

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
UNIVERSIDAD DE BARCELONA
VICERRECTORADO
CENTRO PSICOPEDAGÓGICO Y DE INVESTIGACIÓN EN
EDUCACIÓN SUPERIOR



CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE *TrypanosomacruziA* PARTIR DE PACIENTES PROCEDENTES DEL PRIMER BROTE ORAL Y LA ASOCIACION DE LA SEROCONVERSION POST- TRATAMIENTO REPORTADO EN EL MUNICIPIO DE GUAYARAMERIN-BENI EL AÑO 2010

Tesis presentada al Programa de Posgrado en Salud Internacional a la Universidad de Barcelona en convenio con la Universidad Mayor de San Andrés para la obtención del grado de Magister en Medicina Tropical y Salud Internacional

MAESTRANTE: TATIANA SILVIA RIOS QUISBERT

**AUSPICIO: AGENCIA ESPAÑOLA DE
COOPERACIÓN INTERNACIONAL PARA
EL DESARROLLO**



**LA PAZ - BOLIVIA
2015**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
UNIVERSIDAD DE BARCELONA
VICERRECTORADO
CENTRO PSICOPEDAGÓGICO Y DE INVESTIGACIÓN EN
EDUCACIÓN SUPERIOR**



**CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS AISLADAS DE
*Trypanosomacruzi*A PARTIR DE PACIENTES PROCEDENTES
DEL PRIMER BROTE ORAL Y LA ASOCIACION DE LA
SEROCONVERSION POST- TRATAMIENTO REPORTADO EN EL
MUNICIPIO DE GUAYARAMERIN-BENI EL AÑO 2010**

Tesis presentada al Programa de Pos graduación en Salud Internacional a la Universidad de Barcelona en convenio con la Universidad Mayor de San Andrés para la obtención del grado de Magister en Medicina Tropical y Salud Internacional

MAESTRANTE: TATIANA SILVIA RIOS QUISBERT

TUTORES:

DR. JOSE SANTALLA

M.Sc. ALESSANDRA QUEIROGA GONCALVES

LA PAZ - BOLIVIA

2015

CARTA DE COMPROMISO PARA CEDER LOS DERECHOS DE PUBLICACIÓN A LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA.

Al presentar esta tesis como uno de los requisitos previos para la obtención del Grado Académico de Magister en Medicina Tropical y Salud Internacional de la Universidad de Barcelona previo convenio con la Universidad Mayor de San Andrés, autorizo al Departamento de Salud Pública de la Universidad de Barcelona o a la Biblioteca de la Universidad, para que se haga de esta tesis un documento disponible para su lectura según las Normas de la Universidad.

Asimismo manifiesto mi acuerdo en que se utilice como material productivo, dentro del Reglamento de Ciencia y Tecnología, (convenio interuniversitario) siempre y cuando esta utilización no suponga ganancia económica, ni potencial.

También cedo a la Universidad de Barcelona los derechos de publicación de esta Tesis o de parte de ella, manteniendo mis derechos de autor, hasta un periodo de 30 meses después de su aprobación

Tatiana Silvia RiosQuisbert

La Paz, Marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

- Quiero expresar un profundo agradecimiento a varias personas por su colaboración durante la realización de esta Tesis, tanto a nivel científico como personal.
- A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo.
- Al Centro Psicopedagógico y de Investigación en Educación Superior.
- Al Dr. Carlos Ascaso Terren y a todo el equipo de trabajo de la Universidad de Barcelona por el apoyo, empeño y esfuerzo en la programación de cada módulo de clases.
- A la coordinación del Programa por todo el apoyo en este proceso de formación académica.
- A los docentes nacionales y extranjeros por las enseñanzas y experiencias compartidas.
- Al Dr. Jose Antonio Santalla. No tengo más que pensamientos y palabras de gratitud y satisfacción. Siempre ha sido justo y honesto, comprensivo, motivador, divertido y paciente.
- A la Dra. Alexandra Gonzalez por su confianza , por conocimientos compartidos e inmensa libertad para trabajar
- A los directivos del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) en general y al Laboratorio de Parasitología por la posibilidad de realizar mi tesis en el instituto.
- A los amigos por todas las inmensas alegrías y por todas las cosas compartidas.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso y Nuestro Señor Jesús por darme vida, salud, paciencia, inteligencia, amor y fe cada día de mi existencia, por ayudarme a alcanzar todas mis metas y propósitos, por guiarme en todo momento y por ser mi luz, mi protección y mi refugio, porque en TI están toda la paz y las bendiciones de mi vida.

A mis queridos papitos Adalid Tito Rios y Silvia Quisbert por ser un regalo de Dios, por todas las veces que no descansaron por darnos lo mejor, por todos los tramos que le he hecho pasar desde que nací, por ser mis amigos, mi apoyo, por darme siempre ejemplo de lucha y amor... Los amo, es un orgullo inmenso ser su hija.

A mis hermanas Janeth y María del Carmen este triunfo también es de ustedes, por ser mis mejores amigas y cómplices de toda la vida, son todo para mí. A mi cuñado Ivan Rojas ... A mi sobrinito Nachito por ser la alegría en nuestra familia.

RESUMEN.

En Octubre de 2010 en el Municipio Guayaramerin-Beni región amazónica de Bolivia se presentó el primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en 14 pacientes, el diagnóstico se realizó por métodos directos e indirectos. La investigación epidemiológica determinó que la infección se originó en el consumo de jugo de majo. Se realizó el aislamiento de 9 cepas de *Trypanosomacruzi* para realizar la genotipificación, se utilizó PCR-SL para la amplificando el espaciador intergénico del gen mini-exon y D71/D72 que amplifican el dominio divergente del gen 24 α -rRNA, además del análisis de secuencia. Se encontró los aislados pertenece DTUsTcIV, esto sugiere la existencia de un nuevo linaje en Bolivia de al menos dos genotipos diferentes que ocurren entre las muestras de personas infectadas por vía oral con *Trypanosomacruzi* en la amazonia de Bolivia.

Además se realizó el seguimiento de la respuesta de los 14 pacientes que fueron tratados con Benznidazol por el tiempo de nueve meses. Se encontró que hasta los 10 meses todos los pacientes presentaron una seroconversión, indicando una respuesta favorable al tratamiento.

El presente trabajo muestra la genotipificación y la respuesta al tratamiento de los pacientes infectados en el primer brote por transmisión oral identificados en una región amazónica de Bolivia.

Palabras clave: *Trypanosomacruzi*, transmisión vía oral, genotipificación DTU TcIV.

SUMMARY.

In October 2010 in the municipality Guayaramerin-Beni Amazon region of Bolivia reported the first outbreak of Chagas disease in 14 patients was presented, the diagnosis is made by direct and indirect methods. The epidemiological investigation determined that the infection originated in the majo juice consumption. Isolation of 9 strains of *Trypanosoma cruzi* was performed for the genitipificacion, SL-PCR was used to amplify the intergenic region of mini-exon gene and D71 / D72 amplifying divergent domain 24 α -rRNA gene analysis also secuencion. Isolates belongs DTUsTclV found, suggesting the existence of a new lineage in Bolivia of at least two different genotypes that occur between samples infected orally with *Trypanosoma cruzi* in the Amazon of Bolivia. Besides monitoring the response of 14 patients who were treated with Benznidazol by time it was conducted nine months. It was found that up to 10 months, all patients had a seroconversion, indicating a favorable response to treatment. The present work shows genotyping and response to treatment of patients infected in the first oral transmission outbreak identified in an Amazonian region of Bolivia.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, transmitted orally, genotipificacion DTU TclV

RESUMEN.

En Octubre de Municipio Guayaramerin-Beni suyu amazónica de /Buliwya Wuliwyariqsichiran riqsichirqan ñiqinhuqñiqin brote reportar unquypa de Chagas hawkakunapi, se ruwarqan por directo método y indirecto. investigación epidemiológica determinar que infección originar consumo de jugo de majo. ruwarqan aislamiento de cepas de Trypanosomacruzi para ruway genitipificacion, utilizar PCR-SL para amplificar espaciador intergénico gen mini-exon y D/D que amplificar dominio divergente gen α -rRNA, de secuencion. tariran/tarirqan sapa pertenecer DTUsTcIV, sugerir existencia de huk/huq musuq linaje en Bolivia/Buliwiya/Buliwya/Wuliwiya/Wuliwya al menos iskay genotipo que ocurrir muestra de runakuna infectar por oral vía con Trypanosomacruzi en amazonia de Bolivia/Buliwiya/Buliwya/Wuliwiya/Wuliwya. ruwaran/ruwarqan seguimiento kutichikuq de hawkakuna que tratay karankichis/karanku/karqankichis/karqanku con Benznidazol pacharayku killakunaq. tariran/tarirqan que hasta killakuna lluy/tukuy/llapa hawkakuna huk/huq y kutichiku tratamiento hawka infectar en huk ñiqin/hukñiqin/huq ñiqin/huqñiqin brote por oral transmisión identificar suyupi amazónica de /Buliwya Wuliwiya.

Palabra: Trypanosomacruzi, transmisión vía oral, genotipificacion DTU TcIV.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en América Latina	2
1.2 La enfermedad de Chagas en Bolivia	3
1.3 El Vector	4
1.4 Distribución geográfica filogeografica del vector	5
1.5 Agente etiológico: Trypanosoma cruzi	6
1.5.1. Clasificación sistemática	6
1.5.2. Ciclo de Vida de T. cruzi	7
1.6. Origen de las unidades de Tipificación Discreta (DTU) y varia- bilidad genética del parasito.	9
1.6.1. Distribución de los 6 UTD	11
1.6.2. Marcadores moleculares de Trypanosoma cruzi	13
1.6.2.1. Mini-exon SSU	16
1.6.2.2. rRNA24S LSU	17
1.7. Vías de transmisión de Trypanosoma cruzi	17
1.7.1 Transmisión Vectorial	17
1.7.2. Transmisión por Transfusión	18
1.7.3. Transmisión Transplacentaria	18
1.7.4. Otras vías alternativas de transmision	18
1.7.4.1. Transmisión por Transfusión o trasplantes de organos	18
1.7.4.2. Transmisión por accidentes de Laboratorio	19
1.8 Transmisión por vía oral	19
1.8.1. Síndrome Clínico de la Enfermedad de Chagas Aguda de Transmisión Oral	20
1.8.2. Brotes de Chagas por Transmision Oral Descritos en America Latina	22
1.8.3. Brote de Chagas Agudo por Transmision oral descritos en Bolivia	24
1.8.3.1 Diagnostico por técnicas directas o parasitológicas	27
1.8.3.2. Diagnostico por técnicas indirectas o serológicos	28
1.8.3.3. Diagnostico por la Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR)	28

1.9 Etapas clásicas de la enfermedad de Chagas	30
1.9.1. Manifestaciones de la Fase aguda	30
1.9.2. Manifestaciones en la Fase crónica	31
1.9.2.1. Forma cardíaca	32
1.9.2.2. Forma digestiva	33
1.10. Diagnóstico de la enfermedad de chagas	33
1.10.1 Pruebas Parasitológicas	34
1.10.1.1 Gota Fresca o Examen en fresco	34
1.10.1.2 Microhematocrito	34
1.10.1.3 Hemocultivo	35
1.10.1.4 Xenodiagnostico	35
1.10.2 Diagnostico Serológico.	35
1.10.2.1 (ELISA) (Enzimed Linked Inmuno Sorbent Assay)	37
1.10.2.2 Hemoaglutinación Indirecta (HAI).	38
1.10.2.3 Técnica de inmunofluorescencia (IF)	38
1.10.3. Diagnóstico Molecular	39
1.10.3.1 Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)	39
1.10.3.2 El ADN de kinetoplasto (ADNk)	40
1.10.3.3 DNA satélite o DNA sat	41
1.11.1 Fármacos	43
1.11.1.2. Nifurtimox	43
1.11.1.3 Benznidazol (BNZ)	44
1.11.2 Indicaciones del tratamiento	44
1.11.2.1. Casos agudos	45
1. 11.2.1.1. Adquiridos	45
1.11.2.1.2. Congénitos	45
1.11.2.1.3. Enfermedad de Chagas accidental	46
1.11.2.1.4. Trasplante de órganos	46
1.12. Reactivación de la enfermedad de Chagas crónica y tratamiento de la enfermedad de Chagas en inmunosuprimidos	47
1.13. Evaluación y seguimiento del tratamiento	47
1.14. Contraindicaciones del tratamiento	48
2. Justificación	49
3. Hipotesis	50

4. Objetivos	51
4.1. Objetivo General.	51
4.2. Objetivo Especifico	51
5.1 Materiales y Metodos	52
5.2 Tipo de estudio.	52
5.2 Lugar de realización de la investigación.	52
5.3 Población de Estudio	52
5.4 Extracción del DNA con Fenol Cloroformo a partir de muestras de sangre	52
5.5 Cultivo de T.cruzi	53
5.6 Caracterización molecular.	53
5.6.1 PCR-SL:	53
5.6.2. PCR-24S α :	54
5.7 Análisis de Secuenciación	54
5.8 Seguimiento pos tratamiento	55
6. Resultados	56
6.1 Genotipificación de T. cruzi por los métodos PCR-SL y PCR-24S α	56
6.1.1 Detección de la sub unidad (SL) mini-exon de T.cruzi	56
6.1.2 Detección de la región intergenica del RNAr24S α de T. cruzi.	57
Figura 10 Analisis INLASA gen RNAr24S α de T. cruzi.	57
6.1 Caracterización molecular mediante Secuenciación	57
6.3 DTU Cepas analizadas.	58
6.4 Seguimiento del pos tratamiento	59
7 Discusion	61
7.1 ANALISIS MOLECULAR DE LA TIPIFICACIÓN DTU DE T. cruzi	62
7.2 SEGUIMIENTO DEL TRATAMIENTO A LOS CATORCE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	64
8. Conclusiones	66
9. Referencia Bibliográfica	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 DISTRIBUCIÓN APROXIMADA DE LA OCURRENCIA DE <i>T.INFESTANS</i>	5
FIGURA 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CICLO DE VIDA DE <i>T.CRUZI</i>	7
FIGURA 3 HIPÓTESIS EVOLUTIVA: ORIGEN DE LAS DTU DE <i>T.CRUZI</i>	11
FIGURA 4 AMPLIA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS DTU	12
FIGURA 5 TRANSMISIÓN ORAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS A HUMANOS	22
FIGURA 6 TRYPANOSOMA CRUZI EN GOTTA GRUESA DE PACIENTE DE GUAYARAMERIN –BENI	28
FIGURA 7 DNA AMPLIFICADO DE TRYPANOSOMA CRUZI A PARTIR DE MUESTRAS DE PACIENTES DE GUAYARAMERÍN-BENI	29
FIGURA 8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LOS CASOS AGUDOS EN GUAYARAMERIN	29
FIGURA 9 ANALISIS INLASA GEN MINI-EXON	56
FIGURA 10 ANALISIS INLASA GEN RNAR24SA DE T. CRUZI.	57
FIGURA 11 ÁRBOL CONSTRUIDO CON 32 SECUENCIAS TCAPX PERTENECIENTES A LOS AISLAMIENTOS DE TCI-TCIV	58
FIGURA 12 DISMINUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS IG G DURANTE EL SEGUIMIENODE PACIENTES HOMBRES	60
FIGURA 13 DISMINUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS IG G DURANTE EL SEGUIMIENODE PACIENTES MUJERES	60

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: CORRESPONDENCIA ENTRE LA NOMENCLATURA MÁS RECIENTE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> VARIANTES GENÉTICAS Y NOMENCLATURAS PREVIAMENTE PUBLICADOS	10
TABLA 2: NUEVA NOMENCLATURA DE <i>T.CRUZI</i>	10
TABLA 3.-DISTRIBUCION DE LAS DTU	13
TABLA 4.- NOMENCLATURA <i>T. CRUZI</i>	14
TABLA 5.-GENOTIFICACION SEGÚN LOS TAMAÑOS DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR	15
TABLA 6.- PACIENTES SEGÚN LA EDAD Y SEXO	25
TABLA 7 SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LOS CASOS AGUDOS EN GUAYARAMERIN	25
TABLA 8 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> AISLADOS DE PACIENTES CON CHAGAS POR TRANSMISIÓN ORAL	59

LISTA DE GRAFICOS

GRAFICA 1 MAPA EPIDEMIOLOGICO DE BROTE	26
GRAFICA 2 DISEÑO DEL ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL BROTE POR TRANSMISIÓN ORAL	27

1. Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una enfermedad zoonótica causada por protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. (1) La enfermedad es endémica en toda América Central y del Sur, según la OPS se estima que 17 millones de personas están infectadas y 75 millones están en riesgo de contraer la infección, con una incidencia de transmisión vectorial de 40.000 casos por año y una tasa superior a 14.000 casos por año de transmisión congénita. (2)(3) Debemos reconocer que la Enfermedad de Chagas continua siendo uno de los graves problemas de la Salud Pública Boliviana, ligada indudablemente a las condiciones de vida de nuestra población en las áreas periféricas de las ciudades y sobre todo las del área rural (4). El Programa Nacional de Chagas del Ministerio de Salud y Deportes hasta la fecha reconoce 6 departamentos endémicos (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Sucre, Potosí y Tarija), por otro lado, el resto del país Beni, Pando y Oruro son catalogados no endémicos, sin embargo se reportó el primer brote de la enfermedad de Chagas en el Municipio de Guayamerin (departamento del Beni) en octubre de 2010 en la región amazónica. La transmisión de *T. cruzi* es compleja en la amazonia por la presencia de una gran diversidad de mamíferos reservorios silvestres y potenciales vectores, lo que lleva a una alta probabilidad de infección, reportes iniciales del brote confirmaron la existencia de la transmisión por vía oral, forma inusual de infección en nuestro medio. (5)(6)

Asimismo *T. cruzi* es monofilético pero genéticamente heterogénea, se ha clasificado al menos seis linajes filogenéticos, denominado “unidades discretas de tipificación” (DTU) (7). Las DTUs son importantes para el diseño de estrategias de tipificación molecular para comprender mejor la distribución y dinámica de esta parasitosis en los entornos naturales. (8)

Estudios geográficos y epidemiológicos mostraron que la distribución de TcI y TcII varían geográficamente, es así el TcI es frecuente en el norte de Brasil, América Central y América del Norte mientras TcII se encuentran predominantemente en los países del cono Sur y América Latina, en Bolivia, la DTU TcII es la más común (9)(10)(11) Los TcIII rara vez causa la enfermedad de Chagas en humanos predomina en el ciclo selvático, TcV predomina en el ciclo doméstico en América del Sur y posiblemente relacionado con la transmisión congénita en Bolivia, Argentina y

Sur de Brasil y TcVI predominan en el ciclo doméstico en el Cono Sur del Sur Latina, donde los pacientes pueden presentar enfermedad aguda grave o con implicación cardiaca crónica y/o digestiva. (12)(13)

A la fecha es poca información disponible sobre *T.cruzi* DTU detectado en los casos orales de la enfermedad de chagas, estudios desarrollados demuestran que los genotipos TcI y Tc IV esta asociados con el consumo de alimentos y se caracterizan ser procedentes de primates silvestres, triatominos y los seres humanos en la amazonia brasileña. Por otra parte, se examino cepas aisladas de pacientes con enfermedad de chagas oral en Santa Catarina-Brasil, encontrando mezclas TcI, TcII TcV. (14) (15).

Además el estudio del análisis de la diversidad genética, permitirá observar la respuesta de los individuos infectados por estas cepas al tratamiento, para poder inferir la relación de la diversidad genética con la patogenie y la resistencia al tratamiento.

1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en América Latina

En América Latina (2007) se estimó que en 15 países afectados con *Trypanosomacruzi*, 8 a 15 millones de personas se encontraban infectadas, con una incidencia de transmisión vectorial de 40.000 casos por año y una tasa superior a 14000 casos por año de transmisión congénita. Estas cifras reflejan aproximadamente 2 millones de mujeres infectadas en edad fértil, casi 30 millones de personas en situación de riesgo en las zonas endémicas y 1,8 millones de personas en situación de riesgo en las zonas endémicas y 1,8 millones de personas con cardiopatía tienen la enfermedad de Chagas. (16)(17)

Teniendo en cuenta la viabilidad del control de la enfermedad de Chagas, varios puntos deben ser discutidos, a saber:

1. La vigilancia permanente de nuevos brotes debidos a la transmisión oral
2. La invasión domiciliario por triatóminos silvestres, debido al comportamiento del vector complejo contexto ecológico.
3. La falta de tratamiento eficaz, inmunoprofilaxis y los marcadores factibles de progresión de la enfermedad.

4. La circulación amplia y continua de *T. cruzi* difundida en ecotopos silvestres en todo el continente americano, mostrando que la eliminación de la transmisión de la enfermedad humana tiene que ser visto en un nuevo contexto, que depende de las características de transmisión locales y la prevalencia .(18)

Estos parámetros epidemiológicos han demostrado que el éxito de las políticas de control de vectores se deben a los esfuerzos de las intervenciones de gran tamaño, como los del Cono Sur, Andes, América Central, México y el Amazonas que han reducido en gran medida la mortalidad y la transmisión de la enfermedad de Chagas (19). En Brasil, por ejemplo el éxito de la lucha antivectorial redujo la incidencia de casos nuevos de 100.000 en 1980 a menos de 500 casos notificados por año desde 2001 hasta 2006. (20)

1.2 La enfermedad de Chagas en Bolivia

Debemos reconocer que la enfermedad de Chagas continua siendo uno de los graves problemas de la Salud Pública Boliviana, ligada indudablemente a tremenda pobreza que sufre nuestra población en las áreas periféricas de las ciudades y sobre todo las del área rural (21) De los países en donde la enfermedad de chagas es endémica, la prevalencia en Bolivia se manifiesta con más fuerza .El programa Nacional de chagas hasta la fecha reconoce 6 departamentos endémicos, no considerando a Beni, Pando y Oruro, sin embargo, luego de un brote de la enfermedad en octubre de 2010 en la región amazónica se confirmó la existencia de la cuarta forma de transmisión, que es por vía oral. (6) La enfermedad de Chagas abarca extensas áreas geográficas entre ellas las más infectadas son los valles andinos y el Chaco. Más de un millón de los nueve millones de habitantes están infectados y cuatro millones corren riesgo de contraerla .(14)

En Bolivia se reconocen diferentes formas de transmisión entre ellas: Las formas de transmisión vectorial 30-50%, congénita 1-7% y transfusional 1-5% Un estudio demostró que en el pueblo de Tarija, sur de Bolivia, la prevalencia de la enfermedad en mujeres embarazadas puede llegar al 33,9% (20). Por otra parte, la prevalencia materna en La Paz, región sin vector fue de 1.4%. (6) Sin embargo la tasa de infección de los vectores triatomíneos en la zona sur de Cochabamba, encontró a un 79%, lo que se traduce en un riesgo de infección muy alta para los niños en esta área. (20) Además, los estudios de seroprevalencia en Santa Cruz en el este de Bolivia, registraron tasas de exposición del parásito seropositivas del 50 % y llegó a

la conclusión de que había un riesgo significativo de infección por transfusión de sangre. (21)(22)

El *Triatoma infestans* comúnmente conocido como vinchuca es el portador de *Trypanosoma cruzi* (Chagas); donde los factores favorables para su reproducción de este insecto, son las altas temperaturas, la pobreza y las condiciones de salubridad. (5)

1.3 El Vector

Es un insecto hemíptero hematófago conocido comúnmente como vinchuca o con otros nombres según los países (pitos, barbeiros, chipos, besadores etc.). Hasta hace poco, solo se conocían focos silvestres e *T. infestans* en los valles interandinos de Cochabamba, lo cual hace suponer que esta región era el centro de origen y la dispersión de la especie. En nuestro país el *T. infestans* constituye el vector más importante de la enfermedad de Chagas, ampliamente conocida en los valles de nuestra región, la segunda especie en importancia de triatomíneos descritos en Bolivia y con un valor vectorial limitado, corresponde a *Triatoma sordida*, que se encuentra también en la vivienda humana. Su presencia ha sido reportada en la zona de los valles, pero con mayor frecuencia en las regiones de los llanos y el chaco. (143)(62)

La distribución del vector o enfermedad, en la región sudamericana se muestra en la siguiente figura:

Figura 1 Distribución aproximada de la ocurrencia de *T. infestans*



Fuente: Shofield et.al., (2010) Fotografiado por James Gathany (Center for disease Control and Preventions)

1.4 Distribución geográfica filogeográfica del vector

En general, cualquiera especie de triatomino (vinchuca) tiene una distribución relativamente limitada; esto es evidente en algunas de las nomenclaturas taxonómicas donde se nombró a un número de especies próximas de la región o el país. Sin embargo existen especies que tienen amplia distribución ,posiblemente debido a su potencial para aclimatarse o adaptarse a una amplia gama de hábitats, porque su nicho ecológico está muy extendido, adaptándose a una variedad de ambiente, lo que aparenta ser uno de los factores que podrían facilitar algunas especies a invadir el ámbito doméstico e iniciar la transmisión de enfermedades (143). Sin duda tres de las especies de vectores más importantes , *Triatoma infestans* , *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, tienen una distribución de varios países. Muchos métodos diferentes se han utilizado para medir la diferenciación de la población del vector, incluyendo los patrones sencillos de la morfometría de la cabeza y la forma del ala, los perfiles de isoenzimas y otras varias otras técnicas moleculares. Potencialmente, el mejor método para medir el flujo de genes y la estructura de la población de vectores son marcadores de microsatelites .Los marcadores han sido desarrolladas para algunos de los principales vectores,

incluyendo *Rhodnius pallescens* (150), por *T. infestans* (45), por *T. dimidiata* (31), por *R. prolixus* (149) y por *Triatoma pседomaculata* (150) con el éxito eminente de control de especies predominantemente nacionales ,como *T. infestans* ,hay una creciente énfasis en la definición del papel que juegan las especies invasoras en la transmisión de la enfermedad de Chagas .La dispersión de triatominos puede ser pasiva o activa, el ejemplo más notable de dispersión pasiva, es la dispersión asociada con los movimientos humanos en la introducción de *T. diminata* de América Central hasta Ecuador; asimismo se ha observado que algunas especies adhieren sus huevos o pequeñas ninfas en la piel o plumas de los huéspedes vertebrados silvestres facilitando su propagación. (24)

La dispersión activa, por vuelo indica que para algunas especies es a causa de la temporada, impulsada por el clima seco y caliente. Otros factores relacionados a esta dispersión, es el hambre, básico factor que inicia la dispersión por vuelo y por varias especies de triatominos. (36)

1.5 Agente etiológico: Trypanosoma cruzi

1.5.1. Clasificación sistemática

La clasificación sistemática de este parásito es la siguiente:

Reino: Protozoa

Phylum: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastida

Orden Tripanosomatida

Género: Trypanosoma

Otros esquemas consideran que el Orden es Kinetoplastida y la familia es Trypanosomatidae. Los Kinetoplastida son flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar, normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto que corresponde a una condensación de DNA localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por todo el cuerpo del parásito. Otras estructuras características de estos organismos son organelas especializadas, tipo peroxisomas, conocidos como

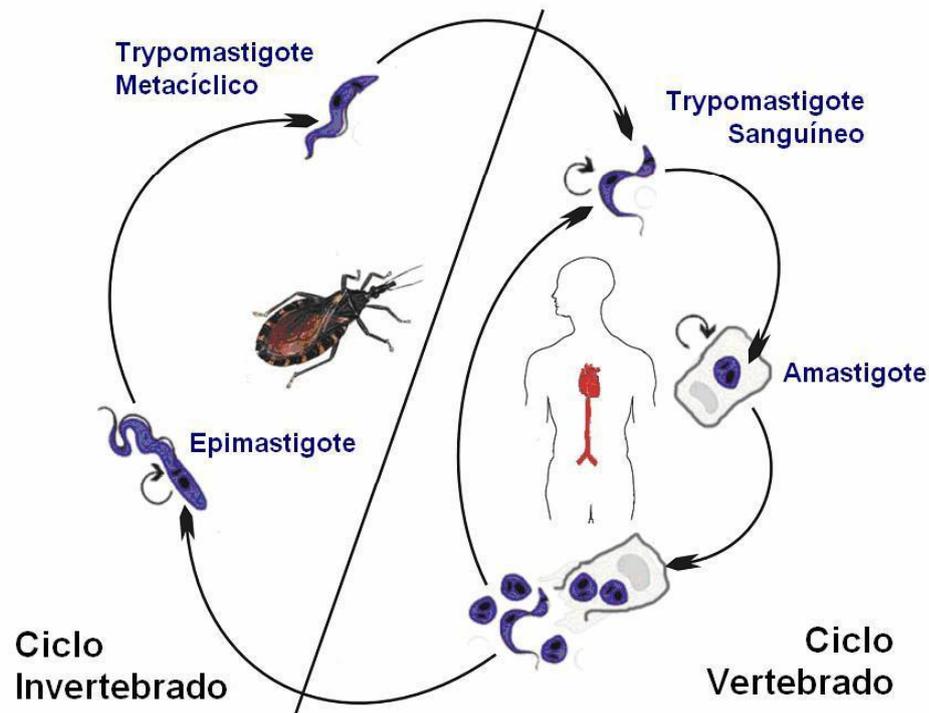
glicosomas y la presencia de microtúbulos subpeliculares. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. gambiensi* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño y en animales, como es el caso de *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*. (25)

1.5.2. Ciclo de Vida de *T. cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y uno vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral), se definen 3 estadios para los tripanosomatideos (Fig. 2):

- **Epimastigote:** (20 - 40 x 2 μm) forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Es también la forma de más fácil cultivo "in vitro".
- **Amastigote:** (2 - 4 μm) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.
- **Tripomastigote:** (20 x 25 μm) forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico), en cultivo de células y en el espacio intracelular del hospedador vertebrado, carece de capacidad replicativa. (25)(26)

Figura 2 Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*



Fuente Chagas disease, Duffy et al., 2010

La infección es transmitida por triatóminos a más de 100 diferentes especies de mamíferos salvajes y domésticos. Los triatómicos son hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, de aproximadamente 6 cm de largo, que se alimentan de sangre durante la noche. Se infectan al picar a un animal infectado, ingiriendo así al parásito (en su estadio de tripanosomas). Dentro del triatómico y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. En el estómago del insecto, los tripanosomas se redondean formando amastigotes, a mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripanosomas metacíclicos. La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripanosomas metacíclicos en sus heces y orinas. Los tripanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoiaciones de la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes procíclicos, los cuales son

liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir otras células, dónde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con tripanosomas circulando.(27)

1.6. Origen de las unidades de Tipificación Discreta (DTU) y variabilidad genética del parásito.

El origen de las unidades de Tipificación Discreta (DTU) no solamente es interesante, sino que es importante para el diseño de estrategias de tipificación molecular. La ubicación temporal y espacial, así como los mecanismos que llevaron a la formación de las distintas DTU definen la actual distribución y composición genómica de cada grupo. Esto determina que tramos génicos son diferenciales entre las DTU, pero suficientemente conservados entre los organismos pertenecientes a una misma DTU, como para ser utilizados para la genotipificación de las poblaciones naturales. *T.cruzi* se caracteriza por ser genéticamente diverso y se clasifica en una serie de cepas o subtipos. Esta diversidad genética se descubrió inicialmente utilizando un panel de marcadores de isoenzimas para investigar las diferencias entre los parásitos que participan en ciclos domésticos y salvajes en el estado de Bahía de Brasil. Estas variantes descritas fueron designadas zimodemas I y II (ZI y ZII), poco después se reveló que (ZI) se encontraba asociada con el ciclo selvático en Brasil, sin embargo (ZII) fue la principal causa de enfermedad en humanos de Venezuela. (28)(29)

Estos hallazgos abrieron la puerta a la investigación de la etiología de la enfermedad de chagas, permitiendo asociaciones huésped-parásito- vector y geografía. Posteriormente, cuatro zimodemas más fueron descritos en Brasil, Paraguay y Bolivia. (Tabla 1)

Tabla 1: Correspondencia entre la nomenclatura más reciente de *Trypanosoma cruzi* variantes genéticas y nomenclaturas previamente publicados

Zingales et al. (2009)	Anonymou s 1999	Miles et al 1978	Tybayrenc et al 1986	Souto et al 1996	Fernandes et al 1998	Brisse et al 2001	Freitas et al 2006	Poblaciones de referencia
<i>T. cruzi I</i>	<i>T. cruzi I</i>	Z1	1-25	Linaje 2	Linaje 2	Linaje I	<i>T. cruzi I</i>	Silvio X10, Colombiana
<i>T. cruzi II</i>	<i>T. cruzi II</i>	Z2	30-34	Linaje 1	Linaje 1	Linaje IIb	<i>T. cruzi II</i>	Esmeraldo, JG,
<i>T. cruzi III</i>	ND	Z3/Z1 ASAT	35-37	ND	Sublinaje 2'	Linaje IIc	<i>T. cruzi III</i>	M5631, M6241
<i>T. cruzi IV</i>	ND	Z3	26-29	ND	Sublinaje 2'	Linaje IIa	ND	CanIII
<i>T. cruzi V</i>	ND	Z2b	38-39	Grupo 1/2	Linaje 1	Linaje II d	Híbrido	MN cl2, SC 43
<i>T. cruzi VI</i>	ND	ND	40-43	Linaje I	Linaje 1	Linaje IIe	Híbrido	CL Brener

.....Fuente: Zingales et al., 2009. Adaptada de Brisse et al 2001

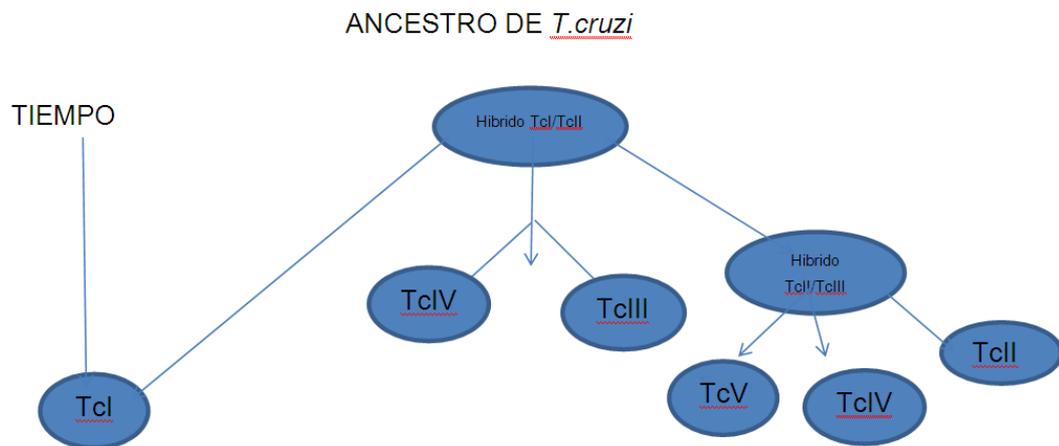
En las siguientes 2 décadas, varios autores procedieron a caracterizar las cepas , en los 10 años que siguió la reunión en la FIOCRUZ (Fundación Oswaldo Cruz) la comunidad científica ha avanzado en el conocimiento de la diversidad de *T. cruzi* que ha revelado seis DTUs distintas "Conjunto de poblaciones que son genéticamente más relacionados entre sí, que cualquier otra población y que son identificables por lo común de los marcadores genéticos ,moleculares o inmunologicos ",la partición en dos subdivisiones principales ,llamado TcI y TcII (Figura 3).Sin embargo para representar la diversidad dentro de TcII se dividió en cinco que fueron llamados TcIIa-e basada en la información filogenética de los marcadores MLEE y RAPD.A la luz de nuevos estudios moleculares, para estandarizar la nomenclatura de *T. cruzi* más recientemente la comunidad de científicos ya ha re designado las seis cepas de[TcI –TcVI].(30)(31)(32). (Tabla 2)

Tabla 2: Nueva nomenclatura de *T. cruzi*

Tibayrenc y col. 2003	TcI	TcIIa	TcIIb	TcIIc	TcIId	TcIIe
Nueva nomenclatura	TcI	TcIV	TcII	TcIII	TcV	TcVI

Nomenclatura de *T. cruzi* (Zingales y col., 2009).

Figura 3 Hipótesis evolutiva: Origen de las DTU de *T. cruzi*



Fuente: Francois N.2010; Sturm & Campbell

El orden de la nueva nomenclatura filogenética indicada mejor la percepción de las relaciones entre cepas: TcI y TcII son consideraciones ancestrales, TcIII y TcIV son semejanzas. Algunos argumentan que representan el resultado de los eventos de hibridación antigua entre TcI y TcII, TcV y TcVI son generalmente aceptados obtenidos de poblaciones parentales entre los híbridos TcII y TcIII, TcI se ha mantenido como un grupo constante de la nomenclatura ya que fue el primero en describirse. Sin embargo, en los últimos años por lo menos cuatro genotipos dentro de TcI han sido identificados. (33) (34) (35) (Fig3).

1.6.1. Distribución de los 6 UTD

Tc I: Es el principal agente etiológico de la enfermedad de Chagas en los países al norte del Amazonas y en el Amazonas. Están fuertemente asociados con el ecotopo arbóreo. Su principal vector en el Amazonas es el *Rhodnius*, mientras que en América del Norte y Central es *Triatoma*. Su reservorio principal son las comadrejas. (36) (37)

Tc II: Es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la región este y central de Brasil (38). Rara vez ha sido aislado del ciclo silvestre y se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico. Su vector principal es el *Pastrongylus*. (39)

Tc III: Al igual que Tc IV es poco común encontrarlo en el ciclo doméstico, ya que está fuertemente asociado al ciclo silvestre terrestre. Sin embargo, en Santiago del Estero, Argentina, ha sido aislado a partir de muestras de sangre periférica de perro

(40).El principal reservorio es la mulita (*Dasyopus novemcinctus*) y los vectores son del género *Pastrongylus* y *Triatoma*. Está asociado al ecotopo terrestre. Geográficamente ha sido asilado desde el norte de América del Sur hasta Argentina (41)

Tc IV: Es endémico en América del Norte junto a Tc I, donde se encuentra asociado al ecotopo terrestre infectando fundamentalmente a mapaches, mientras que Tc I infecta a las comadrejas de las mismas zonas. También se encuentra presente en el Amazonas, aunque aparentemente estas poblaciones serían distintas a las de América del Norte. (42)

Tc V: Este UTD es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la zona conocida como el Gran Chaco, que comprende partes de Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile y el sur de Brasil. Se encuentra asociado casi exclusivamente al ciclo doméstico de la enfermedad y su principal vector es la vinchuca, *Triatoma infestans*. (43)(44)

Tc VI: Al igual que Tc V, se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico en el cono sur de América Latina. Particularmente, en Argentina se lo vio asociado a la infección de perros y gatos. (40)(45)

Figura 4 Amplia distribución geográfica de las DTU



Fuente: Brisse et al., 2000,2004, Zingales et al., 2009

Tabla 3.-Distribucion de las DTU

DTU	CICLO DE TRANSMISION	DISTRIBUCION GEOGRAFICA	PRINCIPALES ASPECTOS CLINICOS
TcI	Predominantemente en ciclo silvestre, poco frecuente en ciclo domestico	Región Amazónica	<ul style="list-style-type: none"> • Por lo general asociado con leve enfermedad de Chagas crónica • Asociados a la transmisión oral y casos agudos severos en Brasil. • Posiblemente asociado con neuro encefalitis en pacientes inmunocomprometidos.
Tc II	Predominantemente en ciclo domestico, poco frecuente en ciclos selváticos	Agente principal en la región del Cono Sur de América del Sur	<ul style="list-style-type: none"> • La causa primaria de la enfermedad de chagas aguda grave y crónica. • Mega esófago y megacolon.
Tc III	Predominantemente en el ciclo selvático, poco frecuente en ciclos domésticos		<ul style="list-style-type: none"> • Rara vez causa la enfermedad de Chagas en humanos
TcIV	Predominantemente en el ciclo selvático, poco frecuente en ciclos domésticos.	Venezuela y la Región Amazónica	<ul style="list-style-type: none"> • DTU poco conocido, pocas cepas han sido aisladas de los seres humanos. • Es posible que asociados con la transmisión oral y casos severos agudos que se encontraron en Brasil.
Tc V	Predominantemente en ciclo doméstico ,poco frecuente en ciclos selváticos	América del sur	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Chagas aguda y crónica • Mega esófago y megacolon en Bolivia. • Posiblemente relacionado con la transmisión congénita en Bolivia, Argentina y sur de Brasil
Tc VI	Predominantemente en el ciclo doméstico, poco frecuente en ciclos selváticos	América del Sur	<ul style="list-style-type: none"> • Posiblemente asociados con enfermedades agudas y crónicas de chagas en la región del Cono Sur.

Fuente: Adaptado a Miles et al.,2009

1.6.2. Marcadores moleculares de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi muestra niveles muy altos de diversidad genética y un gran número de marcadores genéticos han sido utilizados para el diagnóstico para estratificar a la especie en varias subdivisiones. Dependiendo de los marcadores utilizados y la tecnología aplicada se han logrado ensayos con distintos grados de resolución. Las estrategias de tipificación de polimorfismo genético en loci relativamente conservadas son utilizadas para definir las principales subdivisiones genéticas, mientras que el análisis de loci altamente variables, tales como las secuencias de los minicirculos del DNAk o microsatelites, permiten un mayor nivel de resolución. En particular, los microsatelites por ser secuencias que cuentan con solo

dos alelos por genoma, permiten deducir la clonalidad de una población. (46) (47) (48)

Tabla 4.- Nomenclatura *T. cruzi*

Término	Criterio	Nomenclatura						Referencia
UTD	RAPD y MLEE	Tc I	Tc lía	Tc IIb	Tc IIc	Tc IIId	Tc IIe	(Brisse y col., 2000)
Zimodema	MLEE	ZI	ZIII	ZII	ZIII-ASAT I	Heterocigota ZII	Heterocigota ZII	(Miles, 2003)
Clonet	MLEE	1-25	26-29	30-34	35-37	38,39	40-43	(Tibayrenc, 1988)
Linaje	polimorfismos tamaño ADNr	2		1		1/2	1	(Souto y col., 1996)
Linaje	mini-exón	2	2'	1	2'	1	1	(Fernandes y col., 1998a) (Fernandes y col., 1998b)
Grupo	Consenso de expertos	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> *	<i>T. cruzi</i> II	<i>T. cruzi</i> *	<i>T. cruzi</i> *	<i>T. cruzi</i> *	(Anonymous, 1999)
Zimodema	PCR-RFLP del ADNr		ZIII-B		ZIII-A			(Mendonca y col., 2002)
Linajes mayores	Microsatélites, polimorfismo tamaño ADNr, secuencias ADNmt	Tc I		Tc II	Tc III	Tc Híbrido	Tc Híbrido	(de Freitas y col., 2006)

Comparación de esquemas de nomenclatura de *T. cruzi*. Adaptado de Lewis y colaboradores (Lewis y col., 2009). * Grupo indefinido.

Históricamente, el estudio de la diversidad genética de *T. cruzi* se ha visto obstaculizada por la falta de métodos estandarizados de tipificación y por el uso de varias nomenclaturas distintas (Tabla 4).

A los efectos de la epidemiología molecular, un desarrollo conceptual útil ha sido el de la Unidad de Tipificación Discreta (UTD) que tiene valor taxonómico.

Como se mencionó anteriormente, las seis UTD comprenden cepas agrupadas en base a características comunes de genotipos multilocus, cada una con sus características epidemiológicas y evolutivas particulares. (49) (50)

Dos de las estrategias más utilizadas para la genotipificación de *T. cruzi*, son ensayos que tienen como blanco molecular a la secuencia del dominio D7 del gen 24S α ARNr y a la región intergénica no transcripta del mini-exón. Ambas permiten la discriminación de algunos de las diferentes UTD por simple visualización de las diferencias en el tamaño del producto amplificado por PCR. (Tabla 5).

En particular, el dominio D7 del gen 24S α ARNr tiene trectos altamente conservados en todos los tripanosomátidos y se han diseñado oligonucleótidos complementarios a estas regiones. El fragmento amplificado por estos oligonucleótidos es polimórfico y su tamaño varía en algunas especies de tripanosomátidos. (51)(52)(53)

Por otro lado, el espaciador intergénico del mini-exón permite la separación de *T. cruzi* en 4 grandes grupos en concordancia con los eventos de hibridación que llevaron al origen de las 6 UTD. El análisis de este marcador permite la discriminación de las UTD híbridas más antiguas, Tc III y Tc IV, donde por evolución clonal prolongada en cada UTD se han fijado varios polimorfismos que permiten su identificación precisa. Las secuencias del espaciador intergénico del mini-exón de Tc I también contienen polimorfismos originales que permiten su identificación. Por otro lado, el espaciador intergénico del mini-exón permite la separación de *T. cruzi* en 4 grandes grupos en concordancia con los eventos de hibridación que llevaron al origen de las 6 UTD. El análisis de este marcador permite la discriminación de las UTD híbridas más antiguas, Tc III y Tc IV, donde por evolución clonal prolongada en cada UTD se han fijado varios polimorfismos que permiten su identificación precisa. Las secuencias del espaciador intergénico del mini-exón de Tc I también contienen polimorfismos originales que permiten su identificación.

Tabla 5.- Genotificación según los tamaños de productos de amplificación por PCR

Blanco /enzima	Producto de PCR esperado (productos de digestión) (pb)					
	Tc I	Tc IV	Tc II	Tc III	Tc V	Tc VI
Miniexón	350	400 * o ninguno†	300	250 * o ninguno†	300	300
24Sα ADN _r	110	117‡ o 120† o 125‡ o 130•	125	110	110 o 110 + 125**	125
<i>HSP60</i> / <i>EcoRV</i>	432-462 (432-462)	432-462 (432-462)	432-462 (432-462)	432-462 (314+418-118)	432-462 (432-462+314+148-118)	432-462 (432-462+314+148-118)
Histona H1/ <i>AatII</i>	486 (364+122)	486 (486+364+122)	486 (486)	486 (364+122)	486 (486+364+122)	486 (486+364+122)
<i>GPI/HhaI</i>	1,264 (817+447)	1,264 (490+447+253)	1,264 (490+447+253)	1,264 (817+447)	1,264 (817+490+447+253)	1,264 (817+490+447+253)

Genotificación según los tamaños de productos de amplificación por PCR (pb), adaptado de Lewis y colaboradores (Lewis y col., 2009). * Según Yeo y col. 2005. † Según Brisse y col. 2001. ‡ Según Kawashita y colaboradores (Kawashita y col., 2001). ‡ Para la cepa, Saimiri3, según Brisse y col. 2001. • Para las cepas de origen norteamericano, según Brisse y col. 2001. ** Patrón de bandas dobles observado para la mayoría de las muestras.

Sin embargo, el o los eventos de hibridación que dieron lugar a las UTD Tc V y Tc VI ocurrieron, en términos evolutivos, hace relativamente poco y en ambos casos habría/n involucrado a las mismas UTD parentales (Tc II y Tc III) (54)(55). Como consecuencia de este proceso de hibridación, ambas UTD Tc V y Tc VI, incorporaron de manera casi exclusiva secuencias del espaciador intergénico del mini-exón proveniente de la UTD parental Tc II, haciendo imposible la discriminación entre estas tres UTD con este marcador molecular. Puntualmente, la discriminación

entre Tc II y Tc VI ha sido particularmente problemática y no se han podido encontrar marcadores moleculares individuales lo suficientemente sensibles que permitan su tipificación a partir de muestras biológicas.

El polimorfismo del fragmento A-10 fue originalmente descrito por Brisse y colaboradores en un trabajo donde identifican fragmentos amplificados diferencialmente en las distintas UTD por la técnica de RAPD, que utiliza pequeños oligonucleótidos con secuencias al azar. El fragmento A-10 se secuenció ya que era amplificado en todas las cepas menos en el Tc II. Dada la inexistencia en aquel momento de un marcador molecular para diferenciar a las UTD Tc II y TC VI, se propusieron los oligonucleótidos P3 y P6, complementarios al fragmento A-10, que generaban un amplicón de 625 pb en las cepas Tc VI, pero no en las Tc II. El fragmento A-10 es una secuencia repetitiva de bajo número de copias, polimórfica, no codificante.

Ante las limitaciones en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se han utilizado técnicas moleculares, siendo la más utilizada la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), basada en la amplificación de diferentes dianas. Entre los protocolos de PCR más de ADNsatélite de *T. cruzi*. (56) (57)

Estas PCRs tienen gran sensibilidad y especificidad, ya que se basan en la amplificación de secuencias repetitivas y específicas del ADN del parásito.

1.6.2.1. Mini-exon SSU

El RNAm de los tripanosomas es único en la mayoría, todas las transcripciones, tienen un idéntico splicer líder (SL) en 5 u-terminal de 35 pb. Esta SL se codifica en bloques de unidades repetidas en tandem, genes mini-exon (ME). La alineación comparativa de ME de diferentes cepas de *T. cruzi* muestra la presencia de secuencias altamente conservadas regiones de 39pb (los exones), regiones similares de 73 pb con identidad de más de 98% (correspondientes a los intrones, ITS y regiones intergenicas o divergentes (menos del 59% de similitud. Las cepas que originaron un producto de 300 pb, fueron designadas como pertenecientes al grupo 2. Posterior análisis de secuencias de MEZ3 cepas indicaron la presencia de un tercer grupo, ahora caracterizado por una detección de aproximadamente 50pb en la

región espaciadora no transcrita del ME. Por lo tanto, nuevos conjuntos de primers fueron diseñados para amplificar el Z3 cepas. (58)(59).

1.6.2.2. rRNA24S LSU

El citron ADNr está compuesto de secuencias repetidas en el que las regiones codificantes del SSU y LSU están separados por dos espaciadores internos transcritos (ITS). ITS 1 separa la región codificante de la subunidad 18S y 5.8S del DNAr y ITS2 separa la secuencia de DNAr 5,8S del ADNr 24S α de *T.cruzi* entre otros tripanosomatidos mostro alta homología, a excepción de regiones discretas.

El dominio más divergentes (D7) es un segmento de aproximadamente 100pb situado en el extremo 3 del gen de *T.cruzi*. Inicialmente, la amplificación por PCR de una secuencia del dominio D7 revelo un dimorfismo y tres diferentes grupos o linajes de cepas de *T.cruzi* fueron detectados. Las cepas del linaje 1 dio productos de 125pb y las cepas del linaje 2 dio productos de 110 pb. Más tarde, con nuevas metodologías de análisis y más sensibles, también fueron identificados otros grupos de cepas relacionados con la actual nomenclatura, para mejor caracterización de *T.cruzi*. Es el caso de TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, todo viendo la combinación de primers. (60)

1.7. Vías de transmisión de Trypanosoma cruzi

La transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos puede producirse de varias maneras:

1.7.1 Transmisión Vectorial

Existen alrededor de 137 especies reportadas, agrupadas en 6 tribus y 17 géneros, de los cuales solo los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* son los responsables de la transmisión vectorial de estos parásitos . Las especies predominantes de vectores varían entre los diferentes países, es así como en Colombia y Venezuela, por ejemplo predomina el *Rhodniusprolixus* y *Triatoma dimidiata*, mientras que en Brasil, Argentina, Perú, Bolivia, Uruguay. Guatemala y Chile, predomina la especie *T. infestans*.

La mayoría de estos insectos se distribuyen en el área silvestre encontrándose asociados con una variedad de hospederos vertebrados, como son mamíferos que tienen hábitats aéreos y también algunas aves, y terrestres como los armadillos.

Además, se encuentran en áreas peridomésticas como las palmas, gallineros y corrales. En el caso de algunas especies como *R. prolixus* y *T. infestans* se han domiciliado en viviendas en donde encuentran condiciones apropiadas, tales como techo de palma y paredes de bahareque. (61)(62)

1.7.2. Transmisión por Transfusión

Esta es la segunda forma de transmisión de *T. cruzi* más importante. El parásito puede sobrevivir hasta dos meses en las unidades de sangre refrigeradas, lo que significa un gran riesgo para las personas receptoras de este material durante una transfusión. Desde 1995 en Colombia a nivel de bancos de sangre se realiza el tamizaje obligatorio de donantes mediante pruebas serológicas, lo que ha disminuido sensiblemente la transmisión de la infección por esta vía. (63)

1.7.3. Transmisión Transplacentaria

T. cruzi puede ser transmitido de la madre infectada al feto in útero a través de la placenta. La infección intrauterina puede ocurrir tanto en la etapa aguda como en la crónica de la infección materna y afectar embarazos sucesivos y gemelares.

Sin embargo, no todas las madres embarazadas infectadas transmiten la enfermedad. Los recién nacidos infectados en su gran mayoría son asintomáticos y un pequeño porcentaje son sintomáticos presentando manifestaciones clínicas características del síndrome de TORCHS, tales como prematuridad, bajo peso para la edad gestacional, hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, anemia, fiebre y edemas. En algunos casos los cuadros pueden ser graves, incluso mortales.

Esta vía de transmisión ha adquirido creciente importancia en los últimos años en donde la incidencia en los países del Cono Sur oscila entre 1 y 10% en diferentes zonas geográficas. (64)(65)

1.7.4. Otras vías alternativas de transmisión

1.7.4.1. Transmisión por Transfusión o trasplantes de órganos

Los receptores de trasplantes pueden recibir órganos de donantes infectado con *T. cruzi* por lo cual deben recibir tratamiento específico y seguimiento durante todo el tiempo de inmunosupresión al que se ven sometidos. Por otra parte, en los pacientes chagásicos crónicos debido a que el daño originado en el tejido en esta

fase de la enfermedad es irreversible, el trasplante de corazón reviste una opción importante para estos pacientes. Sin embargo, los individuos corren un alto riesgo de reactivación de la enfermedad debido al estado de inmunosupresión inducida para tal procedimiento. Post-trasplante se debe realizar un adecuado seguimiento de los pacientes que permita detectar una posible reactivación de manera temprana y así poder administrar el tratamiento adecuado. (66)

1.7.4.2. Transmisión por accidentes de Laboratorio

Esto ocurre en laboratorios o hospitales, por el manejo inadecuado del material biológico contaminado por parte de los investigadores o del personal colaborador o auxiliares que no acata medidas de bioseguridad en el laboratorio. Por ejemplo: manejo de triatominos, cultivos animales de experimentación infectados, manejo de sangre de pacientes etc. Por lo menos 60 de estos casos se han reportado, por lo que esta enfermedad debe ser considerada una de las enfermedades parasitarias de transmisión en el laboratorio más importantes, con un riesgo mayor con respecto a las enfermedades infecciosas, incluyendo las infecciones virales y bacterianas.(67)

1.8 Transmisión por vía oral

Se produce por ingestión de alimentos contaminados con parásitos de triatominos infectados o, en ocasiones, por las secreciones de las glándulas de olor de los marsupiales (*Didelphys sp*: zarigüeya o mofeta). Se reconoce que en el ciclo selvático, la transmisión oral seguirá siendo la forma regular y más frecuente que garantiza la prevalencia de la infección en los reservorios silvestres. En el caso del hombre, esta transmisión se produce de modo circunstancial, a través de alimentos contaminados con el parásito, principalmente de insectos o de sus deyecciones. Además, puede ocurrir a través de la ingestión de alimentos crudos o poco cocidos, o alimentos contaminados con orina, con secreciones anales de los marsupiales infectados o por accidentes en el laboratorio e incluso por los hábitos primitivos de comer insectos. (68)

Las heces de triatominos pueden permanecer infectantes en un entorno con alta humedad durante pocas horas, por lo que pueden contaminar los alimentos y patas y piezas bucales de los transportistas secundarios, tales como moscas y cucarachas. (68)(69)

La evidencia experimental disponible, hasta ahora sugiere que la transmisión por vía oral puede ocurrir por tripomastigotes, epimastigotes, y probablemente amastigotes y masas de células, procedentes de mamíferos y vectores infectados con el parásito. Los brotes producidos a través de la vía oral, generalmente coinciden con épocas de calor, de mayor actividad de los triatomíneos (mayor movilidad de vectores, mayor hematofagia, mayor contaminación del ambiente con heces infectadas, y también mayor producción de casos agudos por la vía vectorial clásica. El tiempo de incubación por esta vía varía entre 3 - 22 días. (70)

1.8.1. Síndrome Clínico de la Enfermedad de Chagas Aguda de Transmisión Oral

En el caso de transmisión oral, los brotes estudiados indican el curso clínico más severo de la enfermedad en los cuales se presentan: erupción cutánea, sangrado gastrointestinal, ictericia, aumento de las aminotransferasas, cuadros más frecuentes y más graves de insuficiencia cardíaca. El edema, la hepatoesplenomegalia y la linfadenopatía son comunes en las formas de transmisión vectorial y oral. La mortalidad es mayor en la transmisión oral que la observada en los casos agudos de la transmisión vectorial. (70) (71)

Las evidencias experimentales disponibles hasta la fecha sugieren que la transmisión oral puede ocurrir a partir de formas tripomastigotes, epimastigotes y, probablemente, de amastigotes y masas celulares, originarias de mamíferos o vectores contaminados, así como, accidentalmente, de cultivos artificiales del parásito. Dependiendo del dominio de los grandes grupos o linajes del *T. cruzi*, que en el último consenso del comité de expertos realizado en Brasil 2009, se definió como 6 Discrete Typing Units DTU(s), de la 1 a la 6.

Conforme evidencias experimentales, indudablemente hay diversidad de patogenicidad, histiotropismo y morbimortalidad, conforme al inoculo y a la cepa transmitida. La sintomatología genérica e inespecífica que involucra fiebre, postración, diarrea, vómitos, anorexia, cefalea y mialgias es descrita en la mayoría de los casos aparentes. (72)(73)(74)

Los sistemas más intensamente afectados son el cardiovascular el digestivo y el neurológico. Las manifestaciones clínicas subyacentes serán consecuencias de la

afección de tales sistemas. Los niños menores frecuentemente presentan irritación, con llanto fácil y copioso, frecuentemente son observados síntomas de miocardiopatía aguda de variable intensidad. Sin embargo, de forma menos frecuente, se han diagnosticado algunos casos de Enfermedad Chagásica Aguda por transmisión oral que se encontraban con menos de siete días de evolución del síndrome febril, y se han observado casos con presencia de manifestaciones digestivas de mayor gravedad, como epigastralgia, ictericia, eventos hemorrágicos (hematemesis, hematoquezia o melena) y otros tipos de señales hemorrágicas concomitantes. Los cuadros clínicos graves pueden cursar con meningo encefalitis, especialmente en lactantes o en casos de reactivación (inmunodeprimidos).
(73)(74)(75)(76)

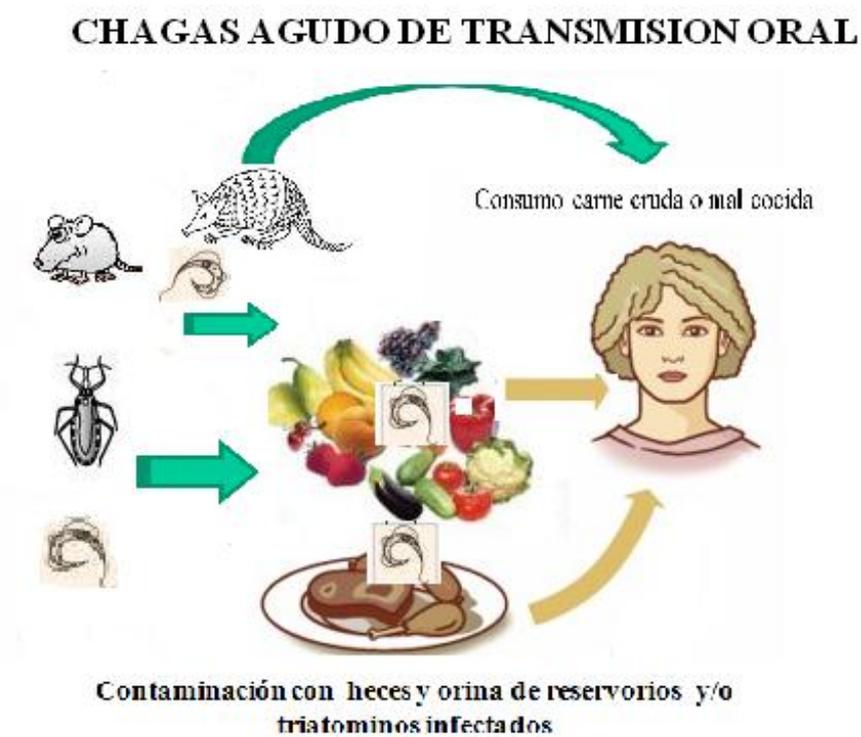
Los factores de riesgo implicados en la transmisión por la vía oral de infección humana son:

INMEDIATO: por consumo de alimentos "*in natura*"

MEDIATOS: (contaminación de alimentos)

- en su origen
- por almacenamiento
- transporte inadecuado
- en el procesamiento y/o preparación

Figura 5 Transmisión oral de enfermedad de Chagas a humanos



La transmisión podrá darse:

- i) por la ingesta de los insectos infectados, en la hipótesis de que sean procesados junto con el alimento (como observado en episodios investigados en que se atribuyó la infección al consumo de "açai"(77)
- ii) por heces de los insectos (en la preparación o consumo de los alimentos).
- iii) por la alimentación con animales que estén infectados, sin una suficiente cocción, o de su sangre se ha reportado que en Colombia es frecuente la ingestión de sangre de armadillos y zarigüeyas, que tendrían función terapéutica según creencia de algunos grupos indígenas en la Amazonía.
- iv) a través del consumo de alimentos contaminados por la secreción de reservorios. (70)

1.8.2. Brotes de Chagas por Transmisión Oral Descritos en América Latina

Existen varias publicaciones en América latina explicando la posibilidad de contaminación accidental del *T. cruzi* en alimentos, donde diversos trabajos ratifican la viabilidad de la transmisión por la vía oral. De estas publicaciones de brotes de la

enfermedad de Chagas, se consideran los más importantes los descritos en Venezuela, Brasil y Colombia.

En 2007 se produjo un brote de Chagas agudo por transmisión de oral del *Trypanosoma cruzi* en una escuela en Caracas, posiblemente a través de la contaminación de un refresco por las heces del vector, se realizó un estudio caso-control, anidado por cohorte que determinó el estudio epidemiológico, concluyendo que fue un brote de Chagas agudo transmitido de manera oral, con la infección confirmada en 103 de 1000 individuos expuestos. De esos infectados, 75 % fueron sintomáticos, 20.3% requirieron hospitalización, 59 % mostró anomalías del electrocardiograma, la parasitemia estaba documentada en 44 niños y 1 niño muerto. La investigación epidemiológica determinó la contaminación de jugo de guayaba como la fuente de infección.

Durante los años 60 y 70, investigaciones realizadas por diferentes grupos en Argentina, Brasil, Costa Rica y Venezuela proporcionaron mayor información sobre el ciclo selvático del *T. cruzi*, demostrando que la transmisión oral del parásito es la vía habitual y eficaz entre los reservorios silvestres. Se describieron brotes de probable transmisión oral humana en episodios bien conocidos en Teutônia (Río Grande do Sul, Brasil), en Belém (Pará, Brasil), en Jalisco (México) y en Catolé do Rocha (Paraíba, Brasil), y más recientemente en Santa Catarina (2005), con varios casos agudos infectados por alimentos contaminados a partir del vector y posiblemente de orina de marsupiales. (78)(79)(80).

En Brasil, en relación al contexto epidemiológico, los eventos de enfermedad de Chagas por transmisión oral, descritos en la región amazónica se relacionaron con la ingesta de jugo de caña de azúcar y jugo de acaí. Otras descripciones mencionan casos de personas que enfermaron después de haber consumido carne de animales silvestres mal cocidas.

Otros autores en América del Sur revelan la posibilidad de contaminación accidental de alimentos con *T. cruzi*, además de la demostración de los largos períodos de sobrevivencia del parásito en triatominos. (81)(82)(83)

El grupo de Carpintero y colaboradores en 1978 sugirieron la transmisión oral, cuando en un grupo de mil casos de enfermedad de Chagas, aproximadamente un

centenar de pacientes referían no conocer los triatominos, carecían de antecedentes de transfusiones pero afirmaban ingerir de manera frecuente carne de animales silvestres reservorios de *T. cruzi*, conforme a los hábitos regionales.

En los años 90 la transmisión oral a partir de jugo de pequeños cocos de palmeras infestadas con *Rhodnius sp*, fue detectada por Valente en el Norte de Brasil. También en ciertas regiones, especialmente entre poblaciones nativas cazadoras y/o acostumbradas a la alimentación con carne cruda (armadillos, monos y cobayos silvestres), se admitió la posibilidad de contaminación vía oral, aunque no se conocieran los registros de esto en la literatura. Otros trabajos realizados por el equipo de Storino & Jorg ratificaron la viabilidad de *T. cruzi* por vía oral utilizando diferentes hospederos y vectores. (80)(85)

En Ecuador, grupos de trabajo como el de Amunarriz y colaboradores, relataron que estudios serológicos realizados, en más de mil nativos quechuas de la amazonia ecuatoriana (provincia de Sucumbios), registraron un índice de infección de 6.03%. El autor afirmó que este índice podría ser el resultado de una transmisión vectorial, pero mencionó la posible transmisión por vía oral a partir de la ingestión de carne de animales silvestres, como una de las principales fuentes de alimentación implicada en los focos de la enfermedad entre la población indígena de la amazonia ecuatoriana.

Adicionalmente Jansen y colaboradores, reportaron la existencia de un ciclo particular del parásito en las glándulas anales de marsupiales brasileiros, lo que también posibilita la contaminación directa de personas, alimentos y otros animales susceptibles, a partir de la eliminación de estas secreciones en el medio externo. (86)(87)

1.8.3. Brote de Chagas Agudo por Transmision oral descritos en Bolivia

El municipio de Guayaramerin es una región endémica de las infecciones por Malaria entre otras. Sin embargo, en el mes de Octubre del 2010 el Centro de Salud San Miguel recibe a catorce pacientes entre las edades de 6 a 62 años de edad, de los cuales 7 pertenecen al género masculino y el resto al femenino (1:1), ver (Tabla 6), con una sintomatología parecida a la enfermedad de Malaria (Tabla 7), pero estos casos presentaron fiebre, poco frecuente en pacientes con Malaria, en el

laboratorio indican el personal que se observaron estructuras morfológicas extrañas en muestra de sangre periférica. En este sentido, el personal del Centro de Salud remitió 14 extendidos y muestras de sangre al laboratorio de Parasitología del INLASA en la ciudad de La Paz, para confirmar el diagnóstico. (6)

Tabla 6.- Pacientes Según la edad y sexo

Edad	Hombre	Mujeres
≤ 10	0	1
11-20	2	0
21-30	0	3
31-41	0	2
42-50	1	0
≥51	4	1
Total	7	7

Fuente: INLASA José Santalla et al.2010

Tabla 7 Signos y Síntomas de los casos agudos en Guayaramerin

Signos y Síntomas clínicos	N° de pacientes (%)
Fiebre >38° C	14 (100)
Cefalea	13 (92)
Diarrea	7 (50)
Vómitos	12 (85)
Esplenomegalia	1 (7.1)
Linfocitosis	10 (71)
Transaminasa ↑	11 (78)
Bilirrubinas ↑	11 (78)

Fuente: INLASA José Santalla et al.,2010

Las muestras recibidas en el laboratorio se analizan e indica la presencia de *Trypanosoma cruzi*, considerándose el primer brote de la enfermedad de Chagas en la región, se llevó acabo adelante una misión de investigación del brote con características epidemiológicas, entomológicas y parasitológicas en el lugar. Se realizó tamizaje serológico en la población de sospecha. Se buscó a todos los casos confirmados para recopilar información clínica y las variables comunes para determinar el origen del brote. (6)(135)

Para el diseño epidemiológico del brote fue analizado el lugar donde residen los casos encontrando una distribución muy distante entre familias (Gráfico N°1), la familia A se encuentra en una zona periurbana de la ciudad con características de monte y cosecha la fruta de Majo para la producción y venta de jugo de la mencionada fruta. Las familias B, C y D consumen el jugo de Majo proveniente de la familia A y la familia E consumen el jugo pero también lo producen a partir de un área colindante con la de la familia A con características de monte. Podemos observar que la distribución del jugo de Majo no fue solo por venta si no que ocurrió sin que exista contacto directo como ocurre entre la familia A y C porque si bien la familia A produce el jugo no le vende directamente a la familia C, esta familia lo adquiere por una invitación de la familia B que si le compro el jugo a la familia A (Gráfico N°2).

Gráfica 1 Mapa Epidemiológico de Brote

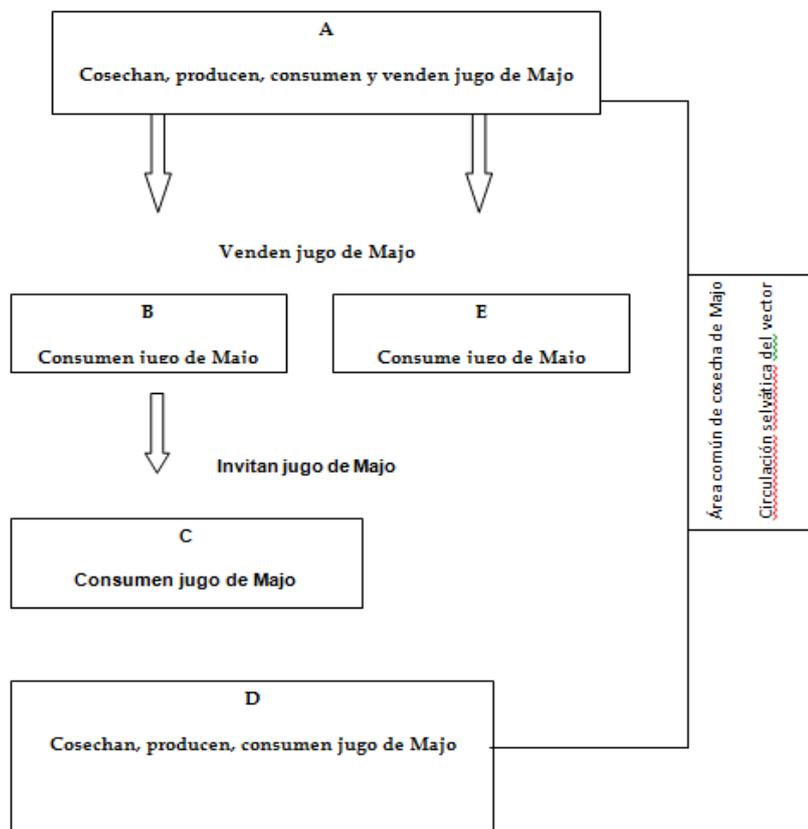


Fuente: INLASA José Santalla et al., 2010

Estos hechos de distribución del jugo marcan el camino recorrido del *Trypanosoma cruzi* para conseguir infectar a las familias y producir un brote epidemiológico de chagas.

Mediante el estudio del brote se pudo evidenciar: transmisión de la Enfermedad de Chagas fue por vía oral a partir de un jugo local producido a partir de la fruta del árbol de majo, característico de la región amazónica.

Grafica 2 Diseño del origen y distribución del brote por transmisión oral

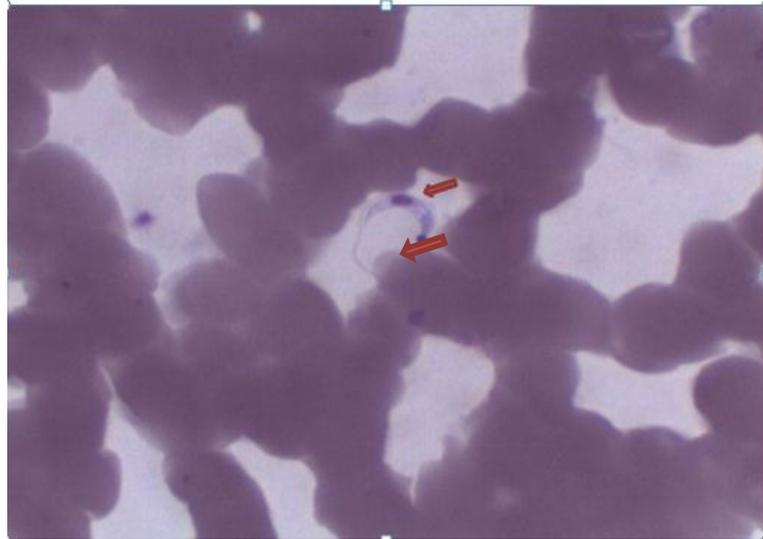


Fuente: INLASA José Santalla et al., 2010.

1.8.3.1 Diagnóstico por técnicas directas o parasitológicas

En las 14 muestras se observó presencia de formas tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* mediante técnicas directas (gota gruesa, frotis y microhematocrito variedad INLASA) a partir de sangre venosa con EDTA (Figura N°6). Además se pudo aislar el parásito en cultivo de 9 de 14 muestras y a partir de ello poder realizar otros métodos de biología molecular (Figura 1).

Figura 6 Trypanosoma cruzi en gota gruesa de paciente de Guayaramerin – Beni



Fuente: INLASA José Santalla et al.,2010

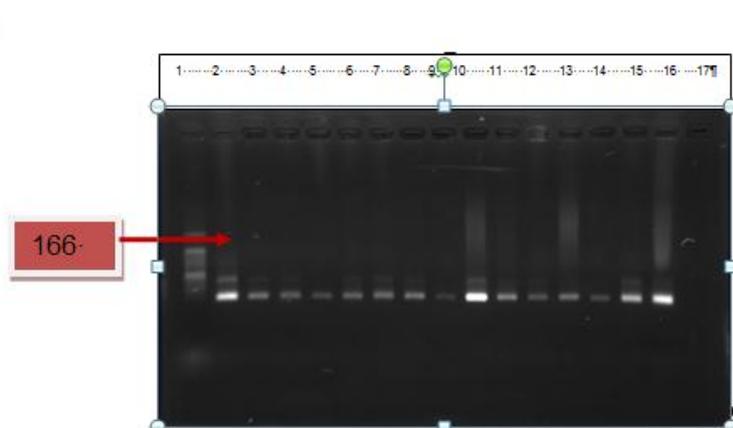
1.8.3.2. Diagnostico por técnicas indirectas o serológicas

Además los 14 casos fueron confirmados mediante pruebas indirectas de diagnóstico conforme a las recomendaciones de la OMS y al protocolo de vigilancia de Chagas. Se utilizaron inicialmente dos pruebas serológicas a partir de plasma sanguíneo, ELISA recombinante y Hemoaglutinación indirecta (HAI), donde se observó que seis pacientes presentaban elevados títulos de anticuerpos, serología reactiva, indicando el inicio de la fase crónica de la enfermedad, en contraste a nueve pacientes por estar en fase aguda de la infección los análisis fueron negativos (Tabla 8)

1.8.3.3. Diagnostico por la Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR)

Se empleó PCR convencional, para la detección secuencias repetitivas satélite para T. cruzi, según el protocolo descrito por Levin M (2009), con modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio. La extracción de DNA a partir de sangre periférica se encontró que en las 14 muestras se amplificó un fragmento de 166 pb (Figura 7), lo que confirma la presencia del parásito en las muestras.

Figura 7 DNA amplificado de Trypanosoma cruzi a partir de muestras de pacientes de Guayaramerín-Beni



Productos de amplificación de la PCR para la detección de DNA sat de *T. cruzi* en muestras de suero y sangre de pacientes (Carriles 3-16), C(+)-Control Positivo (carril 2), C(-)-Control Negativo (carril 17) y (L) Ladder (carril 1) marcador de tamaño de DNA 100pb (Promega)

Fuente: INLASA José Santalla et al.,2010

Figura 8 Métodos de Diagnóstico de los casos Agudos en Guayaramerín

Métodos de Diagnóstico	Nº de Casos Positivos (%)
Gota Gruesa	14 (100)
Micrihematocrito variedad INLASA	14 (100)
Cultivo	9 (64)
PCR Sat	14 (100)
ELISA	6 (42)
HAI	9 (64)

Fuente: José Santalla et al., 2010

Esto corrobora que la infección sufrida fue por el consumo del jugo de Majo y probablemente la ingesta de formas infectivas de *T. cruzi* , Por otro lado, en la comunidad de San Miguel no se comprobó la presencia de que tipo de triatomino hay en el lugar de estudio, además de la presencia ocasional de ratas cerca de los sitios donde habitan y tienen árboles de este fruto (11), lo cual podría establecer otra ruta de infección del parásito, además de la diseminación de la enfermedad a todo el municipio y otros lugares aledaños, por lo tanto se debería realizar las intervenciones apropiadas en el lugar para que no existan nuevos casos de esta enfermedad.

1.9 Etapas clásicas de la enfermedad de Chagas

En la evolución natural de la enfermedad de Chagas se distinguen dos fases con presentaciones clínicas, criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes. La enfermedad se inicia con una fase aguda caracterizada por síndrome febril infeccioso y parasitemia. En los casos agudos no tratados, la enfermedad progresa hacia la fase crónica, donde un porcentaje grande de personas permanecen asintomáticos (aproximadamente 70%) y sin compromiso clínico (la llamada forma “indeterminada”), pero un grupo desarrolla después de un periodo, que puede ir de 10 – 30 años, lesiones irreversibles, especialmente cardiacas.

1.9.1. Manifestaciones de la Fase aguda

En la fase aguda (inicial) predomina el parásito circulante en la corriente sanguínea en cantidades expresivas. Las manifestaciones de enfermedad febril pueden persistir por hasta 12 semanas. En este periodo los signos y síntomas pueden desaparecer espontáneamente de forma que la enfermedad evolucionará hacia la fase crónica o puede progresar para formas agudas graves con riesgo de llevar a la muerte.

El periodo de incubación es de duración variable, con un término medio de una semana. Una vez terminado este, se inicia un cuadro clínico caracterizado por la presencia del parásito en la sangre acompañada de un síndrome febril y otras manifestaciones clínicas; signos inespecíficos de cualquier otra causa de síndrome febril agudo. Este cuadro clínico puede pasar inadvertido, diagnosticándose solo en el 1 o 2% de todos los pacientes (28-30). Esta fase aguda de la enfermedad puede presentarse a cualquier edad, teniendo la enfermedad peor pronóstico si la infección aguda se presenta en niños menores de dos años (89).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes encontradas en poblaciones similares a la nuestra incluyen , síndrome febril 84,7%, mialgia (50%), cefaleas (47,5%), signo de Romana (edema bipalpebral, unilateral con adenopatía preauricular) (45,8%), signos de falla cardíaca (17%) con 100% de miocarditis aguda en las biopsias endomiocárdicas, hepatomegalia (8,5%), edema (3,4%) y chagoma (induración en el sitio de la piel por donde ocurrió la entrada del parásito) (1,7%). Los patrones sintomáticos más frecuentes son fiebre, mialgia, cefalea y signo de Romana (20,2%), fiebre, mialgia y cefaleas (11,9%), y solo fiebre (11,9%). En los casos

debidos a transmisión oral no se presenta signo de entrada (signo Romaña o Chagoma de inoculación) y en las series de Brasil, donde más casos por este tipo de transmisión se han documentado se destaca la fiebre prolongada como el síntoma más frecuente (99,1% de los episodios en una serie de 233 casos), seguido por edemas en la cara (57,5%) y en miembros inferiores (57,9%). La miocarditis se puede presentar con o sin manifestaciones de compromiso cardiaco (prolongación PR e intervalo QT, cambios de la onda T, disminución del voltaje QRS, extrasístole ventricular, bloqueo de la rama derecha (mal pronóstico en la fase aguda); imagen radiológica aumentada del corazón (predomina ventrículo izquierdo, 85%), pericarditis y derrame pericárdico (que puede llevar a taponamiento cardiaco) y falla cardiaca. Otras manifestaciones posibles de la enfermedad en esta fase incluyen en menor proporción en lactantes irritabilidad y llanto continuo, en adolescentes y adultos cefalea, insomnio, astenia, mialgias, y meningoencefalitis o encefalitis, hipoproteinemia, diarrea, adenopatías generalizadas o regionales con predominio cervical e inguinal; orquiepidimitis y parotiditis.(90)

1.9.2. Manifestaciones en la Fase crónica

Los infectados no presentan síntomas luego de la fase aguda. Alrededor del 70 % de los infectados permanecen en este estado por el resto de sus vidas, conocido como la etapa intermedia de la fase crónica. Sin embargo, luego de aproximadamente 15 años de iniciada la infección, el 30 % restante desarrolla manifestaciones clínicas tales como daño de sistemas de órganos vitales entre los cuales podemos nombrar al sistema circulatorio, nervioso y/o digestivo.

La enfermedad de Chagas puede manifestarse o bien generando una *panmiocarditis* (agrandamiento global del corazón, vía un daño al miocardio, asociado a focos inflamatorios mononucleares), o produciendo megavísceras (agrandamiento de una o varias partes del sistema digestivo). (91)

En los últimos años se ha observado que la sintomatología y la progresión de la enfermedad de Chagas en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), al igual que con otras enfermedades parasitarias, presentaba nuevos cuadros clínicos no reportados hasta el momento.

1.9.2.1. Forma cardíaca

La forma cardíaca se caracteriza por evidencias de compromiso cardíaco que frecuentemente evoluciona para cuadros de miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Esta forma de la enfermedad ocurre en cerca de 30% de los casos crónicos y es la mayor responsable de la mortalidad por la enfermedad de Chagas crónica.

Entre las características más peculiares de la cardiopatía chagásica crónica, se destacan de manera especial su carácter fibrosante, considerado el más expresivo entre las miocarditis, la destacada frecuencia y complejidad de las arritmias cardíacas y su combinación con disturbios de conducción del estímulo atrioventricular e intraventricular, la gran incidencia de muerte súbita y fenómenos tromboembólicos y de aneurismas ventriculares.

La cardiomiopatía chagásica que tiene en cuenta manifestaciones clínicas, se configuran esencialmente dos cuadros clínicos:

Insuficiencia cardíaca congestiva (ICC): caracterizada por una dilatación cardíaca creciente, con pérdida progresiva de la capacidad efectiva del ventrículo izquierdo; con gran dilatación, fibrosis miocárdica y proclividad para el desarrollo de tromboembolismo como cualquier otra cardiopatía dilatada (90)(92)

Arritmias: la miocarditis chagásica crónica, con sus características de difusa, progresiva y fibrosante, proporciona un excelente sustrato anatomopatológico para la ocurrencia del fenómeno de reentrada y surgimiento de arritmias. Entre estas los eventos más frecuentes son: extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular, fibrilación ventricular, fibrilación auricular, bradiarritmias, bloqueos AV.

Las arritmias se pueden manifestar con palpitaciones, tonturas, pérdida de conciencia y otras manifestaciones de bajo flujo cerebral. Los síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva, aparecen generalmente en personas entre los 20-50 años de edad, la insuficiencia es biventricular, con predominio de fenómenos congestivos sistémicos, siendo raros los episodios de disnea paroxística nocturna y de edema agudo del pulmón.

Tromboembolismo: El tromboembolismo constituye algunas veces la primera manifestación de la enfermedad de Chagas. Los émbolos cardíacos pueden

alcanzar tanto la circulación pulmonar como la sistémica, siendo que el cerebro es el órgano blanco donde más se hacen evidentes. La formación de los trombos se asocia con el hallazgo de áreas discinérgicas en la pared ventricular, que son detectadas mediante la ecocardiografía y generalmente están localizadas en las paredes apical, inferior y postero-lateral del ventrículo izquierdo. (92)

1.9.2.2. Forma digestiva

La denervación de los plexos del tubo digestivo ocasiona trastornos en la absorción, motilidad y secreción que causan incoordinación motora y dilatación llevando a la formación de megavisceras, involucrando sobre todo al esófago y al colon. La esofagopatía chagásica es similar al megaesófago idiopático (acalasia del esófago) tanto en su patogenia como en su fisiología, sintomatología, evolución y tratamiento. La diferencia fundamental es la serología positiva para tripanosomiasis americana, así como en algunos casos la asociación con megacolon o cardiopatía.

La disfagia es el principal síntoma en casi todos los casos (mayor de 96%), es lentamente progresiva, exacerbada por la ingestión de alimentos sólidos o fríos; habitualmente consultan por regurgitación, dolor esofágico, pirosis, hipo, sialorrea con hipertrofia de las glándulas salivales, tos, y desnutrición en el orden citado.

La presencia de megacolon en un adulto proveniente de área endémica es un indicador de alto riesgo de existencia de megacolon chagásico; y si los resultados serológicos son negativos deben ser repetidos, pues es muy rara la ausencia de anticuerpos específicos en un caso con megacolon (92).

El síntoma principal es la constipación inpruebainal, de instalación lenta y progresiva. Otro síntoma es el meteorismo con distensión abdominal y timpanismo. La disquesia, que consiste en la dificultad para evacuar exigiendo un gran esfuerzo de la musculatura abdominal para el desprendimiento del bolo fecal, aun en presencia de heces de consistencia normal, es también una manifestación frecuente y característica. (93)

1.10. Diagnóstico de la enfermedad de chagas

En la infección por *T. cruzi*, el diagnóstico de la enfermedad se apoya en datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. La información clínica es útil en pacientes con sintomatología mientras que en pacientes en fase crónica la epidemiología y los

resultados de la pruebas de laboratorio son las herramientas fundamentales en el diagnóstico. (94)

La técnica de Laboratorio empleada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente.

En fase aguda, se aplican exámenes parasitológicos directos, pues la parasitemia es elevada en esta fase de la enfermedad. Cuando se trata de diagnosticar un individuo con enfermedad de Chagas crónica, en el que la parasitemia circulante es baja, intermitente o nula, el diagnóstico de la infección se basa, fundamentalmente, en la determinación de anticuerpos específicos frente a antígenos de *T. cruzi*.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica indeterminada es importante para iniciar el tratamiento y evitar la transmisión de la enfermedad a través de hemoderivados y trasplante de órganos. (95) (96)

1.10.1 Pruebas Parasitológicas

Durante la fase aguda de la enfermedad existen numerosos parásitos en sangre periférica y es posible detectarlos mediante pruebas parasitológicas directas

1.10.1.1 Gota Fresca o Examen en fresco

Se deben buscar parásitos en sangre periférica en fresco, entre portaobjetos y cubreobjetos, examinando inmediatamente, antes de que se seque la gota de sangre sin anticoagulante, extraída del pulpejo del dedo o del lóbulo de la oreja o de la planta del pie en recién nacidos. La monocapa de hematíes permite observar los rápidos movimientos del parásito refringente entre las células sanguíneas. Una vez visualizado el parásito, se confirma el diagnóstico, sin necesidad de practicar otros exámenes.

Las extensiones de sangre (gota gruesa y frotis) teñidas adecuadamente, permiten observar las características morfológicas del parásito. Sin embargo cuando el grado de parasitemia es bajo, es necesario utilizar métodos de concentración, tales como el microhematocrito. (97)

1.10.1.2 Microhematocrito

Se emplea en recién nacidos, cuando se dispone de poca sangre; consiste en obtener uno o más capilares heparinizados, con sangre y someterlos a

centrifugación. En la interface entre el empaquetados de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se observan los movimientos del parasito, con la ayuda del microscopio con objetivo de 40 aumentos. (97)

1.10.1.3 Hemocultivo

Para la detección de parasitemia mediante cultivo de la sangre del paciente, es necesario emplear un gran volumen, aproximadamente 30 ml de sangre. El procesamiento de la muestra debe ser inmediato, centrifugado para retirar el plasma. La muestra se siembra habitualmente en tubo en medio LIT (infusión de hígado y triptosa) de preparación compleja. Se siembran varios tubos que se examinan cada mes, hasta completar de 5 a 6 meses. (97)

Debido a la complejidad de la técnica, al retraso en el diagnóstico y a su baja sensibilidad en fase crónica, a pesar de su elevada especificidad, el hemocultivo para diagnóstico de enfermedad de Chagas solo se realiza en laboratorios especializados. Además de los resultados obtenidos se encuentran muy influenciados por la cantidad de sangre empleada, el medio de cultivo utilizado y el intervalo de tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra y su inoculación en medios de cultivo. (98)

1.10.1.4 Xenodiagnostico

Consiste en la aplicación al paciente de cuatro cajitas de cartón o plástico, cada una de las cuales contiene 10 ninfas de triatomos vivos, en general de tercer estadio, en ayuno de 10 a 15 días. Al cabo de 30 minutos, se retiran las cajitas y se examinan las heces de los triatomos a los 30 y 60 días.

Al igual que el hemocultivo, el xenodiagnostico es una técnica diagnóstica laboriosa que requiere un largo periodo de tiempo hasta la emisión de resultados y que precisa de laboratorios con elevado nivel de bioseguridad. Es por ello que tampoco se emplea como técnica de rutina diagnóstica en la mayoría de laboratorios. (99)

1.10.2 Diagnostico Serológico.

El diagnóstico serológicos de la enfermedad de Chagas es especialmente útil en la fase crónica de la enfermedad, en la que la baja parasitemia circulante determina una baja sensibilidad de los métodos parasitológicos directos.

En la enfermedad de Chagas, las pruebas serológicas se denominan convencionales cuando utilizan como antígeno bien el parásito completo, o bien extractos solubles y/o purificados que contienen una mezcla compleja de antígenos de *T. cruzi*. Las técnicas serológicas no convencionales son las que emplean un único antígeno recombinante o péptido sintético de *T. cruzi* para la determinación de anticuerpos del paciente, generalmente mediante técnica ELISA, HAI (100).

Ninguna prueba serológica ha demostrado la suficiente especificidad y sensibilidad por sí sola como para confiar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica a una única técnica serológica. La OMS establece el uso de dos test serológicos que empleen diferentes antígenos, realizados en paralelo, para incrementar la certeza en el diagnóstico. La serología convencional es la que se utiliza con más frecuencia ya que muestra una mayor sensibilidad con respecto a la serología no convencional. No obstante, presenta menor especificidad que esta última, principalmente debido a que se produce reactividad cruzada con anticuerpos frente a *Leishmania spp* y *Plasmodium spp* (101).

Una pequeña proporción de individuos puede presentar un resultado discordante en ambas técnicas serológicas empleadas, por lo que se requerirá de pruebas alternativas para determinar si existe infección. El estado serológico en algunos individuos resulta difícil de determinar, incluso después de realizar o *gold standard*.

Los datos publicados sugieren que la sensibilidad de los ensayos serológicos varía en función del área geográfica, debido probablemente a la cepa de *T. cruzi* responsable de la infección, lo que determina diferencias en la respuesta humoral del paciente. (102)

El diagnóstico serológico de la infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas para la enfermedad de Chagas presenta un bajo valor predictivo, debido a que la presencia de anticuerpos IgG anti- *T. cruzi* en el recién nacido se puede explicar por la transferencia de anticuerpos maternos que no desaparecerían hasta el sexto mes de edad. Siendo una proporción pequeña de recién nacidos seronegativos. La detección de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* en el recién nacido no ha proporcionado buenos resultados. El diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas se basa en una técnica parasitológica directa positiva mediante observación al microscopio, o

mediante amplificación del ADN del parásito o bien en un resultado de serología positivo que persista 6 meses después del nacimiento mediante técnicas que empleen antígenos distintos. En caso de un resultado negativo en las pruebas parasitológicas directas en el recién nacido, el examen de otra muestra biológica se debe realizar semanas o meses después del nacimiento. Además, se debe realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos para estudiar si persiste positiva la serología 6 meses después del nacimiento. (103) (104)

1.10.2.1 (ELISA) (Enzimed Linked Inmuno Sorbent Assay)

El principio general de esta técnica es sencillo, pues se basa en el reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo que, fundamentado en una reacción colorimétrica mediante el uso de un anticuerpo marcado con una enzima, se puede cuantificar el grado de positividad de una muestra de suero problema. La transformación del sustrato por la enzima es proporcional a la concentración de anticuerpo o antígeno desconocido presente en la solución problema. De esta manera, los anticuerpos específicos pueden ser estimados cuantitativamente y en poco tiempo. (105)

El ensayo inmunoenzimático ELISA se presenta como una alternativa muy especialmente para el serodiagnóstico. En este sentido, así como en otros ensayos serodiagnósticos, puede utilizarse un antígeno crudo, es decir, aquel que contiene una mezcla de los componentes del organismo a detectar, o un antígeno con grados de purificación ,diversos, que finalmente dependerán de la sensibilidad y especificidad que se desea conferir al ensayo. Así como existe una gran variedad en cuanto al antígeno a utilizar también la hay en relación a los conjugados, de lo cual se derivan los diversos tipos de ELISA que existen actualmente, siendo los más utilizados:

- ELISA directo: cuando los anticuerpos conjugados a la enzima son dirigidos directamente contra el antígeno unido a la placa.

- ELISA indirecto: cuando los anticuerpos conjugados son dirigidos contra inmunoglobulinas humanas o de animales que sufren la enfermedad en cuestión.

□□ELISA sándwich: Cuando se utilizan dos anticuerpos específicos que reconocen un mismo antígeno, uno de ellos marcado radiactivamente o unido a una enzima. Este tipo de ensayo permite la captura de antígenos circulantes (solubles).

El ELISA tipo indirecto es uno de los más utilizados para el diagnóstico de hemoparásitos. Este ensayo se inicia con la absorción de las proteínas (antígeno) a una superficie inerte, generalmente una placa de polivinilo de 96 pozos. Posteriormente se agrega una solución de una proteína no específica y económica, generalmente leche descremada o gelatina, para bloquear la superficie evitando que otras proteínas se unan a ella. Luego se añade el suero problema que contiene los anticuerpos que reconocen al antígeno de manera específica (en el caso que la muestra sea positiva). Seguido a ello se agrega un anticuerpo secundario que reconocerá al anticuerpo primario unido al antígeno. Este anticuerpo secundario es conjugado a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. Finalmente se añade el sustrato de la enzima y se registra la densidad óptica. (106)

1.10.2.2 Hemoaglutinación Indirecta (HAI).

La prueba se hace en policubetas con fondo en U, con diluciones seriadas dobles de suero frente a hematíes de cordero o ave sensibilizados con antígeno. La reactividad se visualiza con un manto de aglutinación del 50- 100% del fondo del pocillo. Tiene una sensibilidad de alrededor del 98 % y una especificidad variable. Ha sido evaluado en varios centros referenciales con paneles de gran número de sueros. Tiene como ventaja lo sencillo del procedimiento y como desventaja la subjetividad de la lectura. La más sencilla desde el punto de vista técnico es la hemaglutinación indirecta que es empleada por varios grupos. Tiene Alta especificidad pero su sensibilidad es baja, por lo cual no es apropiada para diagnóstico como única prueba.(107)

1.10.2.3 Técnica de inmunofluorescencia (IF)

Es una prueba de diagnóstico serológico que tiene dos variedades principales: a) Inmunofluorescencia directa (IF) aplicada fundamentalmente a la detección de antígenos en una muestra clínica y b) Inmunofluorescencia indirecta (IFI) aplicada a la detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente frente a un determinado antígeno o a la detección de un antígeno en una muestra clínica.

- Inmunofluorescencia directa: sobre un portaobjeto depositamos una muestra en la que buscamos la presencia de un determinado antígeno.

Añadimos un suero específico del antígeno problema marcado con isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Si el antígeno problema se encuentra presente en la muestra, se une el conjugado. En caso contrario el conjugado se elimina con un lavado del portaobjeto.

- Inmunofluorescencia indirecta: sobre un portaobjeto que lleva pegado un antígeno conocido, se añade el suero problema. Si éste contiene anticuerpos específicos, se unen al antígeno. Los anticuerpos del suero no específicos del antígeno del portaobjeto se eliminan mediante un lavado.

Posteriormente se añade un suero anti-inmunoglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado). El conjugado se une a los anticuerpos específicos o se elimina mediante lavado si no había anticuerpos específicos en el suero.

La lectura de ambas modalidades de IF se hace con un microscopio de fluorescencia cuya luz excita al isotiocianato de fluoresceína haciendo que emita luz fluorescente de color verde. La observación de luz verde fluorescente “tiñendo” un objeto del portaobjeto indica la presencia del antígeno en la muestra o de anticuerpos específicos en el suero, según el caso. (108)

1.10.3. Diagnóstico Molecular

1.10.3.1 Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el desarrollo de las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para el diagnóstico parasitológico de diversas enfermedades. Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias de ADN que son abundantes y específicas de los parásitos en cuestión. En el caso de *T. cruzi*, hay dos secuencias específicas que han resultado útiles: la región variable de 330 pares de bases del ADN del miniciclo del kinetoplasto, y una secuencia repetitiva de 195 pares de bases del ADN nuclear del parásito.

Ambas contienen un elevado número de secuencias repetidas por lo que son especialmente adecuadas para su detección mediante PCR. De hecho, la PCR dirigida a amplificar ADN del kinetoplasto es capaz de detectar el equivalente de una

sola célula parasitaria en 10-20 ml de sangre. La conservación de la muestra de sangre del paciente en una solución de guanadina-EDTA preserva los ácidos nucleicos del parásito. Además, hervir dicha mezcla incrementa el rendimiento en la extracción de ADN. (109)

La PCR resulta de gran utilidad para la detección del parásito en los casos agudos en los que la parasitemia es elevada, ya sea por transmisión congénita o por transmisión vectorial. Así, la PCR puede presentar un resultado positivo días o semanas antes de que la detección de tripomastigotes sea posible a partir de extensiones de sangre periférica.

La PCR es útil también en el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi* en receptores de órganos infectados. Los ensayos de PCR cuantitativos (PCR a tiempo real) son los más sensibles para monitorizar la reactivación de la enfermedad en receptores inmunodeprimidos infectados por *T. cruzi*, ya que permiten determinar el número creciente de parásitos en sangre periférica a lo largo del tiempo. (110)

En el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica, la PCR ha demostrado una sensibilidad que oscila entre el 59% y el 100%. Durante la fase crónica de la enfermedad, el resultado de PCR positivo confirma la infección, aunque el resultado negativo no la descarta. La sensibilidad de la PCR en estos pacientes es variable en función del área geográfica y la edad de los sujetos estudiados. (111)

1.10.3.2 El ADN de kinetoplasto (ADNk)

El ADN de kinetoplasto (ADNk), es una condensación de ADN extra nuclear que representa entre el 20- 30% del ADN total del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares: maxicirculos y minicirculos. Cada minicírculo presenta cuatro regiones constantes y cuatro variables. Generalmente los cebadores diseñados para las PCR se unen a las regiones constantes delimitando las regiones variables, amplificándose estas últimas. Dependiendo del aislado parasitario se podría tener entre 10.000 y 30.000 minicirculos por célula y al ser cuatro repeticiones por minicírculo se podría tener entre 40.000 y 120.000 repeticiones de la diana de amplificación por parásito. Varios investigadores, han utilizado la PCR de amplificación de la región variable ADN de minicirculos del kinetoplasto de *T. cruzi*, para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas por ser una diana

altamente sensible y específica ya que solo amplifica el ADN de *T. cruzi* y no de otros parásitos relacionados. (112)(113)

Es una condensación de ADN extranuclear que representa entre el 20%-30% del ADN total del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares: maxicirculos y minicirculos. Cada minicirculos presentan cuatro regiones constantes y cuatro variables. Generalmente los cebadores diseñados para las PCR se unen a las regiones constantes delimitando las regiones variables, amplificándose estas últimas. Dependiendo del aislado parasitario se podría tener entre 10000 y 30000 minicirculos por células y al ser cuatro repeticiones por minicirculos se podría tener entre 40000 y 120000 repeticiones de la diana de amplificación por parásito. Varios investigadores, han utilizado la PCR de amplificación de la región variable ADN de minicirculos del kinetoplasto de *T. cruzi*, para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas por ser una diana altamente sensible y específica ya que solo amplifica el DNA de *T. cruzi* y no de otros parásitos relacionados.(114)

1.10.3.3 DNA satélite o DNA sat

Está formado por aproximadamente 120.00 copias de una secuencia de 195pb, por lo que representa el 10% del ADN del parásito lo que la hace una diana altamente sensible. La PCR basada en la amplificación de ADN satelital de *T. cruzi* fue diseñada por Moser y cols.(114)

En la cual realizó la amplificación *in vitro* de 188pb de ADN repetitivo a partir de muestras de sangre de pacientes y ratones infectados con *T. cruzi*, concluyendo que además de ser sensible era muy específica, ya que no amplifica ninguna secuencia de ADN de *Leishmania sp*, ni de otra especie de *T. cruzi*. En ambos casos se compararon los resultados con los métodos parasitológicos, encontrando que esta técnica era sensible y específica en cualquier fase de la enfermedad, además de poder ser empleada en muestras de heces de triatomíneos.

Por otro lado, el ADN satélite del *T. cruzi*, está formado por aproximadamente 120.000 copias de una secuencia de 195 pb, lo que representa el 10% del ADN del parásito, lo que la hace una diana altamente sensible.(115)

La PCR basada en la amplificación de ADN satélite de *T. cruzi* fue diseñada por Moser y cols. (114), en la cual realizó la amplificación *in vitro* de 188 pb de ADN

repetitivo a partir de muestras de sangre de pacientes y ratones infectados con *T. cruzi*, concluyendo que además de ser sensible era muy específica, ya que no amplificaba ninguna secuencia de ADN de *Leishmania sp*, ni de otra especie de *Trypanosoma*. Posteriormente, Russomando y cols. realizaron estudios en ratones infectados y en pacientes empleando muestras de suero, obteniendo una alta sensibilidad y especificidad en la detección de ADN de *T. cruzi*. (114) (115)(116) En ambos casos se compararon los resultados con los métodos parasitológicos, encontrando que esta técnica era sensible y específica en cualquier fase de la enfermedad, además de poder ser empleada en muestras de heces de triatominos. Por otro lado Kirchhoff y cols determinaron que la técnica de PCR permite diagnosticar la infección por *T. cruzi* más temprano que los métodos parasitológicos, debido a su elevada sensibilidad. En un trabajo previo se estandarizaron las PCRs para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto y ADN satélite de *T. cruzi*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue la validación de estas dos técnicas utilizando muestras de pacientes. (117)(118)

1.11. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

El tratamiento etiológico en la enfermedad de Chagas, es eliminar el protozoo que la causa, el *Trypanosoma cruzi*. Por ser un organismo eucariótico, con biología similar a la de las células humanas, la tarea no es fácil, pues la posología adecuada puede ser cercana al límite de tolerancia. Se han utilizado muchos medicamentos, con diferentes esquemas terapéuticos, la mayoría sin efecto.

Actualmente hay dos medicamentos activos contra *T.cruzi* para el tratamiento específico de la enfermedad. Los medicamentos tripanomicidas están indicados en infección aguda del niño y del adulto, en pacientes con parasitemia, en accidentes de laboratorio, en infección por transfusiones, en pacientes trasplantados y en infección congénita confirmada. Los pacientes con enfermedad crónica no se benefician de este tratamiento. Los dos medicamentos son Benznidazol del grupo de los nitroimidazoles y el nifurtimox, perteneciente a los nitrofuranos.(119)

Toda persona con Enfermedad de Chagas podría ser tratada, a excepción de los enfermos crónicos terminales. Cada caso debe ser evaluado con relación al costo beneficio de la terapia antiparasitaria específica. Los fármacos tripanomicidas clásicos aprobados hasta ahora para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas

son: Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ), aunque se han incorporado otras alternativas, como Itraconazol y Alopurinol, en especial en adultos en fase crónica indeterminada y determinada que continúan en evaluación. En el país sólo se encuentra disponible NFX.

Se debe administrar bajo la modalidad de tratamiento directamente observado (TDO) y monitorizar sus efectos secundarios y su acción parasiticida (parasitemia).

Con respecto a donación de tejidos y órganos, en base a la experiencia publicada, no es una contraindicación formal de rechazo del injerto si el donante es positivo, pero debe evitarse en lo posible. (119)(120)

1.11.1 Fármacos

1.11.1.2. Nifurtimox

NFX, es un análogo de nitrofuranos que actúa contra las formas amastigotes crónica indeterminada y crónica determinada de la enfermedad. En la fase aguda presenta una cura parasitológica de 76%, la que en los RN hijos de madres chagásica puede alcanzar entre el 80% y 100% y en la etapa crónica, un porcentaje variable, habiendo resultados contradictorios en algunas series.

NFX origina radicales libres y produce daño por reducción de componentes celulares parasitarios como proteínas y ácidos nucleicos. Los efectos secundarios se presentan en el 30% de los casos y son más manifiestos en adultos. Puede producir anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dermatitis y compromiso del SNC con insomnio, alucinaciones y psicosis. La polineuropatía periférica está descrita en adultos en 20% de los casos y es dosis dependiente. (121)

Está contraindicado su uso en embarazadas, en pacientes con insuficiencia renal y hepática. La OMS/OPS no recomienda su uso durante la lactancia.

NFX se expende en frascos que contienen 100 comprimidos ranurados de 120 mg, lo que permite una mejor dosificación.

La dosis recomendada es de 8-10 mg/kg/día durante 60 a 90 días, los niños lo toleran mejor que los adultos. La dosis puede variar entre 5-25 mg/k/día, esta última

es usada en formas graves como meningoencefalitis o miocarditis aguda, casos en que el tratamiento debe ser supervisado por el especialista en el hospital alimentos. La administración se inicia en forma escalonada iniciando 1/4 de la dosis el primer día, la mitad los días 2 y 3 y la dosis total al 4° día, contándose los 60 días desde el momento que inicia la dosis total. (122)

En caso de efectos adversos, se debe disminuir la dosis o suspender transitoriamente la farmacoterapia, además tratar los síntomas hasta la desaparición de éstos. Luego reiniciar la dosis óptima en 3 días, asociando siempre el tratamiento sintomático. En caso de reaparecer los efectos indeseados y habiendo compromiso del estado general, se debe suspender inmediatamente la administración del fármaco. (121)

1.11.1.3 Benznidazol (BNZ)

Es también un fármaco tripanomicida. Actúa uniéndose en forma covalente a los intermediarios de la nitrorreducción con los componentes del parásito, ADN, lípidos y proteínas. Es eficaz en el tratamiento de la fase aguda, en la fase crónica indeterminada, y en la crónica determinada, como se ha demostrado en estudios realizados en niños en Argentina y Brasil. La dosis es de 5-7 mg/k dividido en 3 dosis diarias por 60 días. (122)

Los efectos adversos se dividen en 3 tipos:

- a. Dermatológicos con erupción cutánea que aparece entre los 7-10 días de tratamiento, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia y artralgia.
- b. Depresión de la médula ósea con trombocitopenia, púrpura y agranulocitosis, que es la manifestación más grave.
- c. Compromiso neurológico con polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica.

Está contraindicado en embarazadas y en personas con insuficiencia hepática y renal.

1.11.2 Indicaciones del tratamiento

La enfermedad de Chagas debe ser tratada siempre, en su periodo agudo, periodo crónico determinado inicial e intermedio y en el periodo crónico indeterminado. Sólo

se exceptúan del tratamiento los cardiópatas chagásicos con *Core Bovis* o insuficiencia cardiaca terminal. Existe consenso en aplicar terapia específica por la demostración de parásitos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *T. cruzi* en casos crónicos donde la microscopía óptica no los pesquisa. El tratamiento en estos casos tiene rendimiento. En la actualidad se acepta que la terapia precoz es capaz de modificar la evolución natural de la enfermedad. Debido a la cantidad de pacientes con enfermedad de Chagas, alrededor de 12 millones en el continente americano y 150.000 en Chile, su tratamiento es una solución a un problema de Salud Pública.(123)

1.11.2.1. Casos agudos

1.11.2.1.1. Adquiridos

Deben ser tratados siempre, tanto los pacientes con manifestaciones clínicas, signo de Romaña, chagomas de inoculación, signos de carditis: ritmo de galope, tonos apagados, taquicardia o alteraciones del ECG (alteración ST y T y alteraciones de la conducción aurículo ventricular, etc) como los casos agudos biológicos con detección fácil de formas tripomastigotas al fresco, mediante frotis de sangre y con serología convencional positiva: hemaglutinación indirecta (HAI), fijación del complemento (FC) (Machado Guerreiro), inmunofluorescencia indirecta (IF), reacción inmunoenzimática (ELISA), de inmunoprecipitación: doble difusión (DD), inmunoelectroforesis (IEF), electrosinerosis (ES), e inmunobloting (IB) con IgM positiva. Estos casos se tratan con NF 8 mg/ kg/día durante 30-60 días en adultos y 10 mg/kg/ día por 30-60 días en niños. La dosis diaria se debe repartir en dos o tres tomas después de las comidas (cada 8 ó 12 h). El ideal es comenzar con la mitad de la dosis, subir gradualmente diariamente hasta alcanzar al 4° día los niveles óptimos. Esto permite mejorar la tolerancia al medicamento. La curación clínica, parasitológica y serológica de los casos agudos adquiridos es de 70% con NF y de 76% con BNZ. En Brasil nunca se utilizó NF, siempre se administró BNZ a dosis de 5 mg/kg/día por 60 días en adultos y 5-10 mg/kg/día en niños por 60 días.(124)(125)

1.11.2.1.2. Congénitos

El tratamiento se debe efectuar en el mismo momento en que se realiza el diagnóstico, es decir, cuando se confirma la sospecha clínica con las observaciones

del parásito al fresco, en frotis de sangre, mediante microhematocrito o microstrout. Muchas veces el diagnóstico se confirma después de los 9 meses de vida del niño, por persistencia de serología positiva, es decir, cuando los anticuerpos positivos maternos han desaparecido. Los mejores resultados se obtienen mientras más precoz sea el diagnóstico. Si la terapia se realiza dentro del año de vida, la curación es del 100% (clínica, parasitológica y serológica). Es importante realizar un seguimiento clínico, parasitológico y serológico de los recién nacidos (RN) tratados, por lo menos hasta los dos años. En los últimos años se ha confirmado la utilidad de la reacción de PCR de *T. cruzi* en el diagnóstico precoz. Su sensibilidad es mayor que la del xenodiagnóstico. Hoy en día se acepta que PCR positivo en un RN no representa necesariamente una infección congénita, ya que restos del ADN del parásito (al ser destruido) pueden pasar la barrera placentaria (amplicones y no parásitos vivos). Por este motivo, es necesario repetir esta reacción a los 15 y/o 30 días. Si persiste la positividad, recién entonces se confirmará la infección congénita. Los RN o lactantes deben recibir NF a dosis de 8-10 mg/kg/día por 60 días en tres dosis diarias (cada 8 h) o BNZ, 5-10 mg/kg/día por 60 días en tres dosis. Para evitar las convulsiones se asocia fenobarbital en dosis habituales durante los primeros 15 días.(126)(127)

1.11.2.1.3. Enfermedad de Chagas accidental

Todos los accidentes de laboratorio en que hubo inoculo en forma virulenta de *T. cruzi* y confirmación de la infección humana mediante, serología convencional (después de los 21 días), PCR positiva o ambas para *T. cruzi*, deben recibir la misma terapia que los casos agudos adquiridos (vía vectorial u otra) durante 15 días. Se incluye en este grupo a la transfusión por error al administrar sangre o sus derivados de un donante chagásico.

Siempre es necesario realizar seguimiento de estos casos a los 30 y 60 días (clínico y serológico).

1.11.2.1.4. Trasplante de órganos

Un trasplante con un dador o receptor con ECh debe ser siempre tratado con NF 8 mg/kg/ día en adultos y 10 mg/kg/día en niños por 60 días o BNZ 5 mg/kg/día en

adultos y 5-10 mg/ kg/día en niños (promedio 7,5 mg) por 60 días. En trasplantes de médula ósea la terapia se debe mantener por 2 años. En los trasplantados pueden ocurrir primoinfecciones y reactivaciones, por este motivo, es importante efectuar exámenes previos al trasplante, al dador y al receptor. En los casos que se trasplante un órgano de cadáver es posible detectar anticuerpos anti *T.cruzi* en el líquido pericárdico. Las primoinfecciones se tratan de igual forma que los casos adquiridos agudos, las reactivaciones de un paciente con enfermedad de Chagas crónica se describen a continuación.

1.12. Reactivación de la enfermedad de Chagas crónica y tratamiento de la enfermedad de Chagas en inmunosuprimidos

Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentan una coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana, o que sean sometidos a una terapia de inmunosupresión por cáncer, leucemias, etc., deben recibir el mismo esquema terapéutico que los casos agudos adquiridos por 5 o más meses. En la primoinfección por *T. cruzi* en pacientes con SIDA se administra el mismo esquema terapéutico que en las reactivaciones hasta que se reconstituya la respuesta inmunológica del hospedero, por lo general a los 60 días o más. Una vez que se normaliza el sistema inmune, especialmente la relación linfocitos CD8 (igual o superior a 200 por ml), el tratamiento antiparasitario se administra cada 3 días, balanceando siempre la acción parasiticida con los efectos adversos de los fármacos. Los pacientes con SIDA sin terapia anti-retroviral son los más afectados por la primoinfección por *T. cruzi*. En ellos una vez que el nivel de linfocitos CD4 se normaliza con la terapia anti-retroviral se debe administrar el esquema de mantención anti *T. cruzi*.

1.13. Evaluación y seguimiento del tratamiento

Las dificultades de la terapia etiológica de la ECh radica en: la prolongada duración de ésta que por lo general es de 30 a 60 días, por los efectos colaterales de los fármacos, que se presentan en 30% de los casos y la falta de un criterio fidedigno de curación en los casos crónicos. Para algunos investigadores, la conversión serológica es indicación de curación, pero esto sólo sucede en 70-75% de los casos adquiridos agudos y en 100% de los casos agudos congénitos, y en los casos

crónicos muchas veces 20 a 30 años después del término de la terapia y en muchos casos los pacientes fallecen antes que esto suceda. Es decir, en los casos crónicos puede haber curación parasitológica con serología convencional positiva. En recientes estudios en animales infectados con *T. cruzi* y curados que no presentaban parásitos ni antígenos de *T. cruzi* tenían linfocitos CD centrales de memoria que mantenían una serología positiva por más de un año. (128)(129)(130)

No sabemos si esto sucede en el humano, pero si así fuera explicaría la cura parasitológica en casos crónicos sin conversión serológica. En base a nuestra experiencia en el tratamiento de esta zoonosis consideramos como criterio de cura en el período crónico, la conversión del xenodiagnóstico y del PCR cualitativo de positivo a negativo y, en los cardiópatas, la eliminación de las alteraciones electrocardiográficas, cambios que deben persistir por 12 o más años, independientemente de la conversión serológica. Debe existir dos parámetros parasitológicos y uno o más clínicos para confirmar la curación. La desaparición de los anticuerpos líticos como un complemento de los criterios de curación, se considera válido por algunos investigadores. A todos los pacientes chagásicos tratados tanto en el período agudo, período crónico determinado inicial o intermedio y en el período crónico indeterminado se les debe efectuar un seguimiento con evaluaciones clínicas, parasitológicas (cualitativas y cuantitativas) y serológicas por períodos prolongados. Es necesario considerar que en pacientes inmunosuprimidos y con ECh la serología convencional es habitualmente negativa y por consiguiente no es útil para el seguimiento de estos casos.(131)

1.14. Contraindicaciones del tratamiento

La utilización de NF y BNZ en pacientes chagásicos está contraindicado en embarazadas, mujeres en período de lactancia, pacientes con alcoholismo crónico invertebrado y en personas con hepatopatías, nefrópatas y hemopatías graves.

2. Justificación

En el presente trabajo se realizó la caracterización molecular de las cepas aisladas del primer brote detectado en el Municipio de Guayamerin-Beni que intervino el laboratorio de Parasitología del INLASA aplicando diferentes técnicas moleculares además de realizar el seguimiento del tratamiento de las personas infectadas hasta la seroconversión.

La aplicación de la metodología molecular nos permite tomar acciones en el diagnóstico y tratamiento inmediato de las personas afectadas, también de tener información completa de la distribución de los linajes presentes y el ingreso de nuevos a nuestro medio, por lo tanto estos datos nos permiten asumir nuevas políticas de Salud y enfrentar la aparición de brotes en lugares no endémicos, como es el caso del sucedido en el Municipio de Guayamerin.

Consecuentemente, la metodología molecular nos permite determinar la diversidad genética en las cepas de triatomíneos circulantes en nuestro medio, ayudará a conocer una mejor distribución geográfica de las cepas circulantes, además de ampliar nuestros conocimientos de la relevancia de la patogenicidad y la resistencia al tratamiento de estas cepas.

En este contexto, la inusual presentación clínica presentada en el primer brote encontrado en el Municipio de Guayamerin-Beni, ha mostrado la necesidad de identificar el linaje y la diversidad genética de las cepas involucradas en la infección de los 14 pacientes con Chagas agudo, en este sentido, para el presente trabajo se utilizaron métodos como el PCR SL mini-exon y PCR 24S α para la identificación del DTU correspondiente en las cepas aisladas, además se realizó el análisis de secuenciación del gen Ascorbato dependiente de Peroxidasa (TcAPX) para determinar la diversidad genética en las cepas y su relevancia con el tratamiento.

3.Hipotesis

El Municipio de Guayamerin del departamento del Beni, es endémico de la infecciones por *Plasmodium sp.*, dengue, enterobacterias y otras, sin embargo en Octubre de 2010 se reporto el primer brote de infección por *T. cruzi*. Las cepas aisladas en este brote pertenecen al linaje TcII, existiendo solo un clon circulante, asimismo el tratamiento de los pacientes se observaría elevados títulos de anticuerpos anti *T. cruzi* por mas de 8 meses posterior al tratamiento.

4. Objetivos

4.1. *Objetivo General.*

Caracterizar mediante técnicas moleculares cepas de *T. cruzi* aisladas de pacientes procedentes del primer brote reportado el año 2010 y su seroconversión pos tratamiento en el Municipio de Guayaramerin–Beni.

4.2. *Objetivo Especifico*

- Identificar la presencia de epimastigote mediante cultivos a partir de las muestras biológicas recolectadas de los pacientes relacionados al primer brote del municipio de Guayaramerin–Beni.
- Determinar el linaje correspondiente de las cepas aisladas en el presente estudio mediante técnicas moleculares.
- Identificar la diversidad genética de las cepas en estudio mediante la secuenciación del gen TcAPX.
- Determinar los títulos de anticuerpos anti *T.cruzi* hasta la seroconversión de los 14 pacientes pos tratamiento.

5.1 Materiales y Metodos

5.2 Tipo de estudio.

El presente trabajo de tesis es de tipo descriptivo retrospectivo, los datos y muestras biológicos se basaron en el brote acontecido en el municipio de Guayamerin-Beni.

5.2 Lugar de realización de la investigación.

El presente estudio se realizó en instalaciones del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud "INLASA" del ministerio de Salud, en el Laboratorio de Parasitología, pertenece al Área de Inmunoserología y Biología Molecular de la ciudad de La Paz, se encuentra ubicado en Av. Saavedra Pasaje Rafael Zubieta N.1889, lado Estado Mayor Miraflores.

5.3 Población de Estudio

Las muestras colectadas pertenecían a pacientes del primer brote de la enfermedad de Chagas oral reportados en la ciudad de Guayamerin la cual se encuentra en el departamento de Beni, Norte de Bolivia, en la región del Amazonas, la frontera con el país de Brasil. Guayamerin tiene una población de 40.500 habitantes y una altitud media de 120 metros sobre el nivel del mar, además tiene una temperatura promedio de 30°C.

Para el presente estudio las muestras fueron procedentes de individuos previamente identificados como infectados por *T. cruzi* mediante técnicas parasitológicas directas e indirectas. Las muestras de sangre fueron conservadas con guanidina para el análisis de la biología molecular y congeladas a -20 °C para ensayos inmunológicos en el periodo comprendido entre octubre a diciembre del 2010.

5.4 Extracción del DNA con Fenol Cloroformo a partir de muestras de sangre

A partir de 200 uL de la interface (capa leucocitaria) se procedió a extraer material genético en base a una extracción de Fenol-Cloroformo, transfiriendo las muestras a un tubo ependorf de 1.5 mL estéril codificado, posteriormente se añadió 200 uL de tampón de lisis (Sigma), 100 uL de Triton (Sigma) al 1% y 100 uL de proteinasa K (Sigma) incubándose a 60° C por toda la noche.

Se tomó 100 ul de la muestra a continuación se añadió similar volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, fue centrifugado a 13.000 rpm por 3 min, la fase

acuoso del sobrenadante fue traspasada a un tubo nuevo, después se agregó 200 uL de cloroformo y se centrifugo a 13000rpm durante 3 min, subsecuentemente fue removida la fase acuosa aproximadamente 180uL a otro tubo nuevo.

EIDNA fue precipitado con 200 uL de isopropanol, durante 35 min a -20° C, posteriormente se centrifugo a 13.000 rpm durante 15 min desechando el sobrenadante con mucho cuidado, el precipitado fue lavado agregando 500 uL de etanol frio a 70% sin agitarlo se centrifugo a 13000 rpm 10 min, desechando el sobrenadante. Finalmente se incubo a 37° C por 2 hrs. Aproximadamente y disolviendo el precipitado de DNA con 50 uL de tampón de TE 1X (Sigma) y se conservo a -20C.

5.5 Cultivo de *T.cruzi*

Las catorce muestras colectadas de sangre de los pacientes involucrados en el primer brote del Municipio de Guayamerin, fueron cultivadas en medio LIT (*Liver-Infusion-Tryptose*) suplementadas con 15% de suero fetal bovino 26° C, pasado siete días se observo el desarrollo de promastigotes con ayuda de un microscopio invertido (OLIMPUS).

5.6 Caracterización molecular.

A partir de los aislados de los cultivos primarios se realizo la caracterización molecular o tipificación de *T.cruzi*.

5.6.1 PCR-SL:

Para la detección de *T.cruzi* se amplificó la región polimórfica antigénica del minixon mediante una multiplex PCR.

La mix PCR fue preparada para un volumen de 20uL, utilizando una concentración final MgCl₂ a 1.5mM, dNTPs 0.2 mM, Taq polimerasa 0.5 uM y los cebadores cada uno a 0.5 uM los cebadores utilizados fueron: **Cruzi 1 5' GTC TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC 3', Cruzi 2 5' CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G 3'** finalmente se adiciono 5 uL del material genético anteriormente extraído. Las condiciones de PCR utilizadas fueron un ciclo de 95° C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95° C 1 min, 55° C segundos y 72° C por 1 min y finalmente 72° C por 5 minutos. La identificación de los productos amplificados se realizo utilizando un gel de agarosas al 1.5% teñido con Bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 ug/mL y se

visualizo con ayuda de un transiluminador, las bandas esperadas tenían un peso 350 pb. En este ensayo se observan bandas de DNA de **350 pb** para el linaje **Tcl**, **300 pb** para **DTUII/DTUV/DTUVI**, si no existiera presencia de banda puede tratarse de **DTUIII/DTUIV**.

5.6.2. PCR-24S α :

Amplifica el dominio D7 del gen ribosomal 24S α de trypanosomatideos mediante la PCR convencional utilizada generalmente para la tipificación de la cepa. La amplificación por PCR del gen 24S α RNA ribosomal empleando los primer D71 y D72, estos oligonucleotidos se acoplan a una región conservada del gen RNAr24S α y amplifican una zona altamente variable y permite una aproximación a la identificación de la DTU de *T. cruzi* según el peso molecular del amplicon producido.

La mix PCR fue preparada para un volumen de 20ul, utilizando a una concentración final MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.25 mM, Taq polimerasa 0.05 U/uL y los cebadores cada uno a 0.5 uM las secuencias respectivas son: Cruzi1 5' **AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG 3'**, Cruzi2 5' **TTT TCA GAA CCG AAC AGT 3'** finalmente se adiciono 5 ul del material genético anteriormente extraído.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron un ciclo de 95° C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95° C 1 min, 55° C segundos, 72° C por 1 min y finalmente 72° C por 5 minutos. La identificación de los productos amplificados se realizó utilizando un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 ug/mL y se visualizo en un transiluminador las bandas esperadas fueron de un peso de 120 pb. La obtención de un Producto de peso molecular de 100 pb pertenece al DTUIII, en caso que se tengan dos productos de 100 y 120 pb pertenece al grupo DTU IV.

5.7 Análisis de Secuenciación

Las cepas de *T. cruzi* se caracterizaron mediante la amplificación del gen de ascorbato dependiente de haemoperoxidase (TcAPX) a partir de los cultivos de tripomastigotes desarrollados en el Laboratorio del INLASA, posterior secuenciación de un fragmento de 799pb como describe en Yeo et al. 2011.

Las secuencias de nucleótidos fueron ensamblados manualmente con ayuda del programa BioEdit v7.0.9.0 software Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences,

EE.UU.) (Hall, 1999). Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) fueron identificados por la presencia de dos picos coincidentes en el mismo locus (picos separados). El modelo de mejor ajuste de sustitución de nucleótidos fue seleccionado entre 88 modelos y su importancia evaluada de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike (AIC) en el programa MODELTEST 1,0. (Posada, 2008). El mejor modelo seleccionado para este conjunto de datos fue el TRN. Con una de máxima verosimilitud (ML) filogenia, se incluyeron 26 cepas de *T. cruzi* que agrupaban en los DTUs TCI-TcIV, para finalmente realizar la construcción del árbol filogenético usando el modelo TRN en MEGA v5.0 (Tamura et al. 2011).

5.8 Seguimiento pos tratamiento

Una vez determinados y confirmados la infección por *T. cruzi* en los 14 pacientes se inicio el tratamiento específico con Benznidazol durante 60 días a dosis de acuerdo al peso y talla de cada paciente.

Posteriormente se llevo adelante el seguimiento de seroconversión, se llevo a realizar 8 controles a todos los pacientes convocandolos al Centro de Salud por lo menos una vez al mes, inclusive visitandolos hasta sus hogares. Las muestras se extrajeron por puncion venosa, centrifugandose a 2500 rpm x10 minutos y el suero fue alicuotado e identificado ,atravez de la cadena de frio fueron enviadas al laboratorio de Parasitologia del INLASA .

Para su procesamiento se utilizaron tecnicas serologicas:

ELISA Reombinante 3.V.0 de Laboratorios Wiener (Argentina) utilizando su prospecto del reactivo.

HAI de Laboratorios de Polychaco (Argentina) siguiendo su prospecto del reactivo mencionado.El titulo que se considero positivo fue de 1/16

IFI Biocientifica (Argentina) utilizando su prospecto del reactivo.El titulo que se considero positivo fue de 1/32.

6. Resultados

En Octubre de 2010 se reporto a 14 pacientes en el Municipio de Guayamerin-Beni presentaron una sintomatología característica a la enfermedad de Chagas, las muestras fueron enviadas para la confirmación del agente patógeno al Laboratorio de Parasitología del INLASA, subsecuentemente se realizó los cultivos a partir de las muestras enviadas lograndose aislar 9 cepas, con las que se realizó la clasificación del linaje y la detección de la diversidad genética, como se detalla los resultados a continuación.

6.1 Genotipificación de *T. cruzi* por los métodos PCR-SL y PCR-24Sα

Las nueve cepas aisladas en cultivo de los pacientes se realizaron la genotipificación utilizando los marcadores del mini-exon y rRNA 24 Sα. Con el objeto de identificar las diferentes Unidades de Tipificación Discretas (DTU), por la visualización de los diferentes productos amplificados por PCR.

6.1.1 Detección de la sub unidad (SL) mini-exon de *T.cruzi*

La amplificación por PCR mediante el gen de mini-exon se evaluaron las muestras que pertenecían al brote y diferentes zonas geográficas de Bolivia, se observaron bandas de 300 y 350pb (Figura 9), las nueve cepas en estudio no amplificaron ninguna banda, por lo tanto, clasificarían en el grupo **DTU III/DTU IV**.

Figura 9 Analisis INLASA gen mini-exon

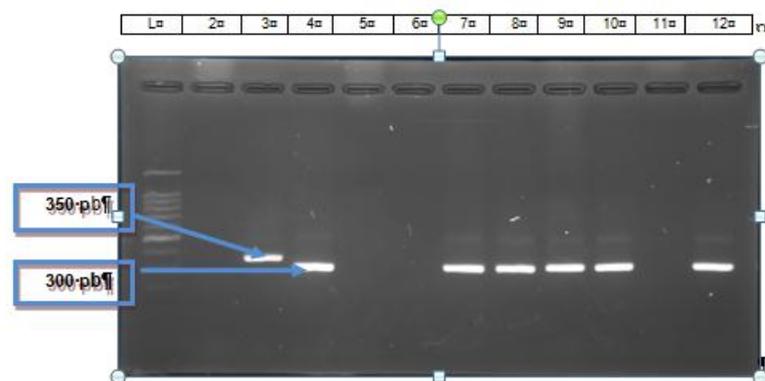


Figura 9 : Análisis INLASA gen mini-exon ; (1) Ladder (2) control negativo (3) Control positivo TcI DTUs I (4) control positivo TcII DTUs II,V,VI (5) ILSP 001 muestra de la amazonía (6) ILSP 002 muestra de la amazonía (7) ILSP 003 muestra de La Paz DTUs II,V,VI (8) ILSP 004 La Paz DTUs II,V,VI (9) ILSP 005 muestra de Cochabamba DTUs II,V,VI (10) ILSP 006 muestra de La Paz DTUs II,V,VI (11) ILSP 007 muestra de la amazonía (12) ILSP 008 muestra de Tarija DTUs II,V,VI.

6.1.2 Detección de la región intergenica del RNAr24Sα de *T. cruzi*.

Con el primer cebador(PCR-SL)no se observó amplificación, por este motivo existió la necesidad de realizar un segundo análisis con el PCR-24Sα, analizando y correlacionando los resultados con las nueve cepas en estudio se encontró que estas presentaron productos de 120 pb clasificando al linaje DTU IV (Figura 10).

Figura 10 Analisis INLASA gen RNAr24Sα de *T. cruzi*.

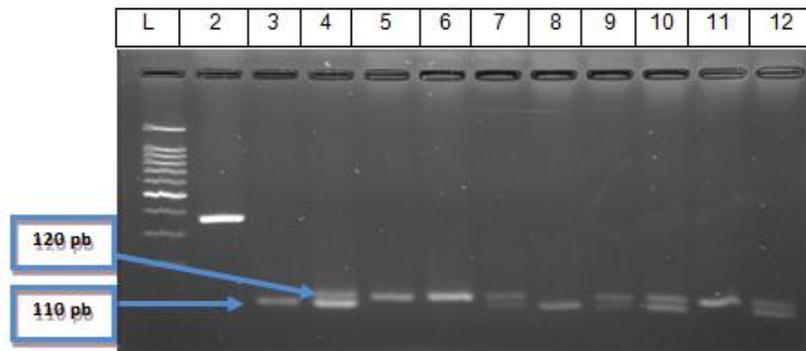


Figura 10: Análisis INLASA gen 24α-rRNA ; (1) Ladder (2) control negativo (3) Control positivo TcI DTUs I 110 pb (4) control positivo TcII DTUs V 110-120 pb (5) ILSP 001 muestra de la amazonía DTUs IV 120-125 pb(6) ILSP 002 muestra de la amazonía DTUs IV 120-125 pb (7) ILSP 003 muestra de La Paz TcII DTUs V 110-120 pb (8) ILSP 004 La Paz TcII DTUs V 110-120 pb (9) ILSP 005 muestra de Cochabamba TcII DTUs V 110-120 pb (10) ILSP 006 muestra de La Paz TcII DTUs V 110-120 pb (11) ILSP 007 muestra de la amazonía DTUs IV 120-125 pb (12) ILSP 008 muestra de Tarija TcII DTUs V 110-120 pb.

6.1 Caracterización molecular mediante Secuenciación

El árbol filogenético fue construido con 32 secuencias del gen TcAPX pertenecían las secuencias a los linajes TcI-TcIV (Figura 11). De los nueve aislados solamente se realizó de seis cepas el análisis de secuenciación, se observa que las muestras corresponden claramente al grupo de cepas sudamericanas TcIV (95%).

En los aislados de *T. cruzi* se observa que existe diversidad genética, de acuerdo a los datos de la secuencia de nucleótidos; existen dos SNPs separados ILSP002 y ILSP015 de las otras cuatro cepas (ILSP001, ILSP007, ILSP010 y ILSP016). Esta diversidad recibe el apoyo de fuerte en la filogenia ML (87%), como se observa en la Figura 11.

Figura 11 Árbol construido con 32 secuencias TcAPX pertenecientes a los aislamientos de TCI-TcIV

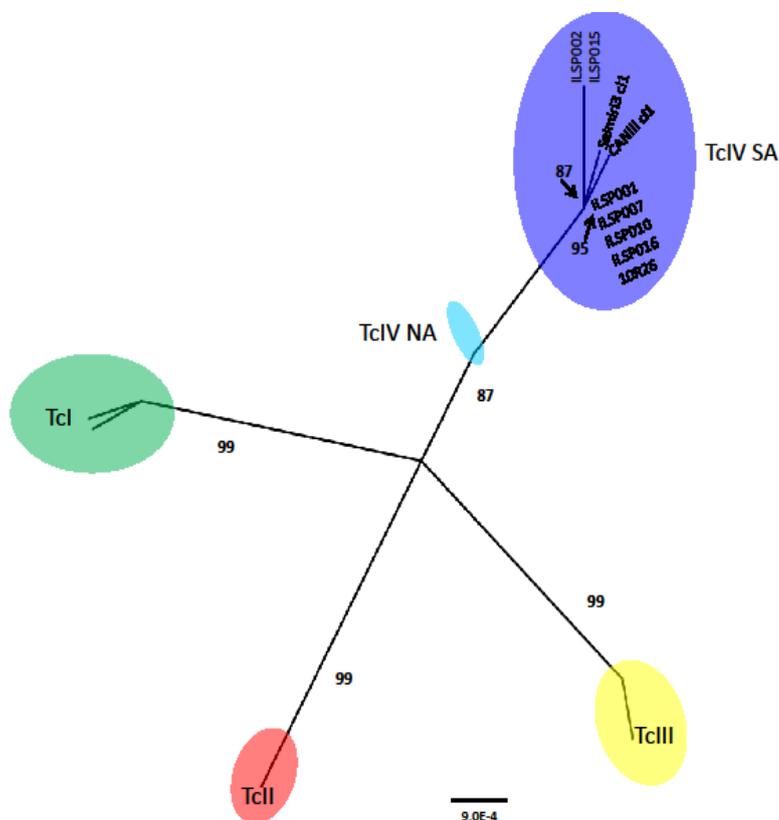


Figura 11: Árbol construido con 32 secuencias TcAPX pertenecientes a los aislamientos de TCI-TcIV, se evidencia los aislados de las muestras ILSP 001, ILSP 007, ILSP 010 y ILSP 016 separados de las muestras ILSP 002 y ILSP 015 sugiriendo la diversidad genética dentro del DTUs IV.

6.3DTU Cepas analizadas.

De las muestras de los catorce pacientes se lograron aislar a nueve cepas, realizándose la amplificación de la región intergenica del miniexon y RNAr24S α , sin embargo el análisis de secuenciación del gen TcAPX solamente se efectuó con seis cepas, los datos se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8 Tipificación Molecular de *Trypanosoma cruzi* aislados de pacientes con Chagas por transmisión Oral

CODIGO	Laboratorio INLASA			Laboratorio CONICET	
	Cultivo	Mini-exon 300pb	24 α -rRNA 120 pb	CODIGO	Secuenciación
CH/441	Crecimiento	-	IV	ILSP-001	IV
CH/442	Crecimiento	-	IV	ILSP-002	IV
CH/443	Crecimiento	-	IV	ILSP-016	IV
CH/445	Crecimiento	-	IV	ILSP-007	IV
CH/454		-	IV		
CH/457		-	IV		
CH/459		-	IV		
CH/465	Crecimiento	-	IV	ILSP-010	IV
CH/467	Crecimiento	-	IV	ILSP-015	IV

En este sentido, los pacientes del primer brote procedentes del Municipio de Guayaramerin-Beni con la enfermedad de Chagas oral, fueron infectados con cepas que pertenecen al linaje TcIV.

6.4 Seguimiento del pos tratamiento

Los catorce pacientes posterior al diagnóstico se les realizó el tratamiento con Benznidazol (10mg/Kg de peso) en Diciembre 2010, todos los casos mensualmente se efectuó el seguimiento, las muestras de suero verificaron el descenso de los títulos de anticuerpos contra *T. cruzi* y de esta forma monitorear el tratamiento.

El seguimiento fue durante 8 meses (hasta Agosto 2011) a los pacientes infectados, en la figura 6 se observa seroconversión de los 14 casos, pasado el décimo mes se evidencia una respuesta favorable al tratamiento en todos los casos, los valores obtenidos son menores al valor del cut of 0.380 (± 0.1), ver Anexo (Tabla 1)

Los 14 pacientes que recibieron el tratamiento con Benznidazol, según el género se observa que existe un descenso de los títulos de IgG desde el tercer mes de tratamiento en la mayoría de los casos (Figura 12 y 13), en ambos casos presentan similar comportamiento de la curva, el valor máximo encontrado fue de hasta 2.5 de

absorbancia, asimismo, en tres pacientes se observó que los títulos de IgG disminuyeron lentamente.

Figura 12 Disminución de los títulos de anticuerpos Ig G durante el seguimiento de pacientes Hombres

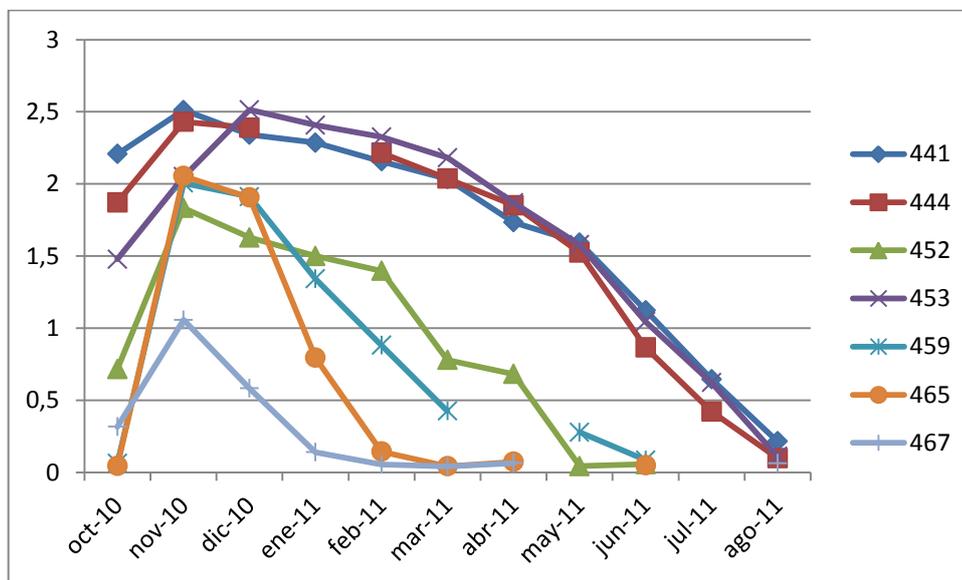
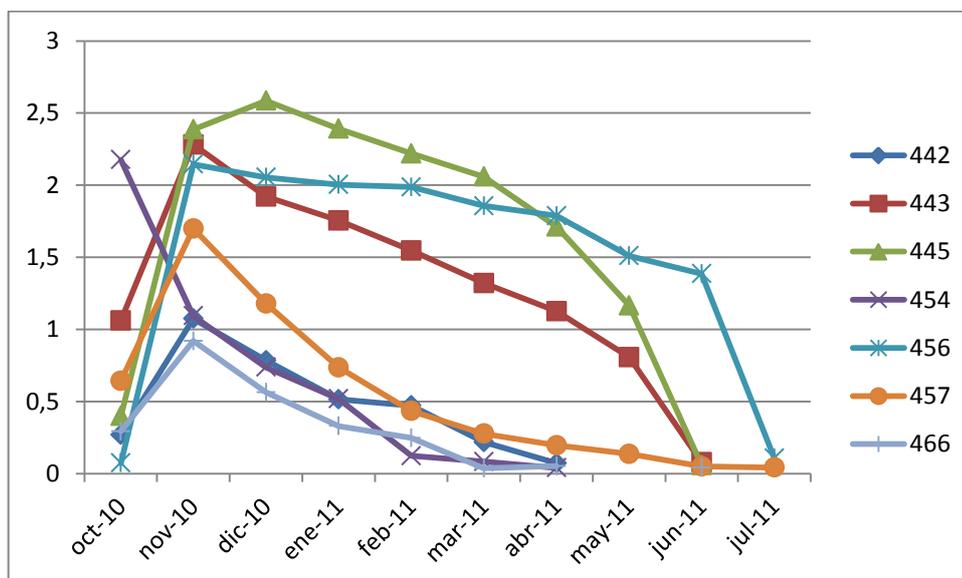


Figura 13 Disminución de los títulos de anticuerpos Ig G durante el seguimiento de pacientes mujeres



7 Discusion

En la enfermedad de Chagas generalmente las vía de infección es de forma vectorial, transfusión de sangre, placentaria sin embargo existe otras rutas menosfrecuentes como los trasplantes de órganos y el consumo de alimentos contaminados por las heces del vector (8). En este sentido, hasta la fecha se han reportado distintos casos de infección por vía oral en la distintas regiones de Latinoamérica, así como en Paraíba-Brasil se reportó en el año 1991 un brote por la ingesta de jugo de caña de azúcar , en el año 2007 se reportó en Venezuela en una escuela de Chacao-Caracas un brote de Chagas agudo por el consumo de jugo de Guava (132), en la amazonia del Perú entre 2006 y 2009 se reportan 7 casos de Chagas agudo, en el norte y noreste de Brasil se identificaron 94 casos relacionados al consumo de jugo de acai o jugo de caña.

En Bolivia hasta el 2009 no se había reportado ningún caso de infección por vía oral de esta parasitosis en las regiones endémicas (La Paz, Cochabamba, Chuquisaca, Tarija, Santa Cruz, Potosí), más aun departamentos no considerados endénicos (Beni, pando y Oruro), hasta Octubre del 2010 en el Municipio de Guayaramerin-Beni, en donde se reportó catorce casos con esta enfermedad por el consumo de un jugo de majo; las muestras fueron enviadas para su confirmación al laboratorio del INLASA y posteriormente hacer la intervención para tomar las acciones necesarias (6).

Durante los últimos cincuenta años, el número de brotes de la enfermedad de Chagas transmitida por el consumo de alimentos parece estar en aumento, afectando sobre todo en las zonas donde la enfermedad no es endémica (133), atribuyen la tendencia al aumento de las epidemias a las oscilaciones de la temperatura por el fenómeno del Niño, es posible que tales condiciones favorezcan el desarrollo y migraciones de las poblaciones de triatominos a otros sitios en donde no existía esta enfermedad (134). Asimismo, el aumento de la actividad del hombre en la Amazonia ya sea accidental o por la explotación agrícola, es probable que interactúe con animales infectados o el mismo vector (135), además el tropismo de los triatominos por algunas plantas como las palmeras podría atribuir una fuente de contaminación más frecuentes y abundantes en estos ambientes (136)(137)

acrecentando de esta forma la infección de esta enfermedad y su diseminación a otras regiones.

7.1 ANALISIS MOLECULAR DE LA TIPIFICACIÓN DTU DE *T. cruzi*

Los individuos de diferentes regiones endémicas en Latinoamérica están infectadas con distintas poblaciones de parásitos, estas se clasificaron en seis unidades discretas de tipificación (DTU) las cuales se denominan TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (139)(61)(62) (71) (73)

Estudios epidemiológicos mostraron que la distribución de TcI y TcII varían geográficamente en las regiones endémicas, es así TcI está ampliamente distribuida en el Norte de Brasil, América Central y Norte América (140)(141)(142), mientras que TcII se encuentra predominantemente en los países del cono Sur de América Latina (143), en Bolivia se ha reportado que prevalece el linaje TcII . Sin embargo los linajes TcIII y TcIV son predominantemente selváticos. Además los linajes TcV, TcVI, TcII generalmente son los casos asintomáticos y se encuentran en distribuidos en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, las muestras asiladas de este brote pertenecían al TcIV presentando los pacientes una sintomatología muy marcada (6)(144).

Para la identificación de los distintos linajes anteriormente nombrados se utilizan generalmente diferentes técnicas moleculares que permiten la detección de la variabilidad genética que permite la distinción entre estas, frecuentemente se utilizan variaciones de la PCR para este fin, se destacan la PCR RFLP (polimorfismo de fragmentos largos de restricción) es una técnica de genotipificación basada en la existencia de polimorfismo de simple nucleótido dentro los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción específicas, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la determinación de linajes de *T. cruzi* que se basan en la amplificación del genoma mitocondrial y nuclear, sin embargo tiene sus inconvenientes, requiere gran cantidad de ADN. (145)(73)(146).

La técnica RAPD, está técnica de amplifica al azar secuencias polimórficas de ADN, amplifica el material genético con ayuda de oligonucleótidos generalmente cortos y de secuencia arbitraria que generan perfiles complejos de bandas (133), la falta de especificidad hace que RAPD no se pueda utilizar para analizar *T. cruzi*

directamente en el tejido infectado ya que los cebadores no pueden distinguir entre el DNA del huésped y del parásito (147)(148), otra técnica (LSSP-PCR) que utiliza cebadores específicos para amplificar una región variable de DNA de los parásitos para luego explorar variaciones en la secuencia del fragmento obtenido en condiciones de baja astringencia, sin embargo aun siendo muy sensible no es capaz de identificar los linajes más importantes de *T. cruzi* DTUs I y II. (149)(150).

Lamentablemente hasta la fecha no existe un protocolo consensuado para la tipificación de los aislamientos, en los últimos tiempos, aumentado la optimización de distintas técnicas de biología molecular con mayor fiabilidad y sensibilidad permitiendo caracterizar poblaciones parasitarias a partir de muestras biológicas de paciente (140)(141).

En el presente trabajo se han utilizado estrategias para la genotipificación de *T. cruzi* con ensayos que tienen como blanco molecular a la secuencia del dominio D7 del gen rRNA 24S y la región intergenica no transcrita del miniexon, ambas permiten la discriminación de las diferentes DTU (151). Para la detección de la subunidad grande (SL miniexon) se realizó la amplificación de la región intergenica del miniexon que utiliza a un grupo de iniciadores TcI y TcII que permite la primera aproximación a la identificación de la DTU según el peso molecular del amplicon de DNA de 350 pb para TcI y 300pb para TcII/TcV TcVI, la ausencia de banda puede atribuir los linajes TcIII/TcIV (10). La región intergenica del RNAr 24S de *T. cruzi* amplificada para la genotipificación, el dominio D7 de gen RNAr 24 S tiene espacios altamente conservados en todos los trypanosomatidos y se han diseñado oligonucleótidos complementarios a estas regiones se acoplan a una región conservada del gen RNA 24S de las cepas, amplificando una zona altamente variable, que permite la aproximación a la identificación de la DTU de *T. cruzi* según el peso molecular del amplicon producido, si se tiene producto de 110 pb se considera TcIII, en caso de 120 pb es TcIV (152).

En el presente estudio nueve muestras se lograron realizar la PCR-SL, en donde no se observaron la presencia de bandas, considerándose las posibilidades de los linajes TcIII o TcIV, en segunda instancia se realizó la PCR-24S, en donde se puso en evidencia que en las muestras procedentes del municipio de Guayaramerin corresponden al linaje TcIV. Para cotejar los resultados se enviaron al laboratorio de

CONICET seis cepas que se lograron aislar a partir de las muestras de los pacientes, se encontraron similares resultados, en este caso se utilizó el análisis de secuenciación del gen de ascorbato dependiente de *haemoperoxidase* (TcAPX).

Este linaje generalmente está presente en el área amazónica llegándose a aislar de seres humanos y primates, se presume ser responsable de los brotes registrados de infección oral de la enfermedad de Chagas aguda en Brasil, existen diferentes hipótesis de la distribución de estos linajes en la amazonia (153). Existe poca información disponible sobre DTU asociados a los casos orales de la enfermedad de chagas, Marcili (2009) encontró los linajes TcI y TcIV están asociados con el consumo de alimentos y son procedentes de primates, triatomíneos y humanos en la amazonia brasileña.(14) Por otra parte, examiné cepas aisladas de pacientes con enfermedad de chagas oral en Santa Catarina-Brasil, encontrando mezclas TcI, TcII TcV (154). En nuestro caso el linaje TcIV asociada con el brote hallado en el municipio de Guayamerín está relacionado con la distribución de este tipo de linaje en la amazonia.

De esta forma, es la primera vez que se identifica que el linaje TcIV está circulando en Bolivia, lo que conlleva a nuevas formas de progresión de la enfermedad, en nuestro medio linaje circulante de TcII es el más prevalente (47), los resultados de este estudio permiten el diseño de proyectos para el control de esta enfermedad, además de considerar la actualización de las investigaciones en la clasificación y distribución geográfica de los linajes que circulan en nuestro medio.

La diversidad genética encontrada sugiere la existencia de al menos dos genotipos diferentes que se producen entre los pacientes por transmisión oral con enfermedad de Chagas en Bolivia (Figura 10), en el análisis de la secuenciación se encontró dos de las seis cepas que presentaban genotipos distintos, lo cual podría involucrar diferentes grados de patogenicidad y respuesta al tratamiento, además existe la posibilidad de que exista un solo vector con poblaciones variadas o diferentes vectores que lleven poblaciones clonales diferentes.

7.2 SEGUIMIENTO DEL TRATAMIENTO A LOS CATORCE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

De los 14 pacientes 8 presentaron inicialmente bajos niveles anticuerpos (Ac) anti-*T. cruzi* después del tratamiento con Benznidazol en la evaluación serológica,

corroborando el diagnóstico clínico y parasitológico descrito durante la fase aguda, en contraste de seis pacientes que presentaban elevados títulos de Ac anti *T.cruzi* pasados 30 días pos tratamiento, los ocho pacientes habían superado la fase aguda, habiéndose instaurado la fase crónica de la infección chagásica con la consecuente detección de un nivel mayor de Ig G específica.

La evolución mostro una negativización de los títulos de anticuerpos en todos los casos, el tratamiento se ha administrado de poco tiempo de haber comenzado la infección (aproximadamente 2 meses), lo que probablemente explicaría su eficacia o la pobre capacidad virulenta de estas cepas asociadas al brote, sin embargo, en comparación a otros individuos se ha observado que el tratamiento es prolongado, los niveles elevados de Ac-anti *T.cruzi* estan mucho más tiempo. (151)(152).

En otros casos algunos pacientes no presentaron anticuerpos contra *T.cruzi* en el primer muestreo, los títulos de anticuerpos aumentaron brevemente después de la infección y luego disminuyo gradualmente después del tratamiento hasta ser negativo en al menos 8 meses (128), a excepción de un paciente, la reducción de anticuerpos después del tratamiento se produjo por un tiempo más, ningún paciente mostro una forma crónica de la enfermedad de Chagas, se traduce en restantes de anticuerpos durante un periodo prolongado (124), esto podría deberse a la rápida intervención del diagnóstico y tratamiento apropiado a los catorce pacientes, sin embargo en pacientes en fase indeterminada y crónica el tiempo de la desaparición de anticuerpos puede ser de más de 2 años, inclusive algunos estudios muestran que la negativización en el título de anticuerpos postratamiento es lenta llegando hasta 4 años(125), en nuestro estudio los 14 casos mostraron una seroconversión en 8 meses como máximo.

8. Conclusiones

- La utilización de métodos moleculares así como la PCR mini exón, 24Sa realizadas en instalaciones del INLASA, permitió identificar en las nueve muestras corresponden al DTU TcIV.
- Las seis cepas aisladas a partir de la muestra de los pacientes fueron enviadas al laboratorio de CONICET, en donde ratifican nuestros resultados de la clasificación, mediante el análisis de secuenciación del gen de ascorbato dependiente de *haemoperoxidase* (TcAPX), las seis cepas pertenecen al linaje TcIV.
- En el análisis de secuenciación se observó en las seis cepas la diversidad genética en el gen *TcAPX*, dos de las seis cepas agruparon de forma diferente, por lo tanto existen dos clones diferentes asociados a esta infección.
- Con respecto al seguimiento del tratamiento de los catorce pacientes, se realizó en el lapso de 8 meses posterior al tratamiento, se verificó mediante la técnica de ELISA, HAI e IFI donde hubo claramente una disminución progresiva de los títulos de anticuerpos contra *T. cruzi* la eficiencia del tratamiento del Benznidazol de los catorce casos en estudio fue exitosa ya que todos fueron curados presentado resultados negativos.

9. Referencia Bibliográfica

1. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;(2):92-100.
2. Anonymous. Control of Chagas disease. Tech Rep Ser 905. WHO, Geneva 2002; p. 1-115.
3. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12):583-588.
4. Chippaux JP, Postigo J, Santalla J, Schneider D, Brutus L. Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans. R. Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):578–584.
5. Unidad de Epidemiología. Programa Nacional de Chagas. Manual de diagnóstico; 2009.
6. Santalla J., Oporto P., Espinoza E., Rios T., Brutus L., “First report outbreak of Chagas disease in the Bolivian Amazonian zone a report of 14 cases of oral transmission of acute *Trypanosoma cruzi* in Guayaramerin, Beni-Bolivia” *BIOFARBO* 19 (2011) (1) Pag.53-56.
7. Guld F, Ramirez JD *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta. Trop.* .2011. 1194-4.
8. Zingales B, Miles MA Cambell DA. Tibayrenc M. Macedo AM,et al The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Racionale Epidemiological relevance and researt applications. *Infect Genet Evol* (2012) :240-253.
9. Anez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, et al. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health* 9(2004): 1319–1326.
10. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83(1996): 141–152.
11. Fernandes O. Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degrave W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian

isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified in to two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2006 :58(6):807-811.

12. Da Silva NN, Clausell DT, Nólíbos H, de Mello AL, Ossanai J, Rapone T, Snell T. [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. Surto epidemico de doença de Chagas comprovável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1968; 10(5):265-76.

13. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051-4.

14. Marcili A, Valente VC, Valente S.A. Junqueira AC, Da Silva FM , Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP., Miles M.A., Teixeira M.M., *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 2009b;39(5): 615-623.

15. Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewia MD, LLewellyn MS, Acosta N, Bhattacharra T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA..Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(6): e1049

16. Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosomacruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *MemInstOswaldo Cruz* (1999) :94: Suppl 1159–164.

17. Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, et al. Different behavior of two *Trypanosomacruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *ExpParasitol* (1998):89: 285–295

18. Breniere SF, Bosseno MF, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, et al. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosomacruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2002) :97: 289–295.

19. RUIZ GUZMAN, José. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. *GacMed Bol.* [online]. 2007, vol.30, no.2 [citado 09 Enero 2013], p.70-73. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101229662007000200015&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1012-2966.
20. Brutus L(1), Schneider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, Chippaux JP. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. 1996: *J Infect Dis* 157: 146-160.
21. Landivar WH, Nakasa T, Tachibana H, Paz KC, Tateno S. Seropositivity to *Trypanosoma cruzi* in blood donors in Santa Cruz, Bolivia. *J Infect Dis* 1992;166: 1464-1465.
22. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:S75–85.
23. James E. Lai, Ellen M. Dotson, Jennifer M. Anderson, Celia Cordon-Rosales, Carlos Ponce, Douglas E. Norris, C. Ben Beard. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;102 Suppl 1:175–200.
24. Guhl, F., Aguilera, G., Pinto, N., Vergara, D., Updated geographical distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna (Reduviidae: Triatominae) in Colombia. *Biomedica* 27,2007(Suppl. 1), 143–162.
25. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review Microbiology*, 1973; 27: 347-383.
26. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2002.; 1:3.
27. García ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parásitology Today*, 1991; 7: 240-244.

28. Miles, M.A., Pavao, M.M, Prata, A., Cedillos, R.A. DeSouza ,A.A., Macedo, V “Do Do Radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (Zymodemas) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease” *Lancet* (1981): 1, 1338-1340).
29. Miles, M.A., Yeo, M., Gaunt. M.W. , Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease. *Parásitology Today*,2003; 7: 140-144.
30. Tibayrenc, M.,.Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol* 2003:Dis 2, 12.
31. Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M.,. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001:31, 1218-1226.
32. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F.,Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G.,.A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104,1051-1054.)
33. Westenberger, S.J., Barnabe, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R.,. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005;171, 527-543.
34. Machado, C.A., Ayala, F.J. “Nucleotide sequences provide evidence of genetic Exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98, 7396-7401.
35. Herrera CP, Guhl F., Falla A., Barges MD, Breniere F. Concordancia de haplotipos propuestos de *Trypanosoma cruzi* con aislamientos de otras regiones de Latinoamérica. *Biomédica.* 2009; 29:1.
36. Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18, 171-176.

37. Roellig, D.M., Brown, E.L., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis* 2008,14, 1123-1125.
38. Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., Pedrosa, A.L., Crema, E., da Cunha Galvao, L.M., Junho Pena, S.D., Macedo, A.M., Chiari, E.,. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 200 ;44, 2167-2171.
39. Sturm, N.R., Campbell, D.A., Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2010;115, 35-43.
40. Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G.,. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol* 2008; 45, 45-52
41. Sturm, N.R., Campbell, D.A.,. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2010; 115, 35-43.
42. Roellig, D.M., Brown, E.L., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Steurer, F.J., Yabsley, M.J., Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis* 2008; 14, 1123-1125.
43. del Puerto, R., Nishizawa, J.E., Kikuchi, M., Iihoshi, N., Roca, Y., Avilas, C., Gianella, A., Lora, J., Velarde, F.U., Renjel, L.A., Miura, S., Higo, H., Komiya, N., Maemura, K., Hirayama, K.,. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4, e687.
44. Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*.2008; 120,60-71.
45. Marcet, P.L., Duffy, T., Cardinal, M.V., Burgos, J.M., Lauricella, M.A., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G.,. PCR-based screening and lineage

identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology* 2006;132, 57-65.

46. Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., Piccinali, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G., Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 2007; 37,1319-1327.

47. Telleria, J., Lafay, B., Virreira, M., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Svoboda, M., 2006. *Trypanosomacruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol* 2006; 114, 279- 288

48. Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H.J., Lewis, M.D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S.A., Gaunt, M.W. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog* 5, e1000410. Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2009;10, 190-212,

49. Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31, 1218-1226.

50. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104, 1051-1054.

51. Fernandes, O., Souto, R.P., Castro, J.A., Pereira, J.B., Fernandes, N.C., Junqueira, A.C., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Degraeve, W., Zingales, B., Campbell, D.A., Coura, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 1998^a;58, 807 -811.

52. Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001;31, 1218-1226.
53. Mendonca, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Coura, J.R., Zingales, B., Fernandes, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 2002;124, 177-184.
54. de Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Goncalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R., Pena, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006; 2, e 24.
55. Westenberger, S.J., Barnabe, C., Campbell, D.A., Sturm, N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005; 171, 527-543.
56. Brisse, S., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;30, 35-44.
57. Ferrer E., Da Conceição F., Campioli P., Rivera M G, López M., Lares M., Medina M., Morocoima A., Herrera L. Estandarización de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo Valencia, Edo. Carabobo Venezuela. 2008, I: 532-536.*
58. Fernandes, O., Sturm, N.R., Derre, R., Campbell, D.A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1998b ;95, 129-133.
59. Burgos, J.M., Altchek, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M., Seidenstein, M.E., Piccinalli, R., Freitas, J.M., Levin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 2007; 37, 1319-1327.

60. Souto R.P and Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol 1993;62, 45-52
61. Molina, J. A., Gualdron, L. E., Bochero, H. L., Olano, V., Barrios, D., Molina, J. A., Gulh, F. Revisión de la distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatomíneos (*Reduviidae: Triatominae*) en Colombia. Biomédica 2000;20: 344-360
- 62 . Schofield, C. J. y Dujardin, J. P. 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actualidades Biológicas, Medellín. 2007; 70: 183-197.
63. Beltrán, M., Bermúdez, M., Forero, M., Ayala, M. Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de Colombia. Biomédica 2005;25: 527-532.
64. Organización Mundial de Salud (OMS). 2002. Control of Chagas disease, Second report of the WHO Expert Committee, Thechnical Report Series. 905: 39-40.
65. Luquetti, A. O., Dias, J. C., Prata, A. 2006. Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Parasitol. Res. 99:379-383.
66. Bacal, F., Silva, C. P., Pires, P. V., Mangini, S., Fiorelli, Al., Stolf, N. G., Bocchi, E. A. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. Clin. Transplant. 2010; 24: E29-34.
67. Atias A, Neghme A. Parasitología Clínica. Santiago: Publicaciones técnicas Mediterráneo, 1984.
68. Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals Rev Soc Bras Med Trop. 2006 Jul-Aug; 39 (4):370-5.
69. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, Dionne Bezerra Rolim, Roberto da Justa Pires Neto, Dina Cortez Lima Feitosa Vilar, José Otho Leal Nogueira, Margarida Maria de Lima Pompeu, Maria Jania Teixeira, Anastácio Queiróz de Sousa. Microepidemia de Doença de Chagas Aguda por Transmissão Oral No Ceará. Rev Soc Bras Med Trop. 2002 ; 10 (4):35-55.

70. Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Vigilância em Saúde e Gestão de Doenças. Projeto de Doenças Comunicáveis(PAHO/HSD/CD/530.09) Projeto de Saúde Pública Veterinária (manuais técnicos Series, 12) “Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da DCA transmitida por alimentos” 2009.
71. Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas Disease Outbreak Associated With Oral Transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 May-Jun; 41(3):296-300.
72. João Marcos Barbosa-Ferreira; Jorge Augusto de Oliveira Guerra; Franklin Simões de Santana Filho; Belisa Maria Lopes Magalhães; Leíla I.A.R.C. Coelho; Maria das Graças Vale Barbosa Acometimento cardíaco em Casos de Doença de Chagas Aguda da Amazônia *Arq Bras Cardiol*; jun. 2010; 94(6): 147-149,
73. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Nov;104(7):1051-4.
74. Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, et al., Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jun 15;4(6):e711
75. Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA, Santana Filho FS, Magalhães BM, Coelho LI, Barbosa MG Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region. *Arq Bras Cardiol.* 2010 Jun;94(6):147-9.
76. Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute Phase of Chagas Disease in the Brazilian Amazon Region: Study of 233 Cases From Pará, Amapá and Maranhão Observed Between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Nov-Dec;41(6):602-14
77. Benchimol Barbosa PR. The Oral Transmission of Chagas' Disease: an Acute Form of Infection Responsible for Regional Outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006 Sep 10;112(1):132-3.

78. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OFICINA SANITARIA PANAMERICANA. Investigación epidemiológica de campo: aplicación al estudio de brotes. Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades. 2010.
79. Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (supl 3):113-7, 2006.
80. Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernández O. Analysis of an Acute Chagas Disease Outbreak in the Brazilian Amazon: Human Cases, Triatomines, Reservoir Mammals and Parasites. *TransR Soc Trop Med Hyg.* 2009 Mar;103(3):291-7.
81. Benchimol Barbosa PR. The Oral Transmission of Chagas' Disease: an Acute Form of Infection Responsible for Regional Outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006 Sep 10;112 (1):132-3.
82. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr;15(4):653-5.
83. Henrique de Barros Moreira Beltrão, Matheus de Paula Cerroni, Daniel Roberto Coradi de Freitas, Ana Yecê das Neves Pinto, Vera da Costa Valente, Sebastião Aldo Valente, Elenild de Góes Costa, and Jeremy Sobel Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007 *Trop Doct* 39(4): 231—232.
85. Storino R, Jorg ME. Vías de infección y aspectos clínicos. In: Storino R, Milei J (orgs) *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Doyma Argentina, p. 132-141, 1994.
86. Alvarenga NJ, Marsden PD. Estudos sobre a persistência da infectividade do *Trypanosoma cruzi*. I. Efeito da temperatura sobre a infectividade de flagelados da amostra peruana de *T. cruzi* obtidas de fezes de triatomíneos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 9: 283-287, 1975.

87. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Junqueira AC, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl1:47-56.
88. Jorge Antonio Vilca Ugaz. "Descripcion del brote de la enfermedad de Chagas Agudo por posible Transmision Oral ocurrido en el municipio de Guayaramerin (2011) Pag: 12-45.
89. Iniguez Montenegro, C. Fase aguda de la Enfermedad de Chagas, signos y síntomas más llamativos. *Rev. Med. Cordoba (Argentina)* 1969: 57: 84.
90. Parada H. Carrasco HA, Anez N Fuenmayor C et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas disease: A clinical, parasitological and histopatological study. *Int J Cardiol*. 1997; 60:49-54.
91. Chiale P, Rosebaum MB. Clinical and pharmacological characterization and treatment of potentially malignant arrhythmias of chronic chagasic cardiomyopathy. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer- Verlag KG, Berlin, 1989; 601-620.
92. Guimaraes A. C. Novos conceitos sobre a fisiopatologia da insuficiencia cardiaca :disfuncao diastolica e sistolica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 1988; 51: 93 – 98
93. Rezende, J. M; Rassi, A. Manifestacoes digestivas na fase aguda da Doenca de Chagas, EnRaia, A. A.: Manifestacoes digestivas da molestia da chagas. Sao Paulo, sarvier, 1983; 97: 107.
93. Rezende, J. M.; Moreira, H. Megacolon chagastico. En Porto, J. A. F. Clinica das doencas inpruebainais. Liv. Atheneu, Rio de Janeiro, 1976: 451- 474.
94. Ferreira, A.W., y Avila, S.L.M. Diagnostico Laboratorial das principais doencas infecciosas e auto-inmunes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1996;38(4), 264).
95. Apt, B.W., Heitmann, G.I., Jercic, L.M.I., Jofre, M.L., Muñoz, C, Noemi, H.I., San Martin, V., Sapunar, P.J., Torres, H.M., y Zulantay, A.I Laboratory diagnosis of Chagas disease .*Revista Chilena infectologia*, 2008; 25(5), 380-383.

96. Schmunis, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. *Transfusion*; 1991; 31, 547-557.
97. Castro, A.M., Luquetti, A.O., Rassi, A., Rassi, G.G., Chiari, E., y Galvao, L.M.C. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *trypanosoma cruzi*. *Parasitological Research*, 2002; 88, 894-900.
98. Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M., Chiari, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1989; 22, 19-23.
99. Avila, H.A., Borges, J., Thiemann, O., de Paiva, E., Degraeve, W., Moresl C.M., y Simpson, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnoses. *Journal of clinical microbiology*, 1993; 31(9), 2421-2426.
100. Flores-Chavez, M., Cruz, I., Rodriguez M., Nieto, J., Franco, E., Garate T., y Cañavate, C. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2010; 28(5), 284-293.
101. Salvado, E., Pinazo, M.J., Muñoz, J., Alonso, D., Naniche, D., Mayor, A., Quinto, L., y Gascon, J. Clinical presentation and complications of *Plasmodium falciparum* malaria in two populations: Travelers and immigrants. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2008; 26, 282-284.
102. Verani, J.R., Setz, Gilman, R.H., La Fuente, C., Galdos-Cardena, G., Kawai, V., de la Fuente, E., Ferrufino, L., Bowman, N.M., Pinedo-Cancino, V., Levy, M.Z., Steurer, F., Todd, C. W., Kirchhoff, L.V., Cabrera, L., Verastegui, M., y Bern, C. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid test for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2009; 80, 410-415.

103. Sosa-Estani, S., Viotti, r., y Segura Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009;104, 167-180.
104. Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin M.J., y Freilij, H. Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003;52,441-449.
105. PERRONE C, TRINA M., 2006, Manual de Laboratorio: Técnicas de Diagnóstico Aplicadas a Hemoparásitos de Interés Veterinario, Venezuela. Consultado en abril de 2007. Disponible en el World Web: www.reddehemoparasitos.org
106. Tavares, L.; Eleizalde, M.; Bethencourt, A. Elisa para el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina. Red de identificación y diagnóstico molecular de hemoparasitos. Consultado noviembre 2007. Disponible en el World Web: www.reddehemoparasitos.org/protocolos/ELISA.pdf
107. Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Pacheco Souza JM, de Rocha Cavalheiro J, Yanovsky JF and Guimaraes MCS. Three years of collaboration of the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Américas: an appraisal. *Bull. Panam. Health Org.* 1986;20, 233-244.
108. BENTI, R.; GIL, J. Zaragoza España. Inmunofluorescencia. Servicio de imágenes medicas. Consultado en noviembre 2007. Disponible en el World Web: www.imagenmed.com/especiales/ie9/if.html.
109. Pavia, P.X., Roa, N.L., Uribe, A.M., y Puerta, C. Using S35-S36 and Tc H2AF-R primer –based PCR test to follow-up a Chagas disease patient who had undergone a heart transplant. *Biomedica*, 2011; 31, 178-184
110. Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favoloro, R.R., Frilij, H., y Schijman, A.G. Accurate real-time PCR strategy for Monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *plos neglected tropical disease*, 2009;3, e419.

111. Brito,C., Cardoso, M.A., Wincker, P., y Morel, C.M.A Simple protocol for the cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood smears and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease .Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2002; 88(1), 171-172.
112. Elías, C; Vargas, N; Zingales, B; Schenkman, S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2003; 129: 1-9.
113. García, L; Rodrigo, J; Sánchez, P; Ramos, S; Suárez, C. Extracción de ADN con resina Chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp, 2004, 55: 139-144.
114. Moser D, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. J. Clin Microbiol. 1989; 27: 1477-82
115. Ferrer E. Da Concenciao F. Campioli P., Rivera M G.Lopez M., Lares M., Medina M., Morocoima A.,Herrera L. “Estandarizacion de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi*” Memorias del VI Congreso de Investigacion en la Universidad de Carabobo Valencia ,Edo. Carabobo Venezuela,2008;532-536.
116. Morocoima A., Tineo-Brito E., Ferrer E., Herrera L., Nuñez M. Caso agudo de Enfermedad de Chagas en Anzoátegui, Venezuela: Caracterización parasitológica y molecular del aislado. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 2008; XLVIII (2): 147-152
- 117.Kirchhoff, L; Votava, J; Ochs, D; Moser, D. Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol, 1996; 34: 1171- 1175.
118. Russomando, G; Figueredo, A; Almiron, M; Sakamoto, M; Morita, K. Polymerase Chain reaction- Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J Clin Microbiol, 1992; 30: 2864-2868.
119. Bern C, Montgomery SP, Herwald BL, Evaluation and treatment of Chagas Disease in the United States: A systematic review. *JAMA*. 2007; 298: 2171-2181.

120. Fragata A., Luquetti A., Prata A. *et al.* Etiological treatment of Chagas Disease. *Parasitol Today* 1997; 12: 127-130.
121. Schenone H., Contreras M., Solari A., García A., Rojas A., Lorca M. Tratamiento con nifurtimox en niños con infección chagásica. *Rev Med Chile* 2003; 1089-1090.
122. Facundo Garcia-Bournissen, Jaime Altcheh, Alice Panchaud, Shinya Ito. Drug therapy. Is use of nifurtimox for the treatment of Chagas disease compatible with breast feeding? A population pharmacokinetics analysis. *Arch Dis Child* 2010;95: 224-228.
123. Apt W, Heitman I, Jercic MI, Jofré L, Muñoz P, *et al.* Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte VI. Tratamiento antiparasitario para enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infectol* 2008; 25: 384-9.
124. Cerisola J. Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. *Bol Chile Parasitol* 1969; 24: 54-9.
125. Caneado R. Tratamiento etiológico do doença de Chagas pelo benznidazol. Capítulo 19. Libro *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* Eds. Brener Z, Andrade Z. y Barral-Neto M. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; 389-405.
126. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 574-82.
127. Sánchez O, Mora M., Basombrio M. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 2005; 115: 668-72.
128. WHO. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 2000; 905 Geneva
129. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocci G, Petti M, Álvarez M, *et al.* Long-term cardiac outcome of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006; 144: 724-34.

130. Bustamante J, Bixby L, Tarleton R. Drug induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 2008; 14: 542-50.
131. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos I, Diaz M, Levin M, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasites loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: 419-29.
132. Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, et al. BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the benznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) *Am Heart J* 2008; 156: 37-43.
131. Soares VA, Marsden PD, Johnson C. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1986 Oct-Dec;19(4):233-7. Effect of desiccation of triatoma feces on the survival of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1986 Oct- Dec;19(4):233-7.
132. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12):583-588.
133. PAHO (2009) ENFERMEDAD DE CHAGAS .Guía para la vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de chagas aguda transmitida por alimentos. Available :www.paho.org.
134. Sanchez LV, Ramirez JD .Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitol* ,2012; 139: 1–13.14.
135. Alarcón de Noya B, Di´az-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at an School in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*, 2010; 201:1308–1315.
136. Anez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, et al. Predominance of lineage I among *Trypanosomacruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health*, 2004; 9: 1319–1326.
137. Ruiz-Sanchez R, Leon MP, Matta V, Reyes PA, Lopez R, et al. *Trypanosomacruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic

chagasiccardiopathy patients belong to *Trypanosomacruzi* I. MemInstOswaldo Cruz ,2005; 100: 281–283.

138.Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosomacruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. MemInstOswaldo Cruz, 1999; 94: Suppl 1159–164.

139.Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro MdNC, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R The Centennial of the Discovery of Chagas Disease: Facing the Current Challenges. PLoS Negl Trop Dis ,2010;4(6):e645. doi:10.1371/journal.pntd.0000645.

140. Duffy T., Schijman A., Muschietti J. “Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*” (2010) Pag: 145-159

141. Miles,M.A., Pova, M.M., Prata, A., Cedillos, R. A., Desouza, A.A., Macedo, V. “Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease “ Lancet, 198; 1,1338-1340.

142. Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. Kinetop Biol Dis 2003;2:12.

143. James S., and Felipe G. Geographical distribution of Chagas disease. : New American Trypanosomiasis Chagas disease” El sevier ,2010; Cap: 5, 211-215

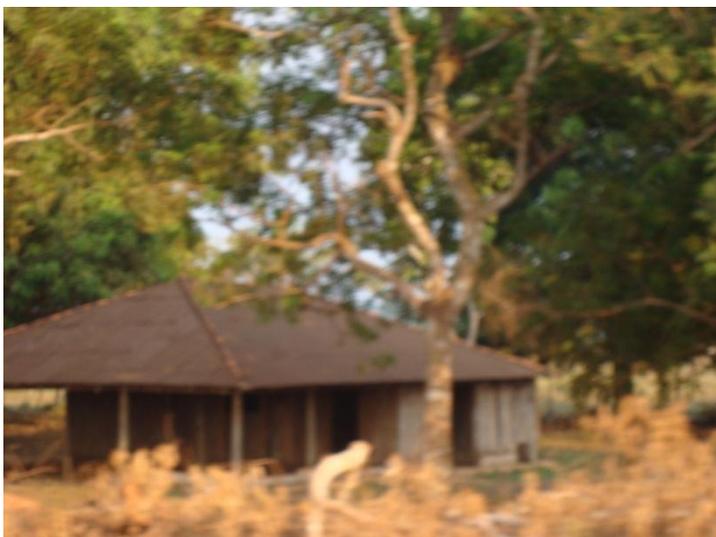
144. Marcet PL, Mora MS, Cutrera AP, Jones L, Gurtler RE, Kitron U, Dotson EM. Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago Del Estero, northern Argentina. Infect. Genet.Evol. 2008;8:835–846.

145. Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. Mol Biochem Parasitol 2000; 111:95-105.

146. Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98: 7396-401.

147. Herrera CP, Guhl F., Falla A., Barges MD, Breniere F. Concordancia de haplotipos propuestos de *Trypanosoma cruzi* con aislamientos de otras regiones de Latinoamérica. *Biomédica*. 2009; 29:1.
148. James S. and Felipe G. "Geographical distribution of chagas disease. In *New American Tripanosomiasis Chagas disease*" Elsevier, 2010; Cap: 5, 211-215.
149. Fitzpatrick S, Feliciangeli D, Sanchez-Martin M, Monteiro F, Miles MA. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008; 24: e210.
150. Harry, M., Dupont, L., Romaña, C., Demanche, C., Mercier, A., Livet, A., Diotaiuti, L., Noireau, F., Emperaire, L.,. Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*), Chagas' disease vector in Brazil. *Infect. Genet. Evol.*, 2008^a; 8, 672–675. 701.
151. Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M.- Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A.J., et al. "Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids". *Int. J. Parasitol*, 2005; 35, 225-223.
152. Telleria, J., Lafay, B., Virreira, M., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Svoboda, M.,. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol*, 2006; 114, 279-288.
153. Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Carrasco, H., Lewis, M., Yeo, M., et al. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit i reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009; 5:e1000410.
154. Machado, C.A., Ayala, F.J. "Nucleotide sequences provide evidence of genetic Exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001; 98, 7396-7401.
155. Prata, A. "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease". *Lancet Infect. Dis.*, 2001; 1-92-100

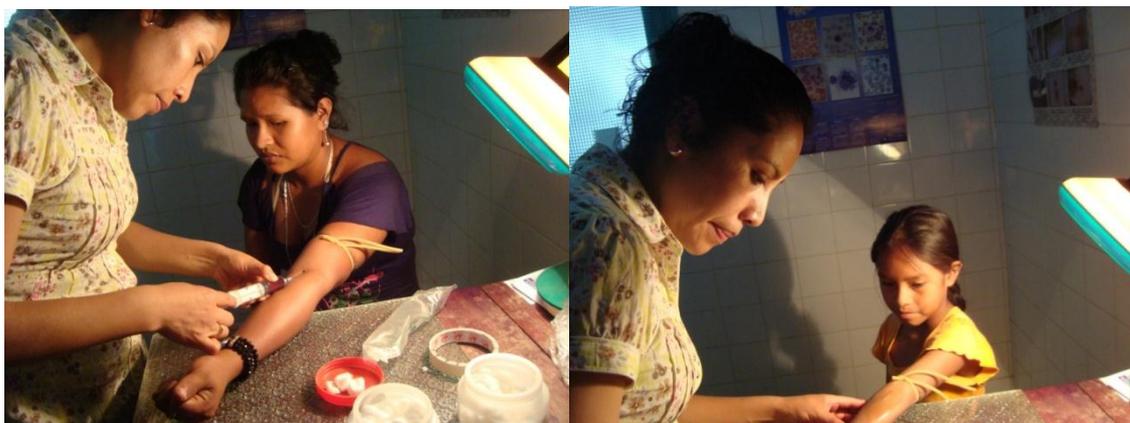
ANEXOS



Guayaramerin –San Miguel



Personal de la Red de Salud 08 GUAYARAMERIN
Centro de Salud "San Gabriel"



Toma de Muestra a los pacientes con Chagas oral



Muestras recolectadas para su análisis

