglobina (que retiene el colorante) a través de la deshemoglobinización que facilitara la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en el interior de algunas células sanguíneas, principalmente cuando se tratan de densidades parasitarias bajas. El procedimiento consiste en:

- ✓ Colocar una gota de sangre sin anticoagulante en una placa portaobjetos.
- ✓ Empleando la esquina de otra lamina, realizamos movimientos circulares, desde el centro de la gota, de modo que la sangre se distribuya uniformemente (en un área de 1cm²).
- ✓ Dejar secar a temperatura ambiente para posteriormente desfibrinarlas (introduciendo el portaobjetos que contiene la muestra de gota gruesa en un recipiente que contenga agua corriente limpia cuidando de que la parte que contiene la muestra no entre en contacto con la pared del recipiente. La muestra debe permanecer en el agua hasta tornarse totalmente transparente y dejar secar a temperatura ambiente).
- ✓ Una vez seca fijar con alcohol durante 3-5 min o sumergir la muestra en metanol durante 30 segundos.
- ✓ Las muestras deben teñirse (tinción de Giemsa), colocando las láminas sobre la varilla de coloración.
- ✓ Preparar el volumen necesario de solución Giemsa diluida, aproximadamente 2 ml por lámina. En la probeta colocar 2 gotas de

solución de Giemsa stock por cada 1ml de solución amortiguadora y homogenizar la solución colorante.

- ✓ Cubrir la muestra con la solución Giemsa diluida.
- ✓ Dejar actuar durante 30 minutos, lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.
- ✓ Observar al microscopio en busca de trypomastigotes de *T. cruzi*.

Anexo 7

Doc.: INS TCAB.CE/esp Page 1 of 7 Rev.: 0 Date: 02/2008

T.cruzi Ab

Ensayo inmunoenzimático de tercera generación para la determinación de anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* en suero y plasma humano

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via Columella n° 31
20128 Milano - Italy

Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 26007726
e-mail: dipro@tin.it

REF TCAB.CE
96/192/480/960 Tests

T.cruzi Ab

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático de tercera generación (ELISA) para la determinación de anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* (Tc) en suero y plasma humano. El puede ser utilizado para el cribado de unidades de sangre y el seguimiento de pacientes infectados por Tc.
Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN

Los *Trypanosomas* son protozoos flagelados conocidos por infectar humanos y causar la enfermedad de Chagas (*T.cruzi*) y la enfermedad del sueño (*T.brucei*). La enfermedad de Chagas está ampliamente extendida en países de América del sur y se conoce que está también presente en el sur de EE.UU y algunas regiones africanas. El ciclo vital de *T.cruzi* requiere tanto un reservorio animal (habitualmente roedores) como un insecto vector. En humanos, la proliferación de parásitos tiene lugar en órganos como el corazón y, en las fases tempranas de la enfermedad, también en sangre periférica (fase no proliferativa). La enfermedad aguda habitualmente se resuelve sin tratamiento, sin embargo pueden presentarse patologías crónicas como alteraciones en el miocardio, megacolon y megaresfago.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Los microplacas están recubiertas con antígenos recombinantes específicos para Tc. La fase sólida es primeramente tratada con la muestra diluida y, si están presentes, los anticuerpos *T.cruzi* son capturados por los antígenos. Después del lavado de todos los demás componentes de la muestra, en la 2ª incubación los anticuerpos Tc unidos son detectados mediante anticuerpos policlonales específicos anti IgG&M, conjugados con peroxidasa (HRP). La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-Tc presentes en la muestra. Un valor de corte (cut-off) permite que estas densidades ópticas sean interpretadas como resultados de anticuerpos *T.cruzi* positivos y negativos.

D. COMPONENTES

La configuración estándar del equipo código TCAB.CE contiene reactivos suficientes para 192 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

nº2 microplacas. Cada placa contiene 12 líneas de 8 pocillos rompibles recubiertos con antígeno Tc recombinante de Chagas. Las placas están empaquetadas en bolsas selladas con desecante.

2. Control Negativo: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Liso para usar. Contiene 1% proteínas de suero de cabra, tampón citrato sódico 10mM a pH 8.0+/- 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.1% Kathon GC como conservantes. El control negativo está codificado con el color verde oliva.

3. Control positivo: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Liso para usar. Contiene anticuerpos positivos humanos frente *T.cruzi*, 1% proteínas de suero de

cabra, tampón citrato sódico 10mM a pH 8.0+/- 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.1% Kathon GC como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde oscuro.

4. Calibrador: CAL

2x15ml/vial. Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se detalla en el envase. Contiene anticuerpos frente a *T.cruzi* titulados mediante un "Gold Standard" interno, tampón Tris 50 mM a pH 7.8, 4% BSA, 2% Manitol, 0.2mg/ml sulfato de gentamicina y 0.1% Kathon GC como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUP 20X

2x50 ml/botella. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón de fosfato 10 mM a pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 y 0.1% Kathon GC como conservantes.

6. Conjugado: CONJ

2x15ml/vial. Solución lisa para el uso y codificada con el color rojo. Contiene anticuerpo policlonal de cabra anti IgMfIgG humanos conjugado con Peroxidasa (HRP) en presencia de tampón Tris 10mM a pH 8.8+/-0.1, 5% albúmina de suero bovino, 0.1% Kathon GC y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes.

7. Cromógeno/Substrato: SUBS TMB

2x15ml/vial. Liso para usar. Contiene una solución tamponada 50mM citrato-fosfato a pH 3.5-3.8, 4% dimetil sulfoxido, 0.03% tetra-metil-benzidina (TMB) y 0.02% peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Nota: Debido a la sensibilidad a luz intensa mantener almacenada protegida de la luz.

8. Diluyente del ensayo: DILAS

1x15ml/vial. Contiene una solución tamponada Tris 10mM pH8.0+/-0.1 y 0.1% de Kathon GC para el pre-tratamiento de muestras y controles, bloquea posibles interferencias.

9. Acido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3M

1x32ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ a 0.3 M.

Atención: Inhibente (X) R36/38; S2/26/30

10. Diluyente de muestras: DILSPE

2x50.0 ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato sódico 10mM a pH 8.0 +/- 0.1, 1% de proteínas de suero de cabra, 0.5% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.1% de Kathon GC como conservantes. Se usa para diluir las muestras.

Nota: El diluyente cambia de color verde oliva a verde azul oscuro en presencia de la muestra.

11. Sellador adhesivo, nº4

12. Manual de Instrucciones, nº1

Nota importante: Cuando se requiere, Dia-Pro puede suministrar reactivos para 96, 480 y 960 pruebas, como se detalla en la tabla siguiente:

Número de pruebas	96	480	960
Código	TCAB.CE.96	TCAB.CE.480	TCAB.CE.960
Microplaca	07 1	07 5	07 10
Control negativo	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Control positivo	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Calibrador	1 vial	5 viales	10 viales
Tampón de lavado conc.	1x50ml/botella	2x150ml/botellas	4x150ml/botellas
Conjugado	1x15ml/vial	2x40ml/botellas	4x40ml/botellas
Cromógeno/substrato	1x15ml/vial	2x40ml/botellas	4x40ml/botellas
Diluyente del ensayo	1x15ml/vial	1x40ml/botella	1x80ml/botella
Acido sulfúrico	1x15ml/vial	1x30ml/botella	2x30ml/botella
Diluyente de muestras	1x50ml/vial	2x125ml/botellas	4x125ml/botellas
Sellador adhesivo	07 2	07 10	07 20
Manual de instrucciones	07 1	07 1	07 1

E. MATERIALES NECESARIOS, NO SUMINISTRADOS

1. Microplacas calibradas (200µl y 10µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (Biodestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA calibrado (seco o húmedo) fijo a +37°C (+/-0.1°C de variación).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y posibilidad de 620-630nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vortex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo deberá ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. La utilización del equipo para análisis de unidades de sangre y componentes sanguíneos, tiene que realizarse en un laboratorio certificado y cualificado por el Ministerio de Salud o algún otro organismo de entidad similar.
3. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Debe ser evitado el uso de cualquier objeto punzante (agujas) o cortante (cuchillas). Todo el personal involucrado debería ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de la Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras deberá estar vacunado contra HSV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. El ambiente de laboratorio deberá estar controlado para evitar contaminantes como polvo u agentes microbianos cuando se abren los vials del equipo, las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Conservar el equipo a temperatura entre 2-8°C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
7. No intercambiar los componentes de los diferentes lotes de los equipos. También se recomiendan no intercambiar los componentes aunque si provienen de dos equipos del mismo lote.
8. Compruebe que la solución de los reactivos esté clara y no contiene precipitados ni agregados en el momento del uso. Si los tuviera, advierta al responsable del laboratorio para tomar las medidas oportunas.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
10. Evitar contaminación cruzada entre componentes del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.
11. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el equipo e íntegramente en los reactivos.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, como ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de la Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de levado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.

14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos del laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de levado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso del autoclave a 121°C durante 20 minutos.
15. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente con agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
16. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame lavar la zona afectada con agua abundante.
17. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipulados como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRAS: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asepticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínicos. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica ya que podría afectar la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.
3. Identificar adecuadamente las muestras con código de barras o con nombres para evitar errores en los resultados. Se recomienda usar códigos de barras cuando se utilice el equipo en el análisis de las unidades de sangre.
4. Muestras hemolizadas (rojas) y visiblemente hiperlipémicas ("lechosas") deben ser descartadas ya que podrían generar resultados falsos al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El plasma y el suero se pueden conservar hasta 5 días a 2°C-8°C desde el día de su extracción. Si se quiere mantener por periodos más largos, la muestra se puede almacenar a -20°C durante meses. Cualquier muestra no deberá ser congelada/descongelada más de una vez ya que podrían generarse partículas que afectarían a los resultados.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8 micras.

H. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Estudios realizados sobre Equipos abiertos durante periodos nunca superiores a seis meses, y utilizados hasta 6 veces no revelan pérdidas de actividad.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto en la fabricación. En este caso, contacte con el servicio técnico de apoyo al cliente Dia.Pro's. Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a +2°C-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras restantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie su color de amarillo inicial a verde.

Control Negativo:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vortex antes de usar.

Control Positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vortex antes de usar. Manejar este reactivo como potencialmente infeccioso, aunque las partículas víricas presentes en el control, hayan sido previamente inactivadas.

Calibrador:

Añade el volumen de agua de calidad ELISA, indicado en la etiqueta, al polvo liofilizado. Permite que se disuelva totalmente y mezcle suavemente en el vortex. Manejar este reactivo como potencialmente infeccioso, aunque las partículas víricas presentes en el control, hayan sido previamente inactivadas.

Nota: La solución no es estable. Almacenar en alícuotas en el congelador a -20°C.

Tampón de lavado concentrado:

La solución concentrada 20 veces, tiene que ser diluida con agua bidestilada y agitada suavemente antes de ser usada. Ya que algunos cristales de sal pueden estar presentes en el vial, procure disolver todo el contenido cuando prepare la solución. Durante la preparación evite la formación de espuma o burbujas, que pudieran originar una mala eficiencia del ciclo de lavado.

Nota: Una vez diluido, la solución de lavado es estable 1 semana a 2-8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con ayuda de un vortex antes de usar.

Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En el caso de que deba transferirse el reactivo utilizar solamente contenedores de plástico, a ser posible estériles y desechables.

Cromógeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con ayuda de un vortex antes de usar.

Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. No exponer a iluminación intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas.

Si este componente debe de ser transferido, use solamente contenedores de plástico, a ser posible estériles y desechables.

Diluyente del ensayo:

Listo para el uso. Mezclar bien en el vortex antes de usar.

Ácido sulfúrico:

Listo para usar. Mezclar bien en el vortex antes de usar.

Atención: Irritante (XI R36/38, S2/26/30)

Leyenda: R 36/38 = Irritante de piel y ojos.

S 2/26/30 = En caso de contacto con los ojos, lévese inmediatamente con abundante agua y busque ayuda médica.

Diluyente de Muestras

Listo para el uso. Mezclar bien en el vortex antes de usar.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. Las Microplacas deben ser calibradas para que dispensen correctamente el volumen requerido en cada ensayo, y deberán también descontaminarse periódicamente en aquellas partes que pudieran accidentalmente entrar en contacto con la muestra o los reactivos del equipo (10% de lejía, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deberán ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una fiabilidad de $\pm 2\%$.

2. El incubador de ELISA debe ser ajustado a $+37^{\circ}\text{C}$ (con una tolerancia de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y controlado periódicamente para establecer que la temperatura correcta se mantiene. Los incubadores secos y los baños de agua, se pueden utilizar para las incubaciones siempre y cuando estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.

3. El lavador de ELISA es extremadamente importante para el resultado del ensayo. Antes de emplearse en los ensayos de rutina del laboratorio, debe ser cuidadosamente optimizado y validado usando los controles y series de referencia pertinentes. Para asegurar que el ensayo se realiza conforme lo esperado, normalmente basta con 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de 350 μl pocillo de solución de lavado = 1 ciclo). Se recomienda un tiempo entre ciclos de 20-30 segundos. Para establecer correctamente el número de lavados, se recomienda la ejecución de un ensayo con los controles del equipo y las muestras de referencia del negativo y positivo tratando de ajustarlos a los valores indicados en las secciones "Validación del ensayo" y "Procedimiento del ensayo". La calibración periódica del volumen a dispensar (descontaminación y lavado de las agujas) debe hacerse según las instrucciones del fabricante.

4. Los tiempos de incubación tienen un margen de $\pm 5\%$.

5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y preferiblemente de un segundo filtro de lectura (620-630nm) para la operación de blanco. Su característica estándar debe ser: a) amplitud de banda $\leq 10 \text{ nm}$; b) intervalo de absorbitividad de 0 a ≈ 2.0 ; c) linealidad ≈ 2.0 ; d) repetibilidad $\approx 1\%$. El blanco está determinado según las instrucciones en la sección "Procedimiento del Ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente según las instrucciones del productor para garantizar las correctas medidas de las densidades ópticas. Este mantenimiento debe de hacerse de forma regular según las instrucciones del fabricante.

6. Cuando se use un sistema automático de ELISA, todos los pasos críticos (dispensación, incubación, lavado, lectura, vortexeo, tratamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección O "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado en cuanto al lavador y al lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse especial atención a evitar el arañazo por las agujas de dispensación y de lavado, para controlar y minimizar la posibilidad de falsos positivos por contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el resto de unidades de sangre cuando el número de muestras a analizar excede las 20-30 unidades por ensayo.

7. Cuando se usen aparatos automáticos, en el caso de que los contenedores para los viales del instrumento no ajusten bien con los viales suministrados en el equipo, se recomienda transferir la solución a contenedores apropiados con la etiqueta del vial original. Este paso es importante para evitar el cambio en el contenido de los viales durante la transferencia. Cuando el ensayo finalice, almacénalos cerrados a 2-8°C.

8. El servicio de atención al cliente de Dia.Pro's ofrece apoyo al usuario para montar y calibrar los equipos usados en combinación con el equipo, permitiendo asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se mantiene el apoyo en la instalación de nuevos instrumentos usados con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del Equipo (envase primario). No use equipos si están caducados.
2. Compruebe que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el Cromógeno/substrato es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de éste con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no hay componentes rotos por el transporte, ni derrames de líquido dentro de la caja. Asegúrese de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está rota o dañada.
3. Diluir todo el volumen de la solución de levado concentrado 20x como se ha descrito anteriormente.
4. Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente usando el vortex.
5. Dejar que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hr) y entonces mezclar suavemente en el vortex todos los reactivos líquidos.
6. Ajustar el incubador de ELISA a 37°C +/- 1°C y preparar el levador de ELISA utilizando la solución de levado diluida, siguiendo las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de levado correctamente de acuerdo a la validación del instrumento para usar el Equipo.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20min antes de hacer la lectura.
8. En caso de trabajar automáticamente, conecte la estación de trabajo y compruebe que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén calibradas para el volumen requerido.
10. Asegúrese de que el resto del equipo a utilizar esté en perfecto estado (disponible y listo para usar).
11. Si hay algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación. Es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

Ensayo automatizado:

Cuando el ensayo se vaya a realizar con el sistema automático ELISA, se recomienda que el instrumento aspire 200µl del diluyente de la muestra y 10µl de la muestra. Dispensar cuidadosamente toda la muestra dentro del pocillo correspondiente. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben ser debidamente lavadas para evitar cualquier contaminación entre muestras. No diluir los controles y el calibrador ya que están listos para usar. Dispensar 200µl de los controles y el calibrador en los pocillos correspondientes.

Nota importante: Controlar visualmente que las muestras han sido diluidas y dispensadas dentro de los pocillos correspondientes. Esto se consigue comprobando que el color de las muestras dispensadas se vuelve verde azul oscuro mientras el control negativo permanece verde oliva.

Para las operaciones siguientes siga las instrucciones que aparecen debajo para el ensayo manual. Se recomienda controlar que el intervalo de tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y se tenga en cuenta en el primer paso de levado.

Ensayo manual:

1. Colocar el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo vacío para el blanco.
2. Dispensar 200µl del control Negativo por triplicado, 200µl del calibrador por duplicado y 200µl del control Positivo. No diluir los controles y el calibrador ya que están listos para usar.
3. Adicionar 200µl del diluyente de la muestra (DILSPE) a todos los pocillos; a continuación dispense 10µl de la muestra en los pocillos correspondientes. Agite suavemente la placa para mezclar la muestra con el diluyente, evitando contaminar los pocillos adyacentes.

Nota importante: Compruebe que cuando se dispense la muestra, el color del diluyente de la muestra cambia de verde claro a verde azul oscuro. De este modo se verifica que la muestra ha sido adicionada.

4. Dispensar 50µl del diluyente de ensayo (DILAS) en los pocillos de los controles, calibrador y muestras. Compruebe que los pocillos de las muestras estén coloreados de azul oscuro.
5. Incubar la microplaca durante 45 min. a 37°C.

Nota importante: Las tiras deben de ser protegidas con la hoja de adhesivo suministrada, cuando el ensayo se hace de forma manual. No cubrir las tiras cuando se usa el sistema automático ELISA.

6. Lavar la microplaca con el levador automático aspirando y dispensando 350µl/pocillo de solución de levado diluida como se describió anteriormente (sección 1.3)
7. Dispensar 100µl del conjugado enzimático en cada pocillo, excepto en A1 y cubrir con la hoja adhesiva. Controlar que este componente de color rojo sea dispensado en todos los pocillos excepto en A1.

Nota importante: Tenga cuidado de no tocar la superficie plástica interna de los pocillos al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

8. Incubar la microplaca durante 45min. a 37°C.
9. Lavar los pocillos como está indicado en el paso 6.
10. Dispensar en cada pocillo 100µl de la mezcla Cromógeno/ Substrato, incluyendo el blanco. Seguidamente incubar la microplaca a temperatura ambiente (18°C-24°C) durante 15 minutos.

Nota importante: No exponer a luz directa intensa podría interferir con los resultados

11. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos, según la misma secuencia efectuada en el paso 10, para detener la reacción enzimática. La adición del ácido provocará un cambio del color en las pruebas y controles positivos de azul en amarillo.
12. Medir la intensidad de color de la solución en todos los pocillos, como es descrito en la sección 1.5. Use un filtro de lectura a 450nm y, si es posible, un filtro a 620-630nm para la sustracción del blanco, efectuada en la pocillo A1.

Notas importantes:

1. Si no se puede utilizar el segundo filtro, asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leerlo a 450nm. Podrían generar falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse justo después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20min. después de su edición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

3. Se ha demostrado que la agitación a 350±150 rpm durante el tiempo de incubación incrementa en un 20% la sensibilidad del ensayo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Controles y Calibrador	200µl
Diluyente muestras (DILSPE)	200µl
Muestras	10µl
Diluyente del ensayo (DILAS)	50µl
Primera Incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Lavado	4-5 ciclos
Conjugado	100 µl
Segunda Incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Lavado	4-5 ciclos
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
Tercera Incubación	15 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
D.O. de Lectura	450nm

t.a.* temperatura ambiente

A continuación se muestra un ejemplo del esquema del ensayo:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	M2											
B	CN	M3											
C	CN	M4											
D	CN	M5											
E	CAL	M6											
F	CAL	M7											
G	CP	M8											
H	M1	M9											

Leyenda: BLK = Blanco CN = Control Negativo M = Muestra
 CAL = Calibrador CP = Control Positivo

O. CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Se llevan a cabo unas pruebas de validación con el control/calibrador cada vez que se usa el Equipo para verificar que los valores expresados en DO a 450 nm, coinciden con los que se recogen en la tabla siguiente:

Parámetro	Exigido
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO 450nm
Control Negativo (CN)	Valor < 0.050 DO 450nm después del blanco
Calibrador	M/Co > 1.1
Control Positivo	Valor > 1.000 DO 450nm

Si los resultados del test coinciden con lo arriba establecido, continúe con la siguiente sección.
En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe que:

Problema	Compruebe que...
Pocillo Blanco > 0.100 DO 450nm	1. la solución cromógeno subterno no se ha contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (CN) > 0.050 DO 450nm después del blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador están validados de acuerdo a los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador se ha purgado antes del uso.

	3. no se han cometido errores en el proceso (dispensar el control positivo en lugar del negativo) 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos con muestras positivas demetadas, o con el conjugado 5. las micropipetas no se han contaminado con las muestras positivas o con el conjugado 6. las agujas del lavador no están parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co > 1.1	1. el proceso ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante la dispensación (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador están validados de acuerdo a los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo > 1.000 DO 450nm	1. el proceso ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante la dispensación (dispensar el control negativo en lugar del positivo). En este caso el control negativo tendrá un valor de DO 450nm > 0.150 también. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador están validados de acuerdo a los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si cualquiera de estos problemas anteriores se mantienen después de las comprobaciones, informe del problema al responsable para tomar otro tipo de medidas.

P. CÁLCULO DEL PUNTO DE CORTE (CUT-OFF)

Los resultados del test son calculados por medio de un valor de corte (cut-off), determinado con la fórmula referida bajo un valor medio de OD450nm del control negativo (NC).

$$\text{Valor de Corte} = \text{NC} + 0.350$$

El valor encontrado por el ensayo se usa para interpretar los resultados como se describe en el siguiente apartado:

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegúrese de que la fórmula usada para el cálculo del valor de corte y para la interpretación de los resultados es la correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante el cociente entre las DO a 450nm de las muestras (M) y el valor de corte (Co), es decir M/Co.

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9- 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por T.cruz o que la unidad de sangre puede ser transfundida. Cualquier paciente que muestre un resultado equívoco debe hacerse una nueva prueba con una segunda muestra de sangre

recoge 1-2 semanas después de la muestra inicial. Esta unidad de sangre no debería ser transfundida. Un resultado positivo es indicativo de infección por *T.cruzi*. Por tanto, el paciente debe ser tratado adecuadamente y la unidad de sangre debe ser descartada.

Notas importantes:

1. La interpretación de resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y malas interpretaciones.
2. Cada resultado positivo debe ser confirmado con un método alternativo para identificar los anticuerpos IgG e IgM (test de confirmación) antes de formular el diagnóstico de infección por *T.cruzi*.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a otro centro, debe prestarse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección de *T.cruzi* debe hacerse y comunicarse al paciente por un médico cualificado.

A continuación se detalla un ejemplo del cálculo a realizar:

Control Negativo(CN): 0.019 - 0.020 - 0.021 DO450nm
 Valor Medio: 0.020 DO450nm
 Menor de 0.050 - Aceptado
 Control Positivo(CP): 2.189 DO450nm
 Mayor de 1.000 - Aceptado

Punto de Corte (Co) = 0.020+0.350 = 0.370

Calibrador: 0.830 - 0.870 DO450nm
 Valor Medio: 0.850 DO 450nm MCo = 2.3
 MCo Mayor de 1.1 - Aceptado

Muestra 1: 0.070 DO450nm
 Muestra 2: 1.890 DO450nm
 Muestra 1 MCo < 0.9 = negativa
 Muestra 2 MCo > 1.1 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS.

1. SENSIBILIDAD:

La sensibilidad del ensayo ha sido calculada con un panel de muestras positivas que lo fueron mediante un equipo de referencia comercialmente disponible.

2. ESPECIFICIDAD:

Ha sido calculada mediante paneles de muestras clasificadas previamente como negativas. El ensayo muestra una especificidad > 99.5% en plasma y suero. No se han detectado diferencias entre suero y plasma en diferentes ensayos. No se han detectado reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos relacionados con transmisión sanguínea. Algunas reacciones falso reactivas se encontraron en muestras muy hemolizadas, lipémicas y con partículas debido a interferencia física en el procedimiento del ensayo.

3. REPRODUCIBILIDAD:

Ha sido calculada con tres muestras en diferentes series. Los valores medios encontrados son los siguientes:
 Negativo: media OD450nm 0.050 media CV 15%
 Positivo bajo: media OD450nm 0.300 media CV 7%
 Positivo: media OD450nm 2.900 media CV 4%

Un ejemplo de estudio de reproducibilidad del ensayo se muestra a continuación:

		Replicas	SERIE #1	SERIE #2	SERIE #3	
muestra N°1	1		0.111	0.105	0.092	
	2		0.098	0.098	0.109	
	3		0.100	0.095	0.095	Valores medios
	promedio		0.103	0.099	0.100	0.101
	STD		0.007	0.005	0.009	0.007
	CV %		6.8	5.2	8.7	6.9
muestra N°2	1		1.058	1.158	1.145	
	2		1.100	1.124	1.128	
	3		1.089	1.108	1.143	Valores medios
	promedio		1.082	1.130	1.138	1.117
	STD		0.022	0.028	0.010	0.019
	CV %		2.0	2.3	0.9	1.7

S. LIMITACIONES

Los falsos positivos repetidos, no confirmados por Western-Blot o técnicas similares, se estimaron como menos del 0.1% de la población normal. Las muestras congeladas que contienen partículas como fibrina o agregados, pueden generar resultados positivos falsos.

P. REFERENCIAS

1. Engvall E. et al. (1971) J.Immunochimistry, 8: 871-874
2. Engvall E. et al. (1971) J.Immunol., 109: 129-135
3. Matsuna Y. Et al. (1992) J.Virol. 3: 1425-1431
4. Valderi D.S. et al. J.Clin.Microbiol. (1992) 8: 552-558
5. Tsubuama-Kohara K. Et al. (1991) Virus Onas 5: 243-254
6. Gillon J. Et al. (1988) 54: 148-153

Prodotto por
 Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.
 via Columella n°31 - Milano - Italy



Anexo 8



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

FORMULARIO DE REPORTE DE RESULTADOS

Nombre del paciente:.....

Médico solicitante:.....

Fecha:.....

MÉTODO DIRECTO (GOTA GRUESA) DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESULTADOS:

POSITIVO	NEGATIVO
Presencia de trypomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	No se observan trypomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>

.....
RESPONSABLE DEL LABORATORIO

Anexo 8



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

FORMULARIO DE REPORTE DE RESULTADOS

Nombre del paciente:.....

Médico solicitante:.....

Fecha:.....

DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESULTADOS:

Positivo

Negativo

.....

RESPONSABLE DEL LABORATORIO

Anexo 9

NOVALAB

LABORATORIO CLÍNICO AUTOMATIZADO

25/03/2013


Lcd. Bladimir Encalada Macas

Responsable del Laboratorio Clínico "NOVALAB"

Certifica:

Que la Srta. Lilia Elizabeth Jiménez Loyola con cédula de identidad 1104959000 estudiante del octavo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, ha realizado con éxito la parte práctica de la tesis bajo su autoría, titulada: "IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA CRUZI EN HABITANTES DEL SECTOR LOURDES DEL CANTÓN PORTOVELO" demostrando responsabilidad y buena ejecución en los procedimientos para la obtención de los resultados. Por tanto doy fe que los resultados derivados de este estudio son fiables.

Es todo en cuanto puedo certificar en honor a la verdad, este documento se expide a favor del interesado para fines que crea conveniente.


Lcd. Bladimir Encalada
1104727167


Lcd. Bladimir Encalada
LABORATORIO CLÍNICO
☎: 0969169227

Dirección: Calle 13 de Noviembre y 24 de Mayo frente al Parque Central
Telf.: 089519445 / 2517 633
Balsas - El Oro - Ecuador

Anexo 10

Realización de charlas y entrega de trípticos



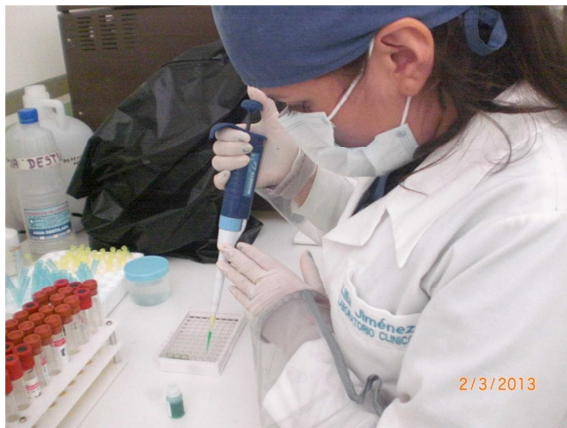
Realización del método directo gota gruesa con la tinción de Giemsa



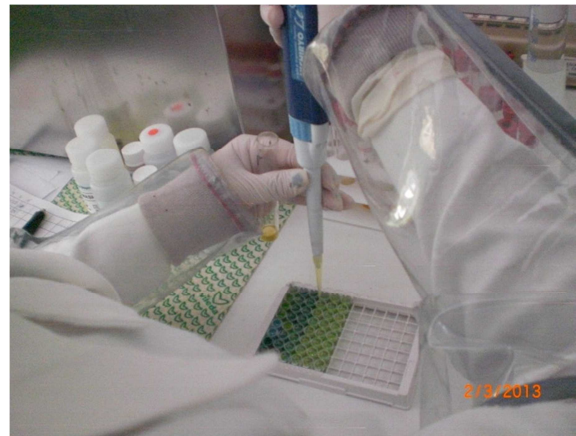
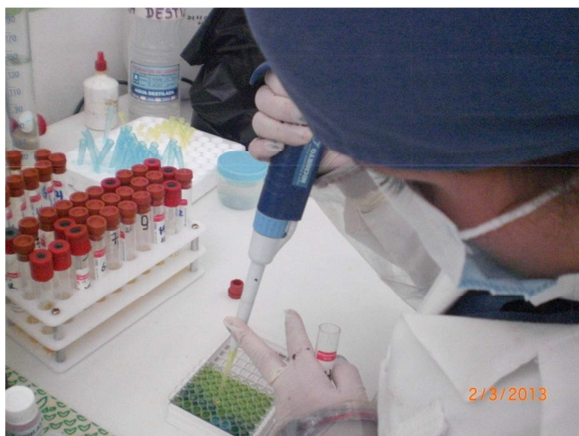
Observación al microscopio



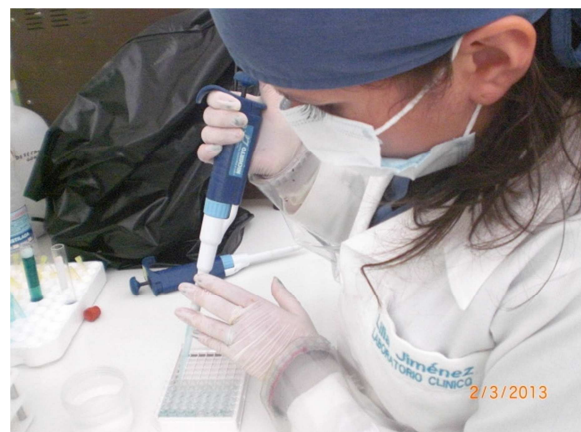
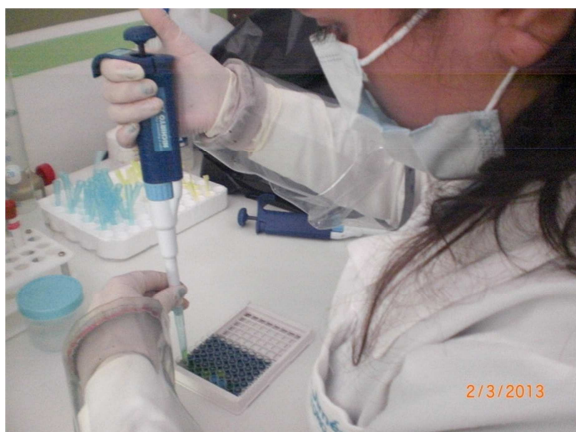
Realización de la técnica de ELISA dilución del reactivo de WASH y pipeteo de los calibradores



Pipeteo de las muestras



Pipeteo de los demás reactivos y lavado



Lectura de las muestras



Entrega de resultados



12. ÍNDICE

CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
1. TÍTULO.....	7
2. RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. REVISIÓN LITERARIA.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6. RESULTADOS.....	41
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES.....	47
9. RECOMENDACIONES.....	48
10. BIBLIOGRAFÍA.....	49
11. ANEXOS.....	53
12. ÍNDICE.....	74