



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN ENSAYO ELISA UTILIZANDO
LAS PROTEÍNAS EXCRETADAS Y SECRETADAS DE LAS FORMAS
EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*, PARA EL DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
(MODALIDAD: INVESTIGACIÓN)


Lcda. Milagros Del Valle Figueroa Lara

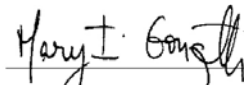
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA
APLICADA, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

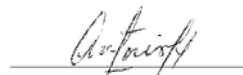
CUMANÁ, 2009

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN ENSAYO ELISA
UTILIZANDO LAS PROTEÍNAS EXCRETADAS Y SECRETADAS DE LAS
FORMAS EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*, PARA EL
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

APROBADO POR:


Prof. Marióga Berrizbeitia (PhD)


Dra. Mary Isabel Gonzatti
JURADO


Dr. Antonio Morocoima
JURADO

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52
APÉNDICE.....	64
Hoja de Metadatos.....	85

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso y a la Virgen del Valle, por permitirme existir, iluminar mi camino y darme la oportunidad de conocer personas valiosas que me guiaron e impulsaron al logro de otra de mis metas.

A mis padres: Freddy y Pastora, compañeros inseparables, por sus sabios consejos y darme ejemplo de humildad, sencillez, deseo de superación y constancia.

A mi hermano Freddy Orlando, por estar siempre allí y ser mi amigo incondicional.

A mis amigos, especialmente a Erika Hannaoui y Arleth Pozo por los gratos momentos que pase en su grata compañía, y por darme ánimos en los momentos que lo necesité.

A la memoria de mi abuelo Orlando y mi tío Enrique, dos seres excepcionales, quienes en vida contribuyeron de alguna forma al logro de este sueño con todo su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A mi tutora Dra. Mariolga Berrizbeitia, no solo por guiarme académicamente, sino por brindarme su amistad, confianza, tenerme paciencia, y brindarme todo el apoyo y colaboración indispensable para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los investigadores del Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre: los profesores Antonio Maldonado, Luz Bettina Villalobos, Jesús Bastardo y a la Sra. Luz Coronado, por su amistad y cariño.

A los investigadores del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, en especial a la Profa. Alicia Jorquera y a la TSU Leomerys Romero por permitirme llevar a cabo el entrenamiento necesario para desarrollar la parte experimental de mi tesis, además de su amistad y cariño.

A la gerencia y el personal del Laboratorio Clínico Universitario, Rental Sucre, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por brindarme el apoyo y colaboración indispensables para llevar a feliz término este trabajo de investigación.

Al profesor Jesús Fajardo por su colaboración en el análisis estadístico.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para culminar con éxito este trabajo de investigación.

¡Infinitas gracias!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y concordancia del ensayo ELISA utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa AU, con sueros de referencia de la enfermedad de Chagas, a diferentes puntos de corte	27
Tabla 2: Media, desviación estándar (DE), densidad óptica (DO), especificidad y sensibilidad estimada para grupos de sueros evaluados con ELISA-ESEA	29
Tabla 3. Seroprevalencia de la infección por <i>T. cruzi</i> en diferentes centros poblados del municipio Montes, para la validación de la prueba ELISA-ESEA.	35
Tabla 4. Asociación entre la seropositividad a <i>T. cruzi</i> y la edad de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.....	36
Tabla 5. Asociación entre la seropositividad a <i>T. cruzi</i> y la ocupación de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.	38
Tabla 6. Asociación entre la seropositividad a <i>T. cruzi</i> y el tiempo en el cual los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre, vieron al vector por última vez.....	40
Tabla 7. Asociación de la seropositividad a <i>T. cruzi</i> y haber habitado viviendas con paredes de bahareque, en individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.	41
Tabla 8. Asociación de la seropositividad a <i>T. cruzi</i> y el tiempo de residencia de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Separación electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de antígenos de excreción/secreción de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , cepa AU, visualizados con azul brillante de Coomassie.....	22
Figura 2. Representación del Western blot de las proteínas ESEA separadas por SDS-PAGE.....	24
Figura 3. Titulación de la concentración de ESEA, anticuerpo primario y conjugado (1/32000) de la prueba ESEA-ELISA, cepa AU.....	26
Figura 4. Curva ROC para ESEA-ELISA a diferentes puntos de corte.....	28
Figura 5. Distribución de la seroprevalencia de la infección por <i>T. cruzi</i> , obtenida mediante la utilización de ELISA-ESEA, en individuos de los diferentes centros poblados analizados del municipio Montes, estado Sucre 2008.....	31
Figura 6. Distribución de la seroprevalencia de la infección por <i>T. cruzi</i> , obtenida mediante la utilización de ELISA-ESEA y HAI, en individuos de los diferentes centros poblados analizados del municipio Montes, estado Sucre 2008.....	32

RESUMEN

En el siguiente trabajo se estandarizó una prueba de ELISA indirecta, utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de las formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (ESEA), lo cual no ha sido previamente descrito. Los antígenos ESEA fueron obtenidos del sobrenadante del medio de cultivo *Schneider's* sin suero fetal bovino, al cuarto día de cultivo axénico, siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (2006). Una vez determinada la concentración de la proteína por el método de Bradford, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot para identificar las bandas inmunogénicas. Para la estandarización del ELISA indirecto se realizaron titulaciones de la concentración de ESEA a utilizar, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y número de lavados. Las diferentes concentraciones del antígeno fueron incubadas con un pool de sueros previamente confirmados como positivos y negativos por tres métodos serológicos diferentes para la enfermedad de Chagas (IFI, HAI y ELISA). Las condiciones que permitieron obtener una mejor discriminación entre el control positivo y negativo para cada uno de los pasos de la prueba fueron: proteína 5,0 µg/ml, anticuerpo primario (pool de sueros positivos y negativos) 1/400, anticuerpo secundario 1/32000, número de lavados 4. La densidad óptica obtenida para el pool de sueros positivos y negativos fue de 1,753 y 0,214, respectivamente, lo que permitió una proporción entre el control positivo y negativo de 8. Por su parte, la electroforesis en gel de poliacrilamida mostró dos bandas de 60 y 66 Mr, de las cuales la de 60 Mr fue reconocida por el pool de sueros positivos en el Western blot. Una vez lograda la estandarización del ESEA-ELISA, se procedió a determinar la sensibilidad (98%) y especificidad (88%) de dicha prueba, para así ofrecer un test altamente sensible, específico y novedoso, que se espera contribuya a un diagnóstico certero y oportuno de la enfermedad de Chagas en el estado Sucre. Para la segunda etapa de este estudio se validó el test estandarizado en 12 centros poblados del municipio Montes, confirmando los resultados obtenidos con hemaglutinación indirecta (HAI), a fin de proporcionar cifras actuales y oportunas de seroprevalencia en ésta región, utilizando además una técnica novedosa y relacionando los resultados obtenidos con las variables epidemiológicas, se analizaron 310 individuos de los cuales 138 eran hombres (44,52%) y 172 mujeres (55,48%), con edades comprendidas entre 1 y 78 años, y fueron analizadas 72 casas, obteniéndose como resultados una seroprevalencia de 7,10%, los centros poblados más afectados fueron San Salvador, Los Dos Ríos y El Potrero con 1,30% respectivamente, con la finalidad de evaluar la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y los factores de riesgo para la transmisión vectorial, fue aplicada una encuesta epidemiológica a los sujetos participantes en el estudio, resultando asociados ($p < 0,05$) a la seropositividad a *T. cruzi*: edad (> 60 años), ocupación (agricultura), persistencia en casas de bahareque, tiempo de residencia en la vivienda actual (> 10 años) y tiempo de haber visto al vector (> 5 años), el hallazgo de un caso en un joven de 14 años es indicativo de transmisión vectorial activa. Las proteínas ESEA representan una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que no requieren de procesos químicos de purificación, además los antígenos provenientes de las formas epimastigotes son de producción relativamente fácil y pueden ser generados en laboratorios de escasos recursos.

Palabras o frases clave: epimastigotes, ELISA, proteínas de excreción/secreción.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis descrita por primera vez por Carlos Chagas (1909), sin embargo, estudios paleoparasitológicos indican su existencia desde hace más de 2000 años al ser encontrado ADN del parásito principalmente en momias precolombinas en Chile y Perú. Posterior al período precolombino, la enfermedad se dispersó por todo el continente, a través de focos de enzootia silvestre y algunos focos aislados del ciclo doméstico, alcanzando su ápex durante su descubrimiento en el siglo XX (1,2). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen alrededor de 16-18 millones de personas infectadas, 100 millones están a riesgo, 50 mil mueren cada año por la infección, en los 18 países endémicos que abarcan desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (3).

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual pertenece al reino: Protista, subreino Protozoo, phylum Sarcomastigophora, sub-phylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *T. cruzi*. Análisis de isoenzimas y de biología molecular evidencian 2 subgrupos genéticos designados como linaje 1, predominante en el ciclo doméstico en Colombia, Venezuela y América Central, responsable de cardiomiopatías, y linaje 2 de ciclo selvático predominante en Brasil, Bolivia, Chile y Argentina, responsable de cardiomiopatías y visceromegalias, ambos linajes son patógenos para el hombre (4,5).

T. cruzi posee un ciclo de vida digenético, ya que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares: uno vertebrado y otro invertebrado, es capaz de sobrevivir a temperaturas que oscilan entre 24-28 °C (triatominos y cultivos axénicos) y 36-37 °C (sangre de mamíferos), el pH ideal se encuentra entre 7,2-7,3 (sangre de mamíferos, luz del tubo digestivo de triatominos). En términos de nutrición, puede sobrevivir en sangre o medios de cultivo pobres en nutrientes por varios días a adecuadas condiciones de temperatura y pH (6,7,8).

T. cruzi es un protozooario hemoflagelado, el cual metaboliza glucosa y otros azúcares, realizando una fermentación aeróbica con excreción de ácidos orgánicos, posee tropismo por el componente graso, indicando que este microhábitat le proporciona los compuestos necesarios para desarrollarse a nivel intracelular. Puede adaptarse a diferentes medios de cultivo que contengan extractos de cerebro, corazón, hígado en pasta, amortiguador de fosfatos, glucosa y algún derivado del grupo hemo. Es capaz además, de sintetizar algunos aminoácidos y bases como aspartato, alanina, glutamato y pirimidina, más no consigue realizar síntesis de purinas y esteroides, por lo que lo obtiene de sus hospederos. Más del 40% de su peso corresponde a proteínas y aminoácidos (principalmente alanina) estando demostrada su actividad de proteinasa, involucrada en su crecimiento, reproducción, diferenciación, adhesión y penetración (6,8).

Morfológicamente, T. cruzi presenta tres estadios evolutivos, que se clasifican según la forma general de la célula (esférica, piriforme o alargada), posición entre el núcleo y el kinetoplasto (anterior, posterior o lateral) y la salida del flagelo (central o lateral) (9). De acuerdo a las características previamente descritas, el parásito presenta 3 formas evolutivas diferentes: los epimastigotes que miden de 20-40 x 2 μm y en los que el kinetoplasto y la base del flagelo se sitúan por delante o a un lado del núcleo. Pueden dividirse por fisión binaria longitudinal en el tubo digestivo del vector y en cultivos axénicos, y no se encuentran en sangre periférica. Los amastigotes, que presentan una forma redonda u ovoide, miden de 2-4 μm , carecen de flagelo libre, el núcleo es muy visible y el kinetoplasto grande. Estas formas evolutivas pueden dividirse por fisión binaria en el hospedero y se localizan en el interior de las células de cualquier tejido, especialmente en las células del sistema fagocítico mononuclear y las fibras musculares. Los tripomastigotes que poseen una forma elongada con el kinetoplasto situado posterior al núcleo, su flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo creando una imagen de una membrana ondulante. Esta forma evolutiva se encuentra en la sangre del hospedero vertebrado, la ampolla rectal del hospedero invertebrado y en cultivos celulares (4,9,10).

La infección por *T. cruzi* es transmitida principalmente de manera vectorial (80-90%) en áreas tradicionalmente endémicas, por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. Estos insectos, se infectan al ingerir sangre de un hospedero infectado que contiene las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Una vez en el estómago del insecto, los tripomastigotes se redondean formando amastigotes; a mitad del intestino se transforman en epimastigotes para finalmente, alrededor de dos semanas, llegar al recto en donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos (11). La infección en mamíferos se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando los tripomastigotes metacíclicos en sus heces y orina. El parásito entra en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la picadura) o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Una vez en el torrente sanguíneo los parásitos invaden a los macrófagos, en donde pierden el flagelo y se transforman en formas redondeadas (amastigotes) y se comienzan a dividir activamente por fisión binaria, rompen estas células y pasan nuevamente a la sangre transformándose en tripomastigotes, los cuales alcanzarán los órganos blanco como la musculatura lisa del corazón, el sistema digestivo y nervioso. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con tripanosomas circulantes (10, 12).

La enfermedad también puede transmitirse mediante transfusión sanguínea (5-20%), en países como Argentina, Brasil y Chile se observan de 1,4 – 18% de casos, sin embargo, en Bolivia alcanza un 48%, también puede haber transmisión por trasplante de órganos, vía congénita (0,5-8%), accidental en el laboratorio y en raros casos por ingestión de alimentos contaminados (13,14,15,16,17). En relación a esta última forma de infección, en Navegantes, Santa Catarina, Brasil fueron reportados 25 casos agudos de la enfermedad de Chagas, al ingerir zumo de azúcar contaminado con las heces de triatominos infectados por *T. cruzi*. Recientemente y por primera vez, se describió este tipo de transmisión en Venezuela, la cual ocasionó un brote de infección aguda al ingerir jugo de guayaba contaminado con los vectores o sus productos en la escuela

Andrés Bello (municipio Chacao) y otro brote en Chichiriviche (estado Vargas) (18). Una posible explicación para este tipo de transmisión sería por la ingestión de alimentos contaminados por triatominos, sus heces o por secreciones de las glándulas anales de *Didelphis marsupialis*, se ha reportado que el parásito se encuentra viable en leche, sangre de mamíferos, carne cruda y caldo de caña por algunas horas a temperatura ambiente, prolongándose por días o semanas a bajas temperaturas (19).

La infección por *T. cruzi* está caracterizada por tres etapas clínicas diferentes: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda se presenta principalmente en niños, generalmente asintomática, sólo entre 1 y 2 % de los casos presentan síntomas que se asemejan a una infección viral. Durante esta fase puede aparecer una lesión focal en el sitio de picadura del insecto denominada chagoma; cuando la puerta de entrada ha sido la conjuntiva, se presenta un edema no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños que característicamente es unilateral conocido como signo de Romaña. La fase indeterminada puede extenderse por más de 20 años y durante esta etapa los enfermos no presentan sintomatología y la parasitemia es baja, pero son detectados anticuerpos específicos de la enfermedad. La fase crónica se presenta en aproximadamente el 30% de los casos y de 10 a 20 años después de la infección inicial, ésta se caracteriza por complicaciones cardíacas y complicaciones a nivel del tracto digestivo con dilatación del esófago (megaesófago) y dilatación del colon (megacolon) (12).

El diagnóstico de certeza de la enfermedad de Chagas depende de la fase en la cual se encuentre la persona infectada, durante la fase aguda la parasitemia es generalmente elevada, por lo que suelen utilizarse métodos parasitológicos directos: como examen al fresco, extendido coloreado, xenodiagnóstico y hemocultivo. Estos dos últimos son laboriosos, complicados y útiles solamente en esta fase de la infección. Durante la fase crónica e indeterminada debido a que la parasitemia disminuye, son los métodos serológicos los que ofrecen la mejor herramienta, entre los cuales se encuentran: la hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), Western blot

(WB), el ensayo inmunoenzimático ligado a una enzima (ELISA) y el ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) (10).

A pesar de que una gran cantidad de pruebas serológicas han sido desarrolladas y estandarizadas, hasta el momento no existe un ensayo estándar de oro para la enfermedad de Chagas, por tal motivo la Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda el uso de por lo menos de dos ensayos serológicos diferentes en paralelo para el diagnóstico de esta enfermedad (20).

La prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha funcionado con éxito durante la fase aguda de la enfermedad, para seguir casos de infección congénita y por transplantes de órganos. En la fase crónica de la enfermedad, la técnica presenta 100% de especificidad, sin embargo, la sensibilidad presenta resultados variables. Se requieren elevados volúmenes de sangre, debido a los niveles subpatentes de la parasitemia presentes en los pacientes (21). La utilidad de la PCR depende de la fase en la cual se encuentra el individuo, si los individuos reclutados para esta prueba son sólo aquellos que hayan dado resultados positivos por pruebas parasitológicas directas, entonces los resultados de la PCR se mostrarán con sensibilidades exageradamente elevadas. Por otra parte, si se aplica la prueba a pacientes en fase indeterminada y crónica, en los cuales existen niveles transitorios y bajos de parasitemia, la muestra podría no contener parásitos resultando en reacciones falsas negativas (22). El uso de la prueba PCR para laboratorios de diagnóstico y bancos de sangre no es la más adecuada debido a que es laboriosa, costosa y poco conveniente para el procesamiento de un gran número de muestras (23). La metodología usada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre debe incluir las siguientes características: simplicidad, especificidad, sensibilidad, bajo costo y que el procesamiento sea realizado por equipos automatizados. En el caso de los bancos de sangre la sensibilidad de una prueba es mucho más importante que la especificidad (24).

Vieira y cols. (25) analizaron 414 sueros para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, por hemaglutinación indirecta (sensibilidad: 95,7% y especificidad 98%) inmunofluorescencia indirecta (sensibilidad: 100% y especificidad: 98%), un ensayo inmunoenzimático (sensibilidad: 98,2% y especificidad: 96,4%) y mediante la prueba de PCR, presentando ésta última una sensibilidad de 1,2% y una especificidad de 100%, por lo que concluyen que las tres reacciones serológicas convencionales siguen siendo adecuadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la prueba de PCR es de gran utilidad para el estudio de la infección en triatominos, la determinación de su fuente alimenticia, así como el linaje (26, 27).

Un amplio rango de diferentes antígenos han sido usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, actualmente entre los más utilizados se incluyen: extractos crudos de epimastigotes sonicados (28, 29), proteínas extraídas de epimastigotes (30, 31), epimastigotes completos fijados (32, 33, 34, 35, 36), amastigotes fijados y sonicados (37), proteínas recombinantes de *T. cruzi* (28, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49). De estas preparaciones antigénicas, los antígenos excretados/secretados de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (antígenos TESA), han demostrado ser excelentes candidatos de diagnóstico serológico para la enfermedad de Chagas en diferentes formatos (ELISA, Western blot) debido a su elevada sensibilidad y especificidad (45, 50, 51, 52, 53, 54). Estos antígenos son excretados/secretados en los sobrenadantes de cultivos celulares (células Vero) infectados con las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Los antígenos TESA no requieren procesos químicos de purificación por lo que representan una buena alternativa como reactivo de diagnóstico para la enfermedad de Chagas (50, 51).

La enfermedad de Chagas continúa siendo un serio problema de salud pública en América Latina, los procesos urbano-industriales, traen como consecuencia una progresiva reducción de las áreas selváticas y como consecuencia una concentración de reservorios y vectores de *T. cruzi* en espacios próximos a los conglomerados humanos, produciéndose nuevas áreas para la infestación domiciliar por triatominos. El proceso de

colonización del ambiente doméstico por parte de los triatominos suele iniciarse en lugares del área peridomiciliar estrechamente ligados a la fuente de ingesta sanguínea, como es el caso de cobertizos que albergan animales: gallineros, establos, gatos, roedores y marsupiales (55).

En Venezuela, la enfermedad de Chagas es considerada de riesgo para aproximadamente 6 millones de personas que viven en 198 municipios de 14 entidades federales, dentro de un territorio de 1 014 488 Km². Históricamente, los estados más afectados han sido Trujillo, Lara, Portuguesa, y Barinas, debido a sus características geográficas de pie de monte, con zonas cafetaleras y viviendas de bahareque y paja, que facilitan la infestación por *R. prolixus*, principal vector intradomiciliario en Venezuela y Colombia (56).

Recientes estudios han demostrado una prevalencia elevada de la enfermedad de Chagas en diferentes regiones de Venezuela. Los estados con mayores tasas de prevalencia para el período 1992-2000 fueron Carabobo (35,7%), Lara (15,8%), Anzoátegui (9,9%), Portuguesa (9,7%), Táchira (9,5%) y Cojedes (8,9%). En el año 2000, el índice de seroprevalencia fue de 8,3% predominando en las regiones: occidental y central (5). Asimismo, la seroprevalencia para la enfermedad de Chagas en niños menores de 10 años varía de 0,8 a 18,4% en diferentes estados del occidente del país (4, 25).

En la actualidad diferentes investigadores han reportado un repunte de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Añez y cols. (56) reportaron una seroprevalencia de 22,8% en el estado Barinas y de 7,8% en el estado Yaracuy, por su parte Rodríguez-Bonfante y cols. (57) reportaron una seroprevalencia de la enfermedad de Chagas de 6,9% en el municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, por último Feliciangeli y cols. (58) reportaron un 3,3% de seroprevalencia en el estado Barinas.

No existen datos oficiales de la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en el estado Sucre, desde el año 1982 la situación en torno a este tema es de total incertidumbre pues el ministerio del poder popular para la salud (MPPS) abandonó las campañas de prevención para dedicarse exclusivamente al control de la malaria (59).

Diferentes estudios realizados en la región por investigadores independientes revelan los siguientes resultados: González (60) reportó un 21,93% de seropositividad en la parroquia Catuaro, municipio Ribero, Figuera (61) reportó un 7% de seroprevalencia en un estudio llevado a cabo en el municipio Arismendi. Asimismo Aza (62) reporta un nivel de seropositividad de 25,77% en la población de San Pedro, parroquia Santa Fe del municipio Sucre. Abreu (63) reporta 15,26% de seroprevalencia en los Altos de Sucre, de municipio Sucre. En trabajos de investigación llevados a cabo en el municipio Montes: Flores (64) reporta una seroprevalencia de 12,50% y Aguilera (65) de 5,82%. Aguilera (66) reportó una seroprevalencia de infección por *T. cruzi* de 2,83%, en individuos mayores de 30 años, en un estudio realizado en la comunidad rural de Miraflores (estado, Monagas).

Debido a la ausencia de un ensayo estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, así como también de datos actualizados en el estado Sucre de la situación de esta enfermedad, se hace imperativo la búsqueda de nuevas estrategias y antígenos de diagnóstico, que proporcionen una prueba altamente sensible, específica, que pueda ser implementada en estudios epidemiológicos.

Teniendo en cuenta que diversos trabajos han demostrado que los antígenos de excreción/secreción de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (antígenos TESA) son excelentes candidatos como antígenos de diagnóstico, ya que presentan elevada especificidad y sensibilidad, no requieren de procesos de purificación y pueden ser producidos en laboratorios que carezcan de infraestructura y equipamientos cromatográficos y de biología molecular. Por lo tanto, se adaptaron los protocolos de trabajo para la producción de TESA a las formas epimastigotes, las cuales son fáciles de

cultivar, su producción es relativamente económica, y muestran un amplio rendimiento antigénico. En el presente trabajo se desarrolló y estandarizó una técnica ELISA, utilizando como antígeno proteínas excretadas/secretadas al medio de cultivo axénico de las formas epimastigotes de *T. cruzi* (antígenos ESEA) de una cepa autóctona de *T. cruzi*, siguiendo la metodología descrita por Berrizbeitia y cols. (50). Los antígenos ESEA son más fáciles de producir, ya que no requieren de la utilización de cultivos celulares, como es el caso de los antígenos TESA, lo que puede proporcionar una herramienta de diagnóstico novedosa, sencilla, económica y adaptable a laboratorios de escasos recursos. Igualmente, en vista que se desconoce la situación actual de la enfermedad en el estado Sucre, se validó el ensayo estandarizado en 12 centros poblados del municipio Montes, confirmando las muestras que resulten reactivas con un kit de hemaglutinación indirecta (HAI), a fin de proporcionar cifras actuales y oportunas de seroprevalencia en esta región y relacionando los resultados obtenidos con las variables epidemiológicas a fin de establecer posibles factores de riesgo de transmisión vectorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa de *T. cruzi*

Como material biológico para este estudio, se utilizaron formas epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa AU, el aislado parasitario fue obtenido de un paciente chagásico agudo en el Centro de Medicina Tropical de la Universidad de Oriente, núcleo de Anzoátegui, confirmado como *T. cruzi* por medio de pruebas parasitológicas y de biología molecular (67,68), el aislado fue compatible con los referentes moleculares del linaje TcI, el de más amplia distribución en Venezuela. La cepa fue donada al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS) de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, en donde es perpetuada mediante pasajes mensuales en cuñas de agar sangre, y luego adaptadas a medio de cultivo axénico.

Producción de los cultivos axénicos de la forma epimastigote de *T. cruzi*, cepa AU

Las formas epimastigotes del *T. cruzi* fueron cultivadas *in vitro* a 27 °C en frascos para cultivo celular, empleando para ello medio de cultivo *Schneider's insect medium* con L-glutamina (Sigma-Aldrich®), a pH 6,9 esterilizado sólo por filtración utilizando membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm (Millipore®) y suplementado con 0,6% de cloruro de calcio anhidro, 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina. La colecta se realizó durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial (aproximadamente al séptimo día de cultivo) (50) (Apéndice 1).

Producción de los antígenos secretados/ excretados de las formas epimastigotes de *T. cruzi* (antígenos ESEA), cepa AU

Los antígenos ESEA de las formas epimastigotes fueron obtenidos durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (50): una vez obtenidas las formas epimastigotes como fue explicado en el paso anterior, el contenido de los cultivos se centrifugó en tubos Falcon ® estériles a 1000 g por 10 min a 20 °C, el sobrenadante obtenido fue descartado y el sedimento sometido a 3 lavados por centrifugación con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4) con la

finalidad de eliminar el SFB, el sedimento fue resuspendido en el medio de cultivo pero sin SFB e incubado a 27 °C por 4 días. Transcurrido ese tiempo los epimastigotes en cultivo fueron nuevamente sometidos a centrifugación a 1000 g por 10 min a 20 °C y el sobrenadante que en éste caso contenía las proteínas de excreción/secreción se filtró usando una membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm (Millipore ®). El filtrado se observó al microscopio óptico (40 X), para asegurar que la solución estuviera libre de parásitos. Las proteínas obtenidas se almacenaron a -70 °C hasta su posterior uso (54).

Cuantificación de las proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU

Para cuantificar las proteínas ESEA se empleó el método Bradford (Bradford, 1976), en donde se utiliza albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. El método se basa en la medición espectrofotométrica de los valores de densidad óptica (470-595 nm), debidos a la formación de un complejo coloreado entre residuos aromáticos y residuos de arginina de las proteínas y el Coomassie Brilliant Blue G, componente principal del reactivo, siendo la intensidad de la coloración proporcional a la cantidad de proteínas presentes (69).

Procedimiento

1. Preparación de un estándar de albúmina 1 mg/ml.
2. Preparación de patrones a partir del estándar de albúmina 1 mg/ml: el procedimiento se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de patrones.

Patrón	Volumen de diluyente (μ l)	Volumen de BSA (1 mg/ml) (μ l)	Concentraci ^ó n final de BSA (μ g/ml)
1	800	0	0
2	799	1	1
3	798	2	2
4	796	4	4
5	793	7	7
6	790	10	10
7	785	15	15

3. Se realizaron diluciones seriadas de las proteínas ESEA (1/50, hasta 1/800).
4. A cada dilución de las proteínas ESEA y a los patrones se les agregó 200 μ l de reactivo de Bradford y se mezclaron en un vórtex.
5. Incubación a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Las absorbancias fueron leídas a 595 nm, en un tiempo no mayor a 1 h.
7. Se realizó una curva estándar graficando la lectura a 595 nm corregida de los estándares (Y) vs su concentración en μ g/ml (X), y se determinó la concentración de la proteína de cada muestra desconocida.

Evaluación de las proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó un análisis electroforético unidimensional de las diferentes fracciones obtenidas, en base al método descrito por Laemmli (70). La separación electroforética se llevó a cabo en un gel de 7,5% de poliacrilamida y un espesor de 0,8 mm, preparados en el laboratorio según el protocolo descrito en el manual de Mini Protean 3® (BioRad®), la electroforesis se llevó a cabo por 2 h en buffer de corrida (25 mM Tris, 192 mM

glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a un voltaje constante de 100 V, utilizando marcadores pre-teñidos de amplio rango de peso molecular (BioRad®) en cada corrida electroforética, para estimar el peso de las bandas. Para la visualización de las proteínas de excreción/secreción, se tiñeron los geles con Coomassie Brilliant Blue, y luego fueron sumergidos en una solución para su conservación conteniendo 40% de metanol, 10% de ácido acético y 50% de agua (Apéndice 2).

Western blot de los antígenos ESEA de *T. cruzi*

La inmunogenicidad de las proteínas de excreción/secreción se determinó de acuerdo al método descrito por Towbin y cols. (71). Las proteínas separadas previamente por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó por una hora a 4°C en 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% v/v metanol (pH 8,3), a una corriente constante de 0.25 A, según el protocolo descrito en el manual de Mini TransBlot® (BioRad®). Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche, a 4°C en PBS pH 7,4 conteniendo 5% de leche descremada (Carnation, Nestle) y 0,1% de Tween 20 (solución bloqueadora-PBST). Posteriormente, las membranas se incubaron con un pool de sueros controles positivos y/o negativos (1:400) en PBST. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron en PBST, 4 lavados de 5 min por vez, las proteínas antigénicamente reactantes fueron incubadas por 2 horas con la dilución apropiada del anticuerpo secundario: anti-IgG humana conjugada con peroxidasa de rábano picante y diluido en la solución bloqueadora a dilución 1:4000. Se repitieron los cuatro lavados con PBST y los inmunocomplejos fueron revelados utilizando diaminobencidina (Sigma) por 10 minutos, y la reacción se detuvo con agua destilada (Apéndice 3).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA indirecto), utilizando como antígenos proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU

Se estandarizó un ensayo ELISA en fase sólida utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de las formas epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU (cepa autóctona), obtenida en Venezuela de un humano en la fase aguda de la enfermedad, ésta

fue donada por el Centro de Investigaciones en Ciencias de la salud (CICS), Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente.

Para la estandarización de la técnica fue seguido el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (50), se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos y fondo plano (Immulon 2, Thermo Labsystems, Franklin, MA), cada pozo de la placa se recubrió con 100 μ l del antígeno ESEA en concentraciones de 2,5 μ g/ml y de 5,0 μ g/ml en buffer carbonato-bicarbonato (0,1 M pH 9,6), luego las placas fueron incubadas toda la noche a 4 °C y en cámara húmeda, posteriormente las placas fueron lavadas 4 ó 5 veces con 300 μ l de buffer fosfato salino (PBS pH 7,4) conteniendo 0,05% de Tween 20 (PBST). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 100 μ l de solución PBS conteniendo 0,1% de Tween 20 y 5% de albúmina de suero bovino (BSA) por 1 h a 37 °C. Una vez eliminada la solución bloqueadora, las diferentes concentraciones del antígeno fueron enfrentadas a un pool de sueros confirmados previamente como positivos y/o negativos por tres métodos serológicos diferentes para la enfermedad de Chagas (IFI, HAI y ELISA), a diluciones seriadas desde 1:100 hasta 1:800, 100 μ l por pozo en solución bloqueadora e incubados por 1 h a 37 °C. Las diluciones de suero fueron descartadas y los pocillos de la placa lavados 4 ó 5 veces con solución PBST, luego fueron agregados 100 μ l de anti-IgG humana conjugada a peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich®), a diluciones seriadas desde 1:4000 hasta 1:32000 en la solución de bloqueo e incubadas durante 30 min a 37 °C. Se repitieron los lavados con PBST y por último se añadieron 100 μ l del sustrato 3,3'-5-5'tetra-metil-bencidina (TMB) a tiempos de incubación de 5 y 10 min. Al finalizar el periodo de incubación se agregaron 50 μ l de H₂SO₄ (1 N) para detener la reacción enzimática, por último las determinaciones fueron realizadas en un lector de ELISA automático marca Biotrak II, modelo G020155160 con filtro de 450 nm, considerando como positivas todas aquellas muestras cuyo promedio de DO fuera superior o igual al valor del punto de corte. Cada análisis fue llevado a cabo por duplicado y en diferentes días, el criterio estipulado para catalogar los resultados como aceptables fue si el coeficiente de variación (CV) inter y entre placas era menor o

igual al 10%, los sueros que mostraron discrepancias fueron analizados nuevamente (33) (Apéndice 4).

Selección de los mejores parámetros de estandarización para una prueba ELISA

Se realizó evaluación de los cocientes obtenidos de las DO de los controles positivos y negativos, para cada uno de los parámetros establecidos para la estandarización: concentración de proteínas, número de lavados, dilución del anticuerpo primario, dilución del anticuerpo secundario. Se escogieron aquellos parámetros que ofrecieron una mejor discriminación entre las DO del control positivo y el negativo. Para estandarizar la prueba de ELISA, se considera un cociente de 5 como mínimo y excelente si es mayor de 10 (72).

Determinación de la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del ELISA estandarizado usando los antígenos ESEA

Para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se siguieron los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la cual establece que para la enfermedad de Chagas debido a la ausencia de un ensayo estándar de oro para el diagnóstico, una muestra es considerada positiva cuando arroja un resultado positivo al menos por dos pruebas serológicas diferentes (20). Por lo tanto, siguiendo estas recomendaciones para evaluar las variables mencionadas previamente (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) se incluyeron en el ensayo 50 sueros confirmados como positivos y 50 negativos para la enfermedad de Chagas. Estos sueros fueron procesados por tres técnicas serológicas diferentes: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ELISA (antígenos de membrana de epimastigotes). Igualmente, se utilizaron 10 sueros provenientes de pacientes clínicamente y /o serológicamente confirmados con leishmaniasis cutánea, donadas para este estudio por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela). Asimismo, fueron

utilizados también para el estudio de reactividad cruzada ocho sueros de pacientes con *Ascaris lumbricoides*, uno con *Strongyloides stercoralis* y uno con *Trichuris trichiura*.

Para determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la prueba se aplicaron las fórmulas descritas por Wayne, 1999 (73) (Apéndice 5).

Estudio epidemiológico

La selección de la muestra se realizó a través de un muestreo de tipo polietápico o por conglomerados en el municipio Montes del estado Sucre. Los centros poblados seleccionados de forma aleatoria quedaron representados por: Begote, Mapurite, Los Dos Ríos, San Salvador, Los Dos Ríos-Los Mangos, Tres Picos, Aricagua, Las Vegas-El Naranjal, El Potrero, San Fernando de Tataracual, Sabaneta y Las Calderas-El Zamuro. De cada centro poblado fueron seleccionadas igualmente 6 viviendas, evaluando y analizando las muestras de sueros de todos los residentes de cada vivienda, quienes voluntariamente participaron en la investigación. Para la realización de este estudio epidemiológico, se realizó una visita inicial con la finalidad de informar a la población de los alcances y beneficios de la investigación que se pretendía realizar, y una segunda visita para la toma de muestra y la aplicación de las encuestas epidemiológicas. Este trabajo fue realizado tomando en cuenta las normas éticas establecidas por la OMS para investigaciones en humanos y la declaración de Helsinki (CIOMS) (74). A los individuos seleccionados aleatoriamente, de diferentes grupos étnicos y de ambos sexos, se les informó sobre los objetivos del presente trabajo, así como las ventajas de su participación, esto con el propósito de obtener el consentimiento por escrito de cada uno de los pacientes participantes en el estudio (Apéndice 6), al mismo tiempo se aplicó una encuesta epidemiológica para establecer los factores de riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en esta región (Apéndice 7).

Toma de muestra

Luego que los pacientes dieron su consentimiento por escrito para participar en este estudio, se procedió a la toma de muestra sanguínea por medio de venipunción previa asepsia con alcohol isopropílico, las muestras se dejaron en reposo por 10 min a temperatura ambiente a fin de esperar la retracción del coágulo. Seguidamente se centrifugaron a 1000 g durante 10 min para la obtención del suero sanguíneo, el cual fue separado en alícuotas en tubos Eppendorf®, previamente rotulados y guardados a -80 °C hasta su uso (35) .

Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra el *T. cruzi* (Wiener lab)

Esta técnica llamada también hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*T. cruzi* de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos. En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Su presencia se investiga enfrentando el suero con glóbulos rojos no sensibilizados. Los anticuerpos interferentes se eliminan mediante tratamiento con β -2-mercaptoetanol.

Procedimiento cualitativo

1. Se adicionaron 25 μ l de diluyente de suero en todos los pocillos a utilizar de la policubeta.
2. Adicionalmente, se agregaron 25 μ l de cada suero a ensayar en el primer pocillo homogeneizando mediante carga y descarga, para asegurar la correcta dilución de la muestra.
3. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución 1/2), pasando 25 μ l al pocillo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución que se deseaba investigar (1/8, 1/16, 1/32),

mezclando en cada paso mediante carga y descarga con la micropipeta a fin de garantizar la correcta dilución de la muestra. Se descartaron los últimos 25 μl .

4. Se colocó en los pocillos conteniendo las diluciones 1/2 y 1/4, 25 μl de glóbulos rojos no sensibilizados para control de heterofilia.
5. En el resto de los pocillos se agregaron 25 μl del antígeno HAI.
6. Se mezcló aplicando ligeros golpes en los laterales de la policubeta.
7. La policubeta se dejó en reposo, a resguardo de vibraciones y tapada, durante 90 minutos.

Interpretación de resultados

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.

Procedimiento semi-cuantitativo

1. Se adicionaron 25 μl de suero en el primer pocillo.
2. Se realizó una dilución 1/2, agregando 25 μl de β -2-mercaptoetanol al 1% a los pocillos que contenían el suero.
3. La placa se selló con cinta adhesiva y se mezcló aplicando ligeros golpecitos en los laterales de la policubeta.
4. Se dejó incubar por 90 min a temperatura ambiente.
5. Posteriormente, se retiró la cinta adhesiva y se adicionaron 25 μl de diluyente de sueros HAI en los restantes pocillos a utilizar, hasta la dilución deseada.

6. Luego se realizaron diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución 1/2), pasando 25 µl al pocillo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución que se deseaba investigar (1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024), mezclando en cada paso mediante carga y descarga con la micropipetea a fin de garantizar la correcta dilución de la muestra. Se descartaron los últimos 25 µl.
7. Se adicionó 25 µl de glóbulos rojos no sensibilizados en los pocillos conteniendo las diluciones 1/2 y 1/4, para control de heterofilia.
8. En el resto de los pocillos fueron agregados 25 µl del antígeno HAI.
9. Se mezcló aplicando ligeros golpes en los laterales de la policubeta.
10. La placa se dejó en reposo, a resguardo de vibraciones y tapada, durante 90 minutos.

Interpretación de resultados

Sueros con títulos mayores o iguales a 1/16, se consideran reactivos para anticuerpos anti- *T. cruzi*. Cuando se observan resultados positivos (sueros reactivos) y además se presenta manto en los pocillos destinados a control de heterofilia (diluciones 1/2 y 1/4), debe realizarse otra titulación con los sueros correspondientes, previamente tratados con β-2-mercaptoetanol o adsorbidos con glóbulos rojos no sensibilizados. El propósito de estos tratamientos es el de eliminar la reacción inespecífica. En el primer caso el agente reductor β-2-mercaptoetanol elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos, mientras que los glóbulos rojos no sensibilizados los elimina por adsorción.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron en forma de tablas y gráficos, en frecuencias absolutas, porcentajes e índices. El almacenamiento de los datos se hizo en el programa Excel, se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor

predictivo negativo de la prueba de ELISA utilizando las fórmulas descritas por Wayne (73). Para establecer posibles factores de riesgo de transmisión vectorial analizando las variables epidemiológicas y los resultados del test serológico se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), a un nivel de confiabilidad de 95%, considerando $p < 0,05$ como significativo, empleándose los programas estadísticos Stat graphics 5.1 y MiniTab (75).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de las proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU

Los antígenos ESEA fueron obtenidos del sobrenadante del medio de cultivo *Schneider's insect* sin SFB, al cuarto día de cultivo axénico, siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (50), y sin realizar procesos de purificación ni concentración. Una vez obtenidos estos antígenos, se procedió a determinar la concentración de la proteína por el método de Bradford. La concentración de ESEA fue de 16,18 µg/ml, contenidas en un volumen total de aproximadamente 60 ml de ESEA sin concentrar, con lo cual es posible sensibilizar aproximadamente 21 placas de ELISA y analizar 851 muestras de suero aproximadamente, utilizando 5 µg/ml de antígeno. Estos resultados demuestran que el antígeno es de producción relativamente fácil, económica y de elevado rendimiento lo que representa una buena opción de diagnóstico para la infección por *T. cruzi*. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la excreción/secreción de proteínas al medio de cultivo axénico por las formas epimastigotes es menor que las proteínas excretadas y secretadas por las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Umezawa y cols. (53) reportaron una concentración de antígenos TESA sin concentrar al medio de cultivo celular de 30-40 µg/ml. Sin embargo, la producción de antígenos TESA es mucho más costosa que los antígenos ESEA, ya que los TESA son obtenidos del sobrenadante de cultivos celulares, los cuales requieren de la utilización de medios costosos y de una infraestructura adecuada (50).

Uno de los aspectos más importantes en la estandarización de un ensayo inmunoenzimático es el tipo de antígeno a utilizar, su rendimiento antigénico y la facilidad o simplicidad de su obtención, que hace el método más práctico y evita procedimientos engorrosos y laboriosos, y en caso de antígenos proteicos la determinación de su concentración es una etapa imprescindible para garantizar el éxito de ensayos posteriores (72).

Evaluación de las proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Una vez determinada la concentración de la proteína por el método de Bradford, se realizó una electroforesis en geles de 7% de poliacrilamida, la corrida se llevó a cabo a una corriente constante y en condiciones reductoras, con la finalidad de identificar las proteínas ESEA, la electroforesis en gel de poliacrilamida mostró dos bandas de 66 y 60 Mr (Figura 1).

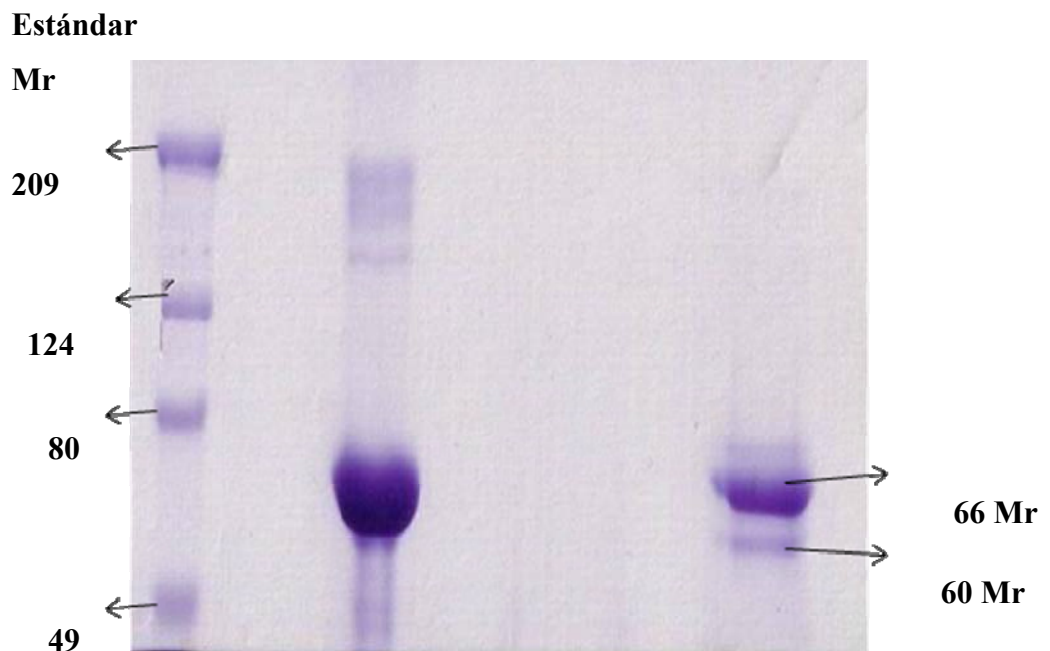


Figura. 1: Separación electroforética unidimensional (SDS-PAGE) de antígenos de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa AU, visualizados con azul brillante de Coomassie. (A) Patrón de peso molecular pre-teñido, (B) BSA, (C) ESEA cepa AU.

En la figura 1, se puede visualizar que sólo se identificaron 2 bandas, este hallazgo no ha sido previamente descrito, lo que nos permite evidenciar que las formas epimastigotes de *T. cruzi* excretan/secretan al medio de cultivo axénico una mezcla de moléculas antigénicas de alto grado de pureza, a diferencia de las formas tripomastigotes que excretan/secretan en los sobrenadantes de los medios de cultivos celulares una mezcla compleja de moléculas antigénicas cuyas masas moleculares oscilan entre 60 y 220 Mr (45,49,50,51,52,53,54).

Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas de excreción/secretión de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU mediante Western blot

Para demostrar la inmunogenicidad de las proteínas ESEA observadas en el SDS-PAGE, se realizó la técnica de Western blot utilizando un pool de sueros confirmados como positivos para la infección por *T. cruzi* por tres pruebas serológicas diferentes (ELISA, HAI, IFI). A través de esta técnica, se pudo demostrar la inmunogenicidad de la proteína de 60 Mr (Figura 2), lo cual indica que los antígenos ESEA tienen utilidad diagnóstica. Este es el primer trabajo que reporta las proteínas ESEA para ser utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, existen diversos trabajos los cuales utilizan los antígenos de excreción/secretión de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (antígenos TESA), los cuales son igualmente antigénicos, pero en este caso el número de bandas inmunogénicas es mucho mayor a las encontradas en los antígenos ESEA (45,49,50). En el Western blot realizado las proteínas TESA utilizadas como control no se visualizaron adecuadamente debido a que se tuvo que exponer la membrana a la diaminobencidina por tiempo prolongado hasta que la banda de interés de ESEA se revelara (Apéndice 8).

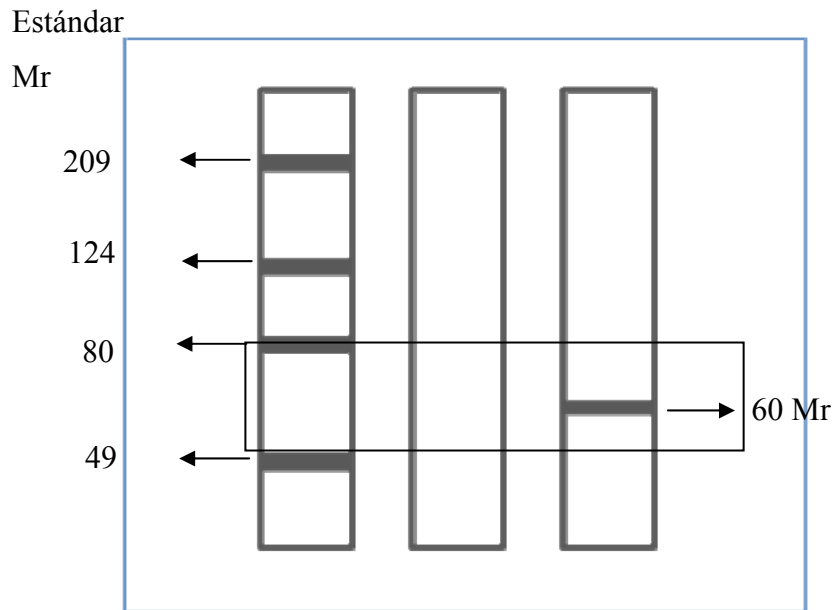


Figura 2: Representación del Western blot de las proteínas ESEA separadas por SDS-PAGE. (A) Patrón de peso molecular pre-teñido, (B) Suero control negativo, (C) Suero control positivo para la enfermedad de Chagas (reconoció banda de 60 Mr).

Umezawa y cols. (53) utilizando TESA, evaluaron con esta técnica sueros de individuos en la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, reportando que los sueros de los individuos en fase aguda y con Chagas congénito reconocieron polipéptidos de 130 a 200 Mr, mientras que los sueros de individuos chagásicos en la fase crónica reaccionaron con polipéptidos de 150-160 Mr. Por su parte, Gomes y cols. (43) reportaron polipéptidos de 150-160 Mr que fueron reconocidos por un panel de sueros de individuos chagásicos.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA indirecto), utilizando como antígenos proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi*, de la cepa AU

Para la estandarización de la prueba de ELISA IgG indirecta, se realizaron titulaciones de la concentración de ESEA a utilizar, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y número de lavados. Las diferentes concentraciones del antígeno fueron incubadas con un pool de sueros previamente confirmados como positivos y negativos

por tres métodos serológicos diferentes para la enfermedad de Chagas (IFI, HAI y ELISA). Las condiciones que permitieron obtener una mejor discriminación entre el control positivo y negativo, para cada uno de los pasos de la prueba, fueron: proteína 5,0 µg/ml, anticuerpo primario 1/400, anticuerpo secundario 1/32000, número de lavados 4 y TMB (cromógeno) 5 min. (Figura 3). La media de la densidad óptica obtenida para el pool de sueros positivos y negativos fue de 1,753 y 0,214, respectivamente, lo que permitió un cociente entre el control positivo y negativo de 8. Para la estandarización de un ELISA en forma adecuada debe obtenerse un cociente entre el control positivo y el negativo mínimo de 5 y es excelente cuando éste es mayor de 10 (76).

La técnica ELISA posee como ventaja su simplicidad, sensibilidad y especificidad, además de la capacidad para detectar antígenos, anticuerpos o ambos. Por más de 30 años esta técnica se ha basado en el uso de diferentes antígenos de *T. cruzi*, entre los que cabe la pena destacar: formas fijadas del parásito que son de fácil obtención y presentan un alto rendimiento y estabilidad (50). La mayoría de las pruebas comerciales se basan en el uso de antígenos semipurificados que contienen epítopes comunes a otras especies, acarreando un porcentaje significativo de discrepancias en la reproducibilidad de los resultados interlaboratorios y reacciones cruzadas con otros parásitos (77).

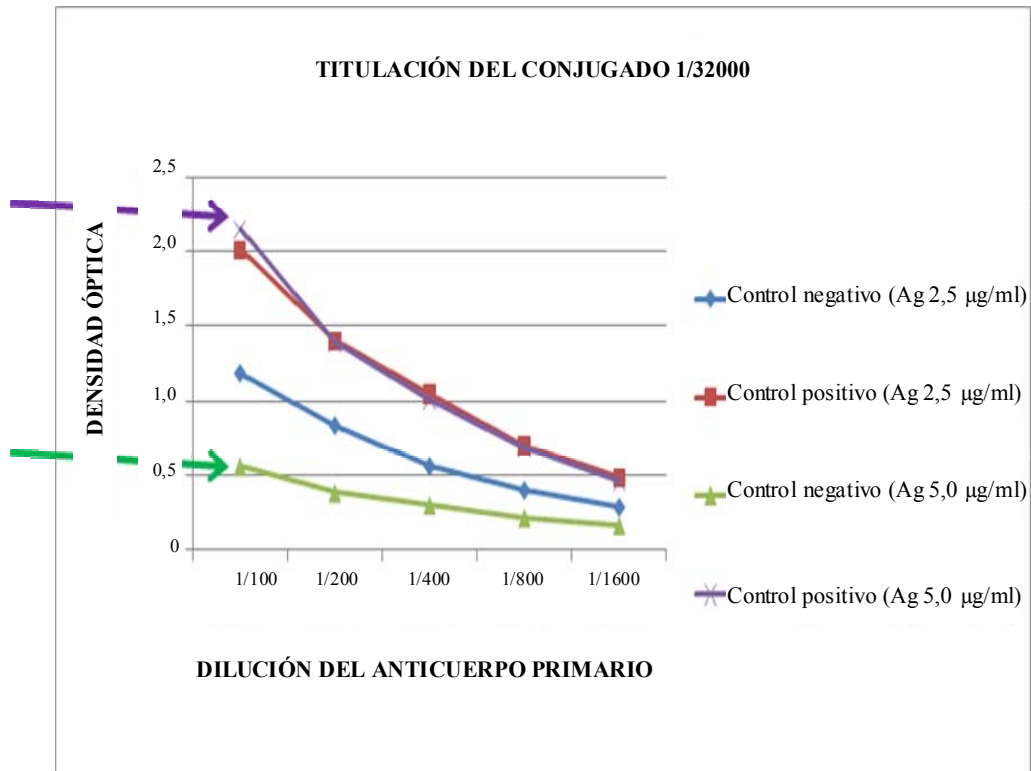


Figura 3: Titulación de la concentración de ESEA, anticuerpo primario y conjugado (1/32000) de la prueba ESEA-ELISA, cepa AU.

En la tabla 1, se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y concordancia del ensayo ELISA utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi* cepa AU (ESEA-ELISA), con sueros de referencia de la enfermedad de Chagas. Se puede observar que al analizar los diferentes puntos de corte utilizando una curva ROC (*receiver operating curve*) (Figura 4) los mejores parámetros se obtuvieron con el valor 0,600 de DO, lo cual permitió establecer este punto de corte fijo para el ELISA-ESEA. Utilizando la curva ROC, Berrizbeitia y cols. (51) establecieron 0,400 de DO como punto de corte fijo para la prueba de ELISA utilizando antígenos fijados de las formas epimastigotes y tripomastigotes, y antígenos TESA debido a que a este punto de corte las pruebas ofrecieron las mayores sensibilidades y especificidades.

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y concordancia del ensayo ELISA utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de epimastigotes de *T. cruzi* cepa AU, con sueros de referencia de la enfermedad de Chagas, a diferentes puntos de corte

Puntos de corte y parámetros	ELISA-ESEA
0,400	
Especificidad (%)	74
Sensibilidad (%)	100
Concordancia(%)*	87
VPP (%)	83,3
VPN (%)	100
0,500	
Especificidad (%)	80
Sensibilidad (%)	98
Concordancia(%)*	89
VPP (%)	86
VPN (%)	97,7
0,600	
Especificidad (%)	88
Sensibilidad (%)	98
Concordancia(%)*	93
VPP (%)	89
VPN (%)	98

Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN)*Concordancia= $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$. (Basada en los resultados del ESEA-ELISA evaluando los sueros de referencia Nacional).

Al analizar la sensibilidad y especificidad de los diferentes grupos de sueros evaluados (negativos para infección por *T. cruzi*, pacientes chagásicos, individuos con leishmaniasis y con otras parasitosis), se pudo observar que para todos estos grupos en el punto de corte 0,600 se obtuvo un valor óptimo de especificidad a expensas de disminuir la sensibilidad. Para el grupo de individuos Chagásicos crónicos (n= 50) valores de DO oscilaron entre 0,506 y 1,888 ($1,099 \pm 0,323$), por su parte para el grupo de individuos aparentemente sanos (n= 50), se observaron valores de DO entre 0,073 y 0,567 ($0,339 \pm 0,222$). Para el grupo de individuos con leishmaniasis (n= 10) la DO osciló entre 0,370 y 1,136 ($0,617 \pm 0,244$), de los cuales 5 obtuvieron valores DO superiores al valor de punto corte, y por último para el grupo de individuos con parasitosis relacionadas (n= 10), se obtuvieron valores de DO entre 0,205 y 0,921 ($0,453$

$\pm 0,261$), de los cuales 3 de los 8 con ascaridiasis arrojaron valores de DO superiores al valor de punto de corte, mientras que se evaluó también 1 suero de un individuo con *Strongyloides stercoralis* y 1 con infección mixta por *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, ambos con valores de DO inferiores al valor de punto de corte (Tabla 2).

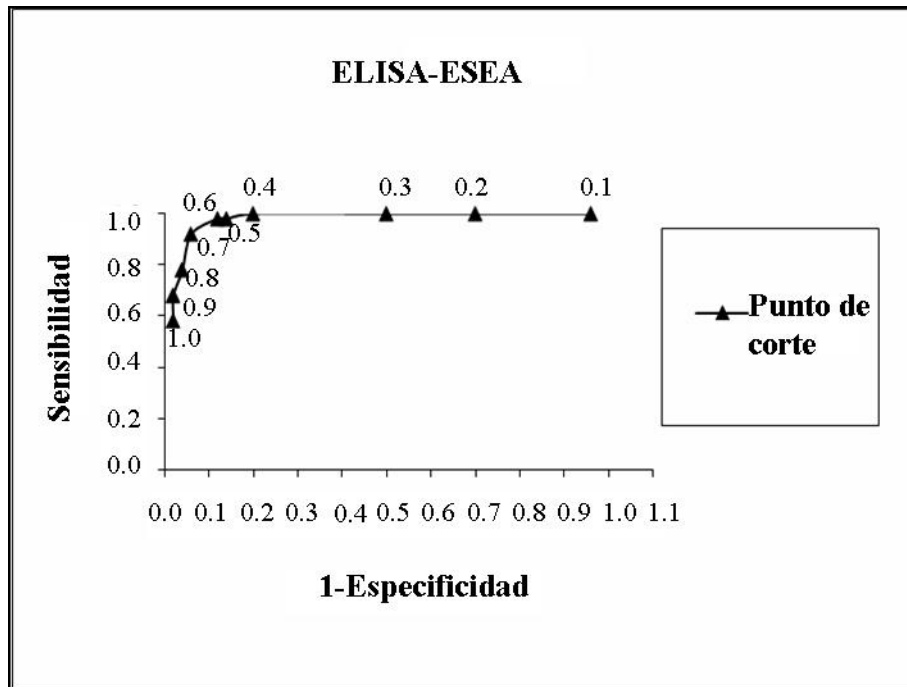


Figura 4. Curva ROC para ESEA-ELISA a diferentes puntos de corte.

El punto de corte para la prueba ELISA-ESEA estandarizada fue 0,600. Según éste criterio 49 de los sueros de pacientes chagásicos resultaron positivos, así como 6 de los sueros de pacientes negativos (n= 50) para la enfermedad de Chagas, por lo que la sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA-ESEA fue de 98% y 88%,

Tabla 2: Media, desviación estándar (DE), densidad óptica (DO), especificidad y sensibilidad estimada para grupos de sueros evaluados con ELISA-ESEA

Ag	\bar{X} (DO) \pm DE	DO Min – Max	Esp% (DO 0,500)	Sens % (DO 0,500)	Esp% (DO 0,600)	Sens % (DO 0,600)
Sueros de pacientes negativos para infección por <i>T. cruzi</i> (n= 50)						
ESEA	0,339 \pm 0,222	0,073-0,567	80	-	88	-
Sueros de pacientes con infección por <i>T. cruzi</i> (n= 50)						
ESEA	1,099 \pm 0,323	0,506-1,888	80	100	88	98
Sueros de pacientes con Leishmaniasis (n = 10)						
ESEA	0,617 \pm 0,244	0,370-1,136	30	-	60	-
Sueros de pacientes con otras parasitosis (n = 10)						
ESEA	0,453 \pm 0,261	0,205-0,921	50	-	60	-

respectivamente, en lo referente a la sensibilidad de la prueba estandarizada, estos resultados son comparables con los obtenidos en Venezuela por Cannova y cols. (78), quienes estandarizaron una técnica ELISA utilizando un extracto proteico de epimastigotes de *T. cruzi*, reportando una sensibilidad de 96% y especificidad de 97%, por su parte Telles y cols. (79) al utilizar la ubiquitina de *T. cruzi* como antígeno de diagnóstico diferencial entre tripanosomiasis y leishmaniasis obtuvieron una sensibilidad de la prueba de 98% pero la especificidad (93,8%) de esta proteína fue mayor a la encontrada en el presente estudio. Valores de sensibilidad y especificidad similares a los encontrados en la presente investigación fueron reportados por Schechter y cols. (80), quienes estandarizaron una prueba de ELISA utilizando una proteína de 90 kDa de *T. cruzi*, la cual se purificó mediante cromatografía de afinidad, esta prueba obtuvo 96,6 % y 91,9 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente.

Al comparar el ELISA-ESEA con el ELISA-TESA, se demostró que el ELISA-TESA es superior, ya que se han reportado sensibilidades y especificidades mayores a las obtenidas en este estudio (sensibilidad: 100% y especificidades de 95 a 99%). Sin

embargo, la producción de antígenos TESA se realiza en cultivos celulares, para el establecimiento y mantenimiento de estos cultivos, se necesita de laboratorios con una infraestructura adecuada y con elevados recursos económicos. En contraste, los antígenos ESEA son más fáciles y económicos a producir (50,52,54).

La especificidad de un ensayo ELISA depende del antígeno utilizado, ésta será mayor mientras el antígeno sea más selectivo para un tipo particular de anticuerpo, en *T. cruzi* existen moléculas antigénicamente específicas del parásito, las cuales al ser utilizadas en el inmunodiagnóstico incrementan la especificidad de la prueba, como es el caso de los antígenos recombinantes, cuya especificidad es superior pero al mismo tiempo disminuye la sensibilidad (77,78).

Los antígenos de excreción/secreción son enzimas o catabolitos productos de la actividad fisiológica del parásito. Entre estos antígenos se encuentran compuestos más específicos y sustancias responsables de fenómenos de protección del hospedero. Se ha comprobado que inducen una elevada respuesta inmune humoral, generándose anticuerpos que poseen una especificidad tan precisa capaz de distinguir entre diferentes cepas de una misma especie o entre diferentes estadios evolutivos del mismo parásito. En los últimos años se ha hecho imperativa la búsqueda de nuevas estrategias y antígenos de diagnóstico, a partir de los cuales sea posible estandarizar un ensayo altamente sensible, específico, prestando especial atención al diagnóstico diferencial entre *T. cruzi* y otros tripanosomátidos, especialmente en regiones endémicas en donde existen fenómenos de solapamiento entre infecciones como la tripanosomiasis americana, rangeliosis y leishmaniasis (77,81).

Una vez estandarizada la prueba de ESEA-ELISA y determinada su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN se procedió a validar la prueba en un estudio de campo en el municipio Montes, estado Sucre. La selección de la muestra fue a través de un muestreo poletápico o por conglomerados. Se seleccionaron un total de

12 centros poblados y de cada centro poblado se evaluaron 6 viviendas. En esta fase participaron un total de 310 individuos, 138 hombres (44,52%) y 172 mujeres (55,48%), con edades comprendidas entre 1 y 78 años. De las 310 personas estudiadas 80 (25,81%) resultaron positivas por ESEA-ELISA (Figura 5).

Es bien conocido que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda el uso de por lo menos dos pruebas serológicas diferentes para el diagnóstico de esta enfermedad, razón por la cual se confirmaron los resultados obtenidos por ESEA-ELISA con una prueba comercial Chagatest-HAI (Wiener lab), considerando como positivas aquellas muestras que resultaron reactivas por ambas pruebas, por lo tanto se observó una reducción considerable en el número de seropositivos de 80 a 22 (7,10%) (Figura 6).

La falta de concordancia entre las pruebas para el diagnóstico de la enfermedad de

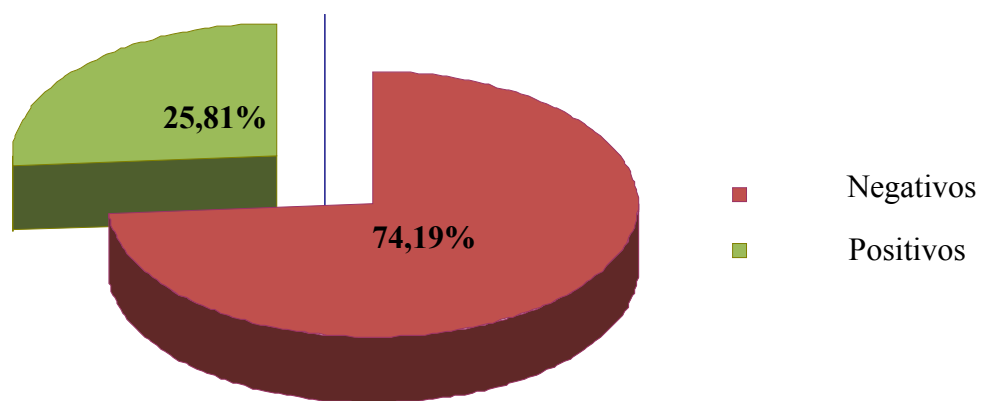


Figura 5: Distribución de la seroprevalencia de la infección por T. cruzi, obtenida mediante la utilización de ELISA-ESEA, en individuos de los diferentes centros poblados analizados del municipio Montes, estado Sucre 2008.

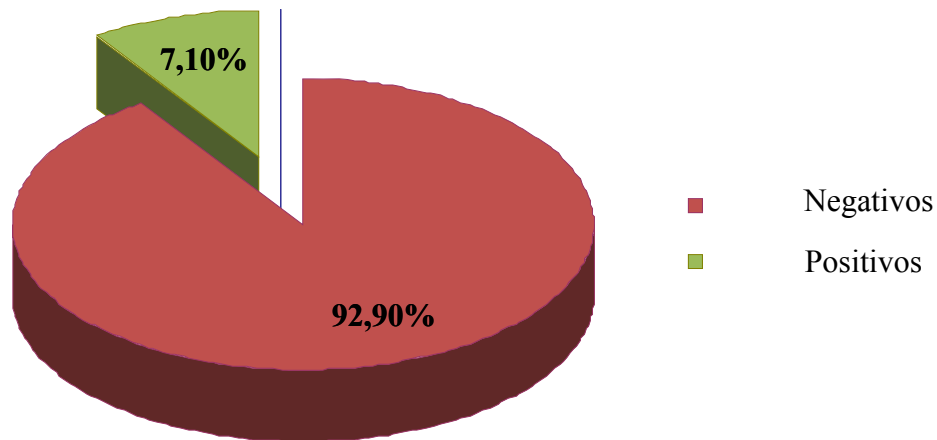


Figura 6: Distribución de la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi*, obtenida mediante la utilización de ELISA-ESEA y HAI, en individuos de los diferentes centros poblados analizados del municipio Montes, estado Sucre 2008.

Chagas ha sido reportada en diversos trabajos, por lo cual es necesario la realización de dos o más pruebas de diagnóstico secuenciales o en paralelo. Cuando existen limitaciones con la especificidad de una prueba se recomienda el uso de pruebas diagnósticas secuenciales lo cual aumenta la especificidad del diagnóstico (50,75).

Los problemas de especificidad presentados por las pruebas de diagnóstico utilizadas en los laboratorios clínicos, se deben a que *T. cruzi* es un protozooario de estructura bioquímica compleja que presenta en su cubierta celular externa antígenos específicos de su especie y antígenos de reacción cruzada con otros microorganismos, compartiendo el 60% de sus antígenos solubles con *T. rangeli*, 30% con *L. donovani* y *L. mexicana* y algunos determinantes antigénicos con *Mycobacterium tuberculosis*, dicho problema de especificidad se presenta sobre todo en zonas endémicas para leishmaniasis o rangeliosis (77,81).

T. cruzi y *Leishmania sp.* poseen múltiples epítopes semejantes localizados en moléculas de glicoproteína que contienen residuos de galactosa, además de proteínas del citoesqueleto como la tubulina que son semejantes en muchos tripanosomátidos. Se ha reportado la utilización de antígenos específicos de *T. cruzi*, como antígeno de diagnóstico que van desde proteínas recombinantes hasta proteínas purificadas, como por ejemplo una enzima proteolítica dependiente de cisteína conocida como GP57/51 presente en proteínas que liberan los epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* durante la metaciclologénesis, una proteína de choque térmico de 70 kDa y una ubiquitina altamente específica, así como moléculas recombinantes como por ejemplo las transialidasas de la fase aguda (SAPA) y otros antígenos de excreción/secreción. Otros autores hacen mención a una glicoproteína de 90 kDa que se encuentra en los zimodemas de *T. cruzi*, pero está ausente en *Leishmania* y *T. rangeli* (50,52,77,81).

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar una seropositividad para anticuerpos

tipo IgG anti-*T. cruzi* de 7,10% para el municipio Montes. Seroprevalencias similares han sido reportadas en estudios realizados por Aguilera (65) en comunidades de Cocollar, municipio Montes, estado Sucre (n=378) quien reportó una seroprevalencia de 5,82% utilizando una prueba ELISA basada en el uso de extractos totales de las cepas de *T. cruzi* Tulahuén y Mn, incluyendo antígenos de membrana altamente inmunogénicos. Asimismo, Cerrada y cols. (82) en un estudio realizado en las comunidades rurales de Los Planes y San Pedro de Curielle en el estado Lara, con ELISA y MABA utilizando una proteína recombinante (pgr24), reportan una seroprevalencia de 8,5% (n= 435). Por su parte Rodríguez-Bonfante y cols. (83) reportan 6,9% de seroprevalencia en el municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara utilizando IFI y ELISA (epimastigotes fijados cepa Y).

Asimismo, otros investigadores han reportado cifras menores como por ejemplo: Aguilera (66) en un estudio realizado en Miraflores, estado Monagas,

utilizando la técnica ELISA (epimastigotes fijados), reporta una seroprevalencia de 2,83%. Serrano y cols. (84), en un estudio realizado en dos localidades del municipio Costa de Oro en el estado Aragua, reportan 1,02% de seroprevalencia (n= 2) utilizando ELISA y HAI. Sin embargo, en otras investigaciones realizadas en el estado Sucre utilizando la prueba de ELISA indirecto (extractos totales de las cepas de *T. cruzi* Tulahuén y Mn, incluyendo antígenos de membrana altamente inmunogénicos) señalan seroprevalencias mayores. González (60) reportó un elevado porcentaje de seropositividad (21,93%), para la determinación de anticuerpos del tipo IgG anti-*T. cruzi*, en la parroquia Catuaro del municipio Ribero. Flores (64) señala, en un estudio realizado en diferentes comunidades rurales del municipio Montes, una seroprevalencia de 12,50% (n= 21), similarmente Abreu (63), en un estudio realizado en los Altos de Sucre, municipio Sucre, encontró una seroprevalencia de 15,26%.

Cannova y cols. (85), en un estudio realizado en Las Cuevas, estado Carabobo (n= 108), reportan una seroprevalencia de 12% utilizando una prueba ELISA basada en el uso de un extracto crudo de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* sonicados. Asimismo Sandoval y cols. (86) muestran una seroprevalencia de 19,2% (n=647) en 8 comunidades rurales de Trujillo utilizando IFI, aglutinación indirecta y ELISA, Traviezo y Bonfante (87) por su parte, en un estudio realizado en la localidad de el Caballito, municipio Simón Planas, estado Lara, (utilizando IFI y Strout) reportan una seroprevalencia de 24,2%.

La distribución de los 22 casos obtenidos por ambas pruebas (7,10%), se presenta en la tabla 3, donde se puede observar que en 8 de un total de 12 centros poblados evaluados, se encontraron individuos seropositivos para infección por *T. cruzi*, quedando distribuidos en los siguientes centros poblados: San Salvador 1,30%, Los Dos Ríos 1,30%, Las Calderas-El Zamuro 0,64%, Los Dos Ríos-Los Mangos 0,64%, Las Vegas-El Naranjal 0,96%, El Potrero 1,30%, San Fernando de Tataracual 0,64% y Sabaneta 0,32%, estos resultados difieren de los reportados por Flores (64)

quien en un estudio realizado en diferentes localidades rurales del municipio Montes, reportó porcentajes considerables de seropositividad: 7,40% para el centro poblado Tres Picos, y de 12,0% para El Maco, en nuestro estudio no obtuvimos casos positivos en esos centros poblados.

Tabla 3. Seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en diferentes centros poblados del municipio Montes, para la validación de la prueba ELISA-ESEA.

Centro poblado	n total	n positivos/Seroprevalencia (%)
San Salvador	32	(4)/1,30
Begote	43	-
Mapurite	25	-
Tres picos	24	-
Aricagua	17	-
Los Dos Rios	24	(4)/1,30
Las Calderas-El Zamuro	17	(2)/0,64
Los Dos Rios-Los Mangos	30	(2)/0,64
Las Vegas-El Naranjal	29	(3)/0,96
El Potrero	31	(4)/1,30
San Fernando de Tataracual	21	(2)/0,64
Sabaneta	17	(1)/0,32
Total	310	(22)/7,10

Con la finalidad de evaluar la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y los factores de riesgo para la transmisión vectorial, fue aplicada una encuesta epidemiológica a los sujetos participantes en el estudio. Estos factores fueron clasificados en: individuales (edad, sexo, ocupación, nivel de conocimiento de la enfermedad, haber habitado en casas de bahareque, tiempo de residencia en la vivienda actual y tiempo de haber visto al vector), factores domiciliarios (tipo de vivienda, paredes, techo, piso, desorden intradomiciliario, presencia de animales domésticos y silvestres en el interior de la vivienda) y factores peridomiciliarios (plantaciones de palma, corrales, anexos de bahareque, cuevas de animales y presencia de animales silvestres y domésticos). De todos estos factores resultaron

asociados a la seropositividad a *T. cruzi*: edad, ocupación, habitar en casas de bahareque, tiempo de residencia en la vivienda actual y tiempo de haber visto al vector.

En la tabla 4, se puede observar la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y la edad de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre. Se encontró que la edad es un factor de riesgo altamente asociado ($p < 0,05$) a los seropositivos, evidenciándose un predominio de casos positivos en la población mayor de 61 años (3,87%), seguido de 3,23% para el grupo de sujetos menores de 60 años, sólo se detectó un caso positivo en un individuo de 14 años.

Tabla 4. Asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y la edad de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.

Grupo etéreo	Negativos	Positivos	Total	
	n	n	n	
<60 años	265 (85,48%)	10 (3,23%)	275 (88,71%)	
>61 años	23 (7,42%)	12 (3,87%)	35 (11,29%)	
Total	288	22	310	$\chi^2 = 39,71$
%	(92,90%)	(7,10%)	(100%)	+p= 0,0000***

n: número total de pacientes; χ^2 : valor experimental para la prueba de Chi-cuadrado; ***: $p < 0,001$ (altamente significativo). +Con la corrección de Yates.

El mayor porcentaje de individuos afectados son mayores de 60 años, se ha demostrado que existe asociación entre la edad y la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Resultados similares fueron reportados en el estado Sucre por investigadores independientes en donde el 25% (61) y 87,20% (62) de los seropositivos eran mayores de 60 años. En Argentina, Perú, Nicaragua y Bolivia fueron encontradas seroprevalencias en mayores de 60 años de: 45,83%, 18,8%, 45,46% y 18,2%, respectivamente (88,89,90,91).

La seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en niños en el municipio Montes fue baja, sin embargo, quedó demostrada la transmisión vectorial activa en esta región. Diferentes estudios realizados en la región centro occidental del país muestran transmisión vectorial activa en individuos menores de 15 años Serrano y cols. (84) en un estudio llevado a cabo en el estado Aragua encontraron 1,02% de seropositividad en menores de 16 años, asimismo Sandoval y cols. (86) encontraron seropositividades de 2,8% en niños de ocho comunidades rurales del estado Trujillo, mientras que Traviezo y Bonfante (87) reportan en el estado Lara un 5% de seropositividad en niños menores de 10 años. Sin embargo, Barrera (92) en un estudio llevado a cabo en el estado Táchira al analizar 214 muestras de niños y adolescentes menores de 15 años no encontró seropositividad.

La enfermedad de Chagas es de curso crónico, los mayores porcentajes de seropositividad obtenidos en esta investigación se encuentran en el grupo de sujetos mayores de 60 años, por lo que refleja exposición antigua, sin embargo, el hallazgo de casos positivos en niños y adolescentes es atribuible a infección aguda y podría ser debido al inicio temprano de las actividades laborales, a la permanencia en áreas selváticas o presuntivamente por infección oral por alimentos contaminados (93,94).

El hallazgo de un caso agudo en la zona estudiada, indica que la enfermedad pareciera estar reemergiendo debido a la detección de casos agudos en entidades federales, la existencia de transmisión activa es un evento que debe estudiarse con la finalidad de tomar medidas de control. La detección de casos agudos de la enfermedad en zonas rurales endémicas ha sido un verdadero problema debido a que se presenta principalmente en niños, generalmente asintomática, sólo entre 1 y 2 % de los casos presentan síntomas que se asemejan a una infección viral (fiebre, cefaleas, mialgias), siendo los signos típicos de la enfermedad, el Chagoma de inoculación y el signo de Romaña. La detección de la infección aguda en niños es importante incluso

si son asintomáticos porque permite la aplicación de una terapia oportuna y específica (94,95,96).

En la tabla 5, se evalúa la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y la ocupación de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre, aquí se evidencia que la ocupación es un factor de riesgo asociado ($p < 0,05$) a los seropositivos, siendo los individuos de mayor riesgo los que se dedican a la agricultura. De los 22 casos positivos, 13 (4,19%) se dedican a la agricultura, seguido de las labores del hogar 2,26% ($n = 7$), y sólo 0,65% de los positivos fueron estudiantes.

Tabla 5. Asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y la ocupación de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.

Ocupación	Negativos	Positivos	Total	
	n	n	n	
Hogar	94	7	101	
%	(30,32%)	(2,26%)	(32,58%)	
Agricultura	100	13	113	
%	(32,26%)	(4,19%)	(36,45%)	
Estudiante	94	2	96	
%	(30,32%)	(0,65%)	(30,97%)	
Total	288	22	310	$\chi^2 = 6,99$
%	92,90%	7,10%	100%	$p = 0,03^*$

n: número total de pacientes; χ^2 : valor experimental para la prueba de Chi-cuadrado; *: $p < 0,05$ (significativo).

Estos resultados son comparables con los reportados por Aza (62) quien señaló un predominio de seropositivos en agricultores 28,95% en Santa Fe, estado Sucre. Igualmente Sánchez y cols. (97), en Arequipa Perú, encontraron un mayor porcentaje de seropositividad en individuos que se dedican a la agricultura (41,18%). Sin embargo, difieren de otros trabajos realizados en el estado Sucre, en donde se reportaron mayores índices de seropositividad en personas dedicadas a las labores del

hogar, por su parte en Cochabamba Bolivia, Albarracín y cols. (91) señalaron una seroprevalencia de 17,2% en amas de casa.

La enfermedad de Chagas es propia de zonas rurales deprimidas socioeconómicamente, la principal actividad económica del municipio estudiado es la agricultura, con especial énfasis en la producción de caña de azúcar, café y el cultivo de hortalizas. Es un área predominantemente montañosa, con temperaturas promedio de 25° a 27 °C, humedad relativa de 85-95% y presencia de palmas, condiciones propicias para la transmisión vectorial. En su empeño por sobrevivir, los seres humanos buscan en la naturaleza alimentos y cobijo, y para ello cazan, siembran, domesticar animales y construyen casas para sí mismos y corrales para sus animales, en esa actividad se introducen en los medios naturales en donde se encuentran el vector y el parásito permitiendo el encuentro, también al modificar el hábitat natural provocan la migración de vectores que pueden ser portadores de los parásitos, favoreciendo el encuentro y la enfermedad (94,98,99).

La enfermedad afecta áreas rurales, donde las condiciones ambientales aunadas a las tradicionales culturas de sus habitantes y las precarias condiciones socioeconómicas, favorecen que el vector conviva en las viviendas con los humanos y reservorios domésticos, propiciando la continuidad de la endemia (100).

Esta zoonosis afecta a hombres y mujeres por igual, ya sea en el campo o en el interior de la vivienda, debido a que los triatomíneos poseen hábitos silvestres e intradomiciliarios. Aunque algunos autores señalan que los pobladores de estas regiones por ser esencialmente agricultores acumulan en el interior de sus viviendas una gran cantidad de insecticidas y fertilizantes que ayudan a mantener una atmósfera de repelencia a insectos estáticos y de reposo como lo son los triatomíneos (100,101).

La tabla 6, muestra la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y el tiempo en que fue visto el vector por última vez en los diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre. Aquí se evidencia que la seropositividad en los individuos está altamente asociado a la presencia del vector en la comunidad hace más de 5 años ($p < 0,05$), vale la pena destacar que de los 22 pacientes seropositivos para la infección por *T. cruzi*, 3,55% ($n=11$) vieron al vector hace más de 5 años. El 2,58% de los seropositivos afirmó haberlo visto en la zona recientemente, este hallazgo coincide con la captura de un ejemplar de *Rhodnius prolixus* al realizar la inspección de las viviendas.

La intensa campaña anti-chagásica realizada en el país durante los años 60, redujo la enfermedad en las zonas consideradas endémicas, la campaña incluyó: lucha contra el vector mediante rociamiento de las viviendas, mejoramiento de las viviendas y tamizaje en los bancos de sangre. El Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en el país se ha debilitado considerablemente, como consecuencia de la aparición de enfermedades reemergentes y emergentes (malaria y dengue) aunado a la reducción de recursos por parte del gobierno central para el apoyo de este programa (102,103).

Tabla 6. Asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y el tiempo en el cual los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre, vieron al vector por última vez.

Tiempo	Negativos	Positivos	Total	
	n	n	n	
Último año	39	8	47	
%	15,58%	2,58%	15,16%	
<5 años	119	3	122	
%	38,39%	0,97%	39,35%	
>5 años	130	11	141	
%	41,94%	3,55%	45,48%	
Total	288	22	310	$\chi^2 = 11,11$
%	92,90%	7,10%	100%	$p = 0,0039^{**}$

n: número total de pacientes; χ^2 : valor experimental para la prueba de Chi-cuadrado; **: $p < 0,01$ (muy significativo)

Las principales condiciones para el establecimiento de la enfermedad de Chagas en las zonas de riesgo son la presencia del insecto vector, animales domésticos o silvestres que sirvan como reservorios, circulación del parásito, condiciones socioeconómicas de la región, tipo de vivienda y hacinamiento, condiciones que favorecen la transmisión activa de *T. cruzi* (101,104).

En el ciclo silvestre los triatomíneos están ubicados en ecotopos con características particulares: *Rodhnius* sp. se ha encontrado asociado principalmente a las palmeras, *Panstrongylus* sp. a las cavidades y huecos de palmas, en árboles y también en madrigueras de vertebrados silvestres y *Triatoma* sp. es de hábitats rocosos y madrigueras de roedores (105).

La tabla 7, refleja la asociación de la seropositividad a *T. cruzi* y el haber habitado casas con paredes de bahareque, en individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre. La prueba de Chi-cuadrado demostró que haber vivido en viviendas con paredes de bahareque está muy asociado a un mayor riesgo de adquirir la infección por *T. cruzi* ($p < 0,01$).

Tabla 7. Asociación de la seropositividad a *T. cruzi* y haber habitado viviendas con paredes de bahareque, en individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.

Pared de bahareque	Negativos n	Positivos n	Total n	
Si	120	16	136	
%	(38,71%)	(5,16%)	(43,87%)	
No	168	6	174	
%	(54,19%)	(1,94%)	(56,13%)	
Total	288	22	310	
%	(92,90%)	(7,10%)	(100%)	$\chi^2 = 6,80$ +p= 0,009**

n: número total de pacientes; χ^2 : valor experimental para la prueba de Chi-cuadrado; **: $p < 0,01$ (muy significativo), +Con la corrección de Yates.

Resultados similares fueron obtenidos en Aragua en donde 13% de los seropositivos habitaban viviendas de bahareque (84), en el estado Carabobo Cannova y cols. (85) reportaron que 53,8% vive en casas con paredes de bahareque, asimismo en un estudio realizado en el estado Lara (87) se encontró que un porcentaje considerable de seropositivos habitaba en viviendas con paredes de bahareque (100%). En Arequipa, Perú, Sánchez y cols. (97) reportaron que 15,07% de los seropositivos residían en casas con paredes de material rústico y en Cochabamba, Bolivia Albarracín y cols. (91) encontraron que un 76,7% de los seropositivos vivían en casas con paredes de material rústico (bahareque).

Uno de los factores de riesgo más relevante es el tipo de construcción de la vivienda, las paredes de bahareque presentan micrositos o fisuras que ofrecen un microclima ideal para la domicialización acelerada de los triatominos ya que le ofrecen las condiciones ideales de temperatura y humedad, similares a los presentes en el ciclo silvestre. Habitar en una vivienda de material rústico está asociado de manera significativa a un mayor riesgo de infectarse por *T. cruzi*, ya que se favorece la instalación del ciclo intradomiciliario donde los vectores pueden reproducirse y desarrollarse dentro de la casa o en el peridomicilio y son activos durante la noche, alimentándose de los habitantes del domicilio, animales domésticos y sinantrópicos (87,91,93,94).

En la tabla 8, se muestra la asociación de la seropositividad a *T. cruzi* y el tiempo de residencia en la misma vivienda en individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre. La prueba Chi-cuadrado demostró que existe asociación altamente significativa ($p < 0,001$) entre la seropositividad a *T. cruzi* y el tiempo de residencia en la misma vivienda. Los individuos que habitan en la misma vivienda por más de 10 años tienen un riesgo mayor a adquirir la infección por *T. cruzi*.

Tabla 8. Asociación de la seropositividad a *T. cruzi* y el tiempo de residencia de los individuos de diferentes centros poblados del municipio Montes, estado Sucre.

Tiempo	Negativos	Positivos	Total	
	n	n	n	
<10 años	40	10	50	
%	(12,90%)	(3,23%)	(16,13%)	
>10 años	248	12	260	
%	(80,80%)	(3,87%)	(83,87%)	
Total	288	22	310	$\chi^2 = 12,81$
%	(92,90%)	(7,10%)	100%	+ p= 0,0003***

n: número total de pacientes; χ^2 : valor experimental para la prueba de Chi-cuadrado; ***: p<0,001 (altamente significativo). +Con la corrección de Yates.

Herrera y cols. (103) reportan, en un estudio llevado a cabo en caseríos de tres áreas rurales de Venezuela, que los individuos seropositivos de esas regiones han permanecido en esas áreas y por ende en la misma vivienda por más de 20 años (Anzoátegui 79%, Guárico 60% y Cojedes 76%).

Los factores de riesgo no asociados resultaron ser: individuales (sexo y nivel de conocimiento de la enfermedad), factores domiciliarios (tipo de vivienda, techo, piso, desorden intradomiciliario, presencia de animales domésticos y silvestres en el interior de la vivienda) y factores peridomiciliarios (plantaciones de palma, corrales, anexos de bahareque, cuevas de animales y presencia de animales silvestres y domésticos) (Apéndices 9,10,11,12,13).

El sexo fue un factor no asociado a la seropositividad a *T. cruzi*, observándose un predominio de casos positivos para el sexo femenino 4,84% (n=15), sobre el masculino 2,26% (n=7) (apéndice 6). No se encontró asociación estadísticamente significativa, lo que nos indica que el sexo no es un factor de riesgo asociado a la infección por *T. cruzi*, la enfermedad de Chagas puede afectar a hombres y mujeres por igual, ya que ambos sexos están expuestos al vector ya sea en el campo, durante la realización de actividades agrícolas, o a nivel intradomiciliar. Cannova y cols. (85) reportaron 54,6% de seropositividad en mujeres de Las Cuevas, estado Carabobo.

Añez y cols. (93) señalan al género masculino como el más afectado, quizá por su dedicación a los trabajos de agricultura. Rojas y cols. (96), en un estudio realizado por ELISA y MABA, reportaron un bajo porcentaje de seropositividad (25%) en mujeres.

Al evaluar el nivel de conocimiento acerca de la enfermedad de Chagas (forma de transmisión y daños que produce) de los pobladores de las comunidades rurales estudiadas, sólo 17,42% poseen un buen nivel de conocimiento acerca de la patología estudiada y 82,58% poseen conocimientos escasos, es importante señalar que de éste último grupo el 5,81% resultaron positivos para *T. cruzi*. Serrano y cols. (84) reportan que 40% de los encuestados poseen buen nivel de conocimiento acerca de la enfermedad. A pesar de la importancia del conocimiento de los factores de riesgo en áreas endémicas, estudios sociológicos revelan un conocimiento muy limitado de la enfermedad y su transmisión, el nivel de conocimientos que posean los habitantes de estas áreas consideradas de riesgo acerca de la enfermedad y sus vectores debería ser un elemento más para su prevención y control, ya que al conocer perfectamente su situación podrían de alguna manera protegerse a sí mismos y a sus familiares. Es evidente el papel de la educación como herramienta fundamental en la lucha contra la enfermedad, por ser el medio más indicado para promover cambios permanentes en las personas (101).

Se analizaron un total de 72 viviendas, de las cuales 72,22% eran casas consolidadas y 27,78% eran viviendas tipo rancho, definiéndose como vivienda consolidada aquella construida con materiales como bloque o ladrillo frisado o sin frisar, concreto, madera aserrada, adobe, con techos de concreto o láminas y piso de cemento, y rancho es la vivienda construida con materiales como tablas, cartón, caña, con paredes de lámina, bahareque y pisos de tierra (98).

Se puede observar además que 18,06% de las casas bien consolidadas están habitadas por seropositivos, mientras que en 6,94% de los ranchos viven individuos infectados por *T. cruzi*. La mayoría de las viviendas analizadas poseen techos de zinc (88,89%), paredes de bloque (43,06%) o adobe frizado (33,33%) y pisos de tierra (50%) o cemento (50%) (Apéndice 7).

Morocoima (94), en el estado Anzoátegui, detectó un caso agudo de tripanosomiasis, cuya vivienda era tipo rancho con paredes de zinc y piso de tierra. Serrano y cols. (84) en Costa Oro, estado Aragua, señalan que de las viviendas analizadas, 78,3% estaban constituidas por casas con paredes de bloque y 51,7% tenían techos de láminas de zinc y 95% con pisos de cemento. El 63,2% eran ranchos con paredes de láminas, 94,7% con techo de láminas y piso de tierra (68,45%), paredes de bahareque (13%), de los dos casos positivos reportados habitaban en ranchos. Cannova y cols. (85) muestran que, en Las Cuevas estado Carabobo, todos los seropositivos habitaban en ranchos con paredes de bahareque (53,8%) y techos de palma. En el trabajo de Traviezo y Bonfante (87) los factores de riesgo relevantes fueron casas de bahareque (86%), en su mayoría con techos de zinc, 9,4% presentaban techos de paja, 100% de las viviendas tenían paredes de bahareque permitiendo que los triatomíneos vivan entre las grietas de éstas durante el día para salir de noche a ingerir sangre.

La infección de este parásito tiene una connotación negativa, ha sido asociada con niveles socioeconómicos bajos y viviendas precarias, especialmente en áreas rurales, pero también se debe a la migración desde estas regiones hasta las grandes ciudades. El alto grado de infección está relacionado de manera directa con la pobreza y factores como: existencia del triatómimo, reservorios, edad del sujeto susceptible y la cepa del parásito (98,106).

Las viviendas típicas de la enfermedad de Chagas son tipo rancho, con techo de zinc, paja o barro, piso de tierra, paredes de adobe agrietadas; este tipo de viviendas favoreció en el pasado la domicialización de vectores y constituye un cuadro típico de un área endémica de la enfermedad de Chagas, la perpetuación de las construcciones de esta naturaleza crean nichos ecológicos que permiten la adaptación y reproducción bajo condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de fuentes de alimentación a los vectores de importancia epidemiológica (98,99).

La transmisión de la infección también puede llevarse a cabo en casas bien consolidadas, donde es posible la domiciliación de vectores y mantener la cadena epidemiológica del agente infeccioso, el factor predisponente en este caso sería el hacinamiento que favorece indirectamente el ciclo intradomiciliario, pobres condiciones higiénicas y las costumbres de sus habitantes que forman parte de su cultura, juegan un papel importante favoreciendo condiciones para la persistencia de triatomos y por ende la transmisión de la enfermedad (98,99,106).

Al evaluar los factores intradomiciliarios de las 72 viviendas analizadas, los resultados obtenidos para la presencia de animales domésticos en el interior de la vivienda fueron que el perro representó un mayor porcentaje (44,44%), seguido del gato (31,94%) y las gallinas (27,78%). En los domicilios de los seropositivos la presencia de perros y gallinas representaron un mayor porcentaje (8,33%) y gatos (5,56%). El animal silvestre más comúnmente encontrado en el interior de las viviendas de los seropositivos fueron los roedores (18,06%) y 18,06% de las viviendas analizadas presentaban desorden en su interior para el momento de la visita.

En un estudio llevado a cabo en tres estados de Venezuela, Herrera y cols. (103) encontraron que el animal doméstico más común en las viviendas de los seropositivos fue la gallina (43% en Anzoátegui, 18% en Guárico y 37% en Cojedes), seguido del

perro (20% en Anzoátegui, 17% en Guárico y 16% en Cojedes). Traviezo y Bonfante (87) reportan que en las 53 viviendas analizadas en la localidad del Caballito, estado Lara la presencia de gallinas 92,4%, perros 83% y gatos 45%. Hoyos y cols. (107) en Morroa, Colombia detectaron la presencia de animales relacionados a la enfermedad de Chagas en el siguiente orden de importancia: perros 57,2% y gallinas 44,4%, por su parte, Sánchez y cols. (97) en Arequipa Perú reportaron 10,27% de mamíferos en el interior de la vivienda de los seropositivos.

En cuanto a los factores peridomiciliarios los más comúnmente observados para los seropositivos en la zona estudiada fueron: presencia de cachicamos 1,39%, rabipelados 1,39%, sembradíos de palma 13,89%, gallineros 19,44%, anexos de bahareque 38,89% y cuevas de animales silvestres 19,44%. Los animales podrían ser fuentes de alimento o emitir sustancias atrayentes al vector, y si aunado a esto, la vivienda cuenta con las condiciones adecuadas favorecen la colonización. Los perros y gatos son reservorios domésticos del parásito, las aves aunque no son susceptibles a la infección constituyen una fuente alimenticia para los triatomíneos atrayéndolos hacia las viviendas. Es bien sabido que en *Didelphis marsupialis* el ciclo evolutivo de *T. cruzi* ocurre de manera casi similar que en el insecto vector, por lo que su presencia en los alrededores de la vivienda es un factor de riesgo predisponente en la transmisión de la enfermedad tanto vectorial como oral, por contaminación de sus heces o por secreciones de sus glándulas anales (91,108,109).

Habitualmente conviven con las personas o muy cercanos a ellas diferentes animales domésticos que sirven de reservorios a *T. cruzi* como es el caso del perro, lo cual contribuye a la transmisión de la enfermedad. En el medio rural el canino es un animal que está muy expuesto a los triatomíneos por ser un animal no estático, en muchas ocasiones duerme, caza y se alimenta de carne de animales silvestres infectados en áreas selváticas pericomunitarias. Las gallinas aunque son consideradas

refractarias de la enfermedad, pueden servir de alimento a vectores peridomésticos como *T. maculata* o *R. prolixus* (87,93,95).

Otro factor de importancia es la migración humana incontrolada procedente de áreas endémicas, llevando reservorios domésticos y vectores infectados, la urbanización desorganizada y la evaluación de especies de mamíferos selváticos infectados, son elementos a estudiar para conocer que la infección se transforme o mantenga en la región (101,103).

El presente trabajo permitió la estandarización de una prueba ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, utilizando como antígeno proteínas excretadas/secretadas de las formas epimastigote de *T. cruzi* al medio de cultivo axénico utilizando una cepa autóctona de la región (AU). La producción de los ESEA es relativamente fácil, económica, poseen un elevado rendimiento antigénico y pueden ser utilizadas en laboratorios de escasos recursos. La utilización de estas proteínas como antígeno de diagnóstico no ha sido previamente descrito, por lo que este trabajo proporciona una técnica novedosa que arrojó valores de sensibilidad y especificidad aceptables (98% y 88%, respectivamente). Luego de la estandarización se procedió a validar el antígeno en una zona rural del estado Sucre, específicamente el municipio Montes evaluándose también la posible asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* obtenida y los posibles factores de riesgo para la transmisión vectorial, lo cual permitió obtener cifras actuales acerca de la situación de la enfermedad de Chagas en el municipio Montes. La prueba ESEA-ELISA estandarizada permitió detectar 25,81% de seropositivos al estudiar 310 muestras de suero en las 12 comunidades rurales estudiadas. Las cifras de seropositivos obtenidas por ambas pruebas serológicas fue de 7,10%. El mayor número de seropositivos se encontró en personas del sexo femenino (factor no asociado) con edades superiores a los 60 años, sólo se detectó un caso de seropositividad en un adolescente de 14 años, lo cual es indicio de transmisión vectorial reciente y activao presuntivamente

infección oral por alimentos contaminados. Con los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda el uso de los ESEA como antígenos para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en estudios epidemiológicos, pero en conjunto con otra prueba serológica como por ejemplo la hemaglutinación indirecta (HAI).

CONCLUSIONES

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* secretan/excretan al medio de cultivo axénico, proteínas de masa molar intermedia de las cuales la banda de 60 Mr es altamente inmunogénica.

Los ESEA resultaron ser excelentes candidatos como antígenos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas, ya que son de fácil producción, económicos, de elevado rendimiento antigénico, por lo que pueden ser utilizados en laboratorios de escasos recursos.

El ELISA estandarizado utilizando los antígenos ESEA arrojó valores aceptables de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, por lo que puede ser utilizado como método diagnóstico, en estudios epidemiológicos corroborando los resultados obtenidos con otra técnica serológica, como por ejemplo HAI.

La seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en el municipio Montes es elevada (7,10%).

En la presente investigación la seropositividad a la infección por *T. cruzi* se encontró significativamente asociada a la edad, ocupación, tiempo en el que fue visto el vector en la comunidad, la permanencia en la misma vivienda por más de 10 años y habitar en casas con paredes de bahareque.

El hallazgo de un caso positivo en un adolescente de 14 años es indicativo de la existencia de transmisión vectorial activa en esta región de Venezuela.

RECOMENDACIONES

Utilizar medios de cultivo definidos para el crecimiento de los epimastigotes de *T.cruzi*.

Realizar zimogramas para verificar la presencia de proteasas, que podrían interferir con la estabilidad de las proteínas ESEA.

Utilizar los ESEA como antígenos en el formato Western blot y evaluarlas tanto con sueros de pacientes chagásicos como con sueros de pacientes con parasitosis relacionadas (leishmaniasis).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira, L.; Britto, C.; Cardozo, M.; Fernandes, O.; Reinhard, K. y Araujo, A. 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop.*, 25: 79-84.
2. Rothhammer, F.; Allison, M., Nuñez, L.; Standen, V. y Arriaza, B. 1985. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 495-498.
3. WHO. 1999. Chagas disease, Chile. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 74: 9-16.
4. Incani, R. 2000. *Parasitología*. Ediciones Delforn. Valencia.
5. Ramírez, N.; Silva, L.; Kiriakos, D. y Rodríguez, A. 2004. *Enfermedad de Chagas en Venezuela: un bosquejo de su impacto sobre la salud pública*. Acta Científica Estudiantil. Universidad Central de Venezuela.
6. Carbonell, J.; Rodríguez, M.; Goa, I.; Ovalles, T. y Garlin, G. 1989. Expresión de diferentes requerimientos nutritivos en *Trypanosoma cruzi* incubados a diferentes temperaturas en medios de cultivo con y sin suplementos proteicos. *Gac. Méd. Caracas*, 97(10/12): 299-312.
7. Citri, N. y Grossowicz, N. 1955. A partially defined cultured medium for *Trypanosoma cruzi* and some other haemoflagellates. *J. Gen. Microbiol.*, 13: 273-278.
8. Schuster, F. y Sullivan, J. 2002. Cultivation of clinically significant haemoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3): 374-389.
9. Rodríguez, E.; Briceño, L.; Chiurilli, M.; Mosca, W. y Campos, Y. 2004. *Curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas*. Instituto de Biomedicina. Universidad Central de Venezuela.
10. Botero, D. y Restrepo, M. 1998. *Parasitosis humanas*. Tercera edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.
11. Neva, F. y Harold, W. 1994. *Basic clinical parasitology*. Paramount Publishing Business and Profesional Group. New York.

12. Hómez, J.; Soto, R.; De Soto, S.; Mendes, H. y Mármol, P. 1999. *Parasitología*. Universidad del Zulia, Maracaibo.
13. Amato, V.; Pasternak, J.; Everson, D. y Sabbaga, V. 1995. Chagas' disease in the context of organ transplantation. *Arq. Bras. Cardiol.*, 65: 389-391.
14. Blanco, S.; Segura, E.; Cura, E.; Chuit, R.; Tulian, L.; Flores, I.; Garbarin G.; Villalonga, F. y Gurtler, R. 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in North-Western Argentina. *Trop. Med. Int. Health*, 5: 293-301.
15. Camandaroba, E.; Pinheiro, C. y Andrade, S. 2002. Oral transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 44: 97-103.
16. Ferreira, C.; Martinho, P.; Amato Neto, V. y Cruz, R. 2001. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas Disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 43: 161-162.
17. Gurtler, R.; Segura, E. y Cohen, J. 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 29-32.
18. Tapia, F. 2007. "El mal de Chagas es más potente si la infección ocurre por vía oral". <<http://felixjtapia.org/blog/>> (Junio, 2009).
19. Informe ETA. 2006. *Consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA)*. Informe Final Panaftosa, Rio de Janeiro, Brasil.
20. Cura, E.; Wendel, S. y Pinheiro, F. 1994. *Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre*. PAHO, Washington (DC).
21. Junqueira, A.; Chiari, E. y Wincker, P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 129-132.
22. Kirchoff, L. 2006. "Chagas disease". <<http://www.ppa.com>> (Junio, 2007).
23. Krieger, M.; Almeida, E.; Oelemann, W.; Lafaille, J.; Pereira, J.; Krieger, H.; Carvalho, M. y Goldenberg, S. 1992. Use of recombinant antigens for the

- accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46: 427-434.
24. Hamerschlak, N.; Pasternak, J.; Amato, V.; de Carvalho, M.; Guerra, C.; Coscina, A.; Ferreira, O.; Rosenblit, J. y Szterling, L. 1997. Chagas' disease: an algorithm for donor screening and positive donor counseling. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 30: 205-209.
 25. Vieira, A.; Monteiro, H.; Jamil, S.; Peixoto, V. y Pinto, M. 2006. Assesment of chemiluminescence and PCR effectiveness in relation to conventional serological test for the diagnosis of Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39: 385-387.
 26. Bosseno, M.; Santos, L.; Baunaure, F.; Magallón, E.; Soto, M.; Lozano, F.; Dumonteil, E. y Brenière, S. 2006. Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74: 303-305.
 27. Feliciangeli, MD.; Carrasco, H.; Patterson, J.; Suárez, B.; Martínez, C. y Medina, M. 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* STA L, 1859 and *Panstrongylus geniculatus laterille*, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(4): 501-505.
 28. Almeida, I.; Covas, D.; Soussumi, J. y Travassos, L. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*, 37: 850-857.
 29. Pinho, R.; Pedrosa, R., Costa-Martins, P. y Castello-Branco, L. 1999. Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas' disease in endemic areas. *Acta Trop.*, 72: 31-38.
 30. Partel, C. y Rossi, C. 1998. A rapid, quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Chagas disease. *Immunol. Invest.*, 27: 89-96.
 31. Solana, M.; Katzin, A.; Umezawa, E. y Miatello, C. 1995. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas Disease. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1456-1460.
 32. Antas, P.; Azevedo, E.; Luz, M.; Medrano-Mercado, N.; Chaves, A.; Vidigal, P.; Volpini, A.; Romanha, A. y Araujo-Jorge, T. 2000. A reliable and specific

enzyme-linked immunosorbent assay for the capture of IgM from human chagasic sera using fixed epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, 86: 813-820.

33. Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Gottschalk, M.; Ache, A.; Vasquez, F.; Lacouture, S.; Medina, M. y Ward, B. 2004. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1766-1769.
34. Carbonetto, C.; Malchiodi, E.; Chiaramonte, M.; Zwirner, N. y Margni, R. 1989. Use of formalinized epimastigotes for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies using immunoenzyme technics. *Rev. Argent. Microbiol.*, 21: 79-83.
35. De Hubsch, R.; Chiechie, M.; Comach, G.; Aldao, R. y Gusmao, R. 1989. The Dot immunoenzymatic assay on nitrocellulose (Dot-ELISA) in the diagnosis of Chagas disease. II. Seroepidemiologic study in 4 rural communities of Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 401-408.
36. De Hubsch, R.; Chiechie, M.; Comach, G.; Rangel Aldao, R. y Gusmao, R. 1988. Immunoenzyme assay using micro Dot on nitrocellulose (Dot-ELISA) in the diagnosis of Chagas' disease. I. Comparative study of 2 antigenic preparations of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83: 277-285.
37. Araujo, F. y Guptill, D. 1984. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 362-371.
38. Almeida, E.; Krieger, M.; Carvalho, M.; Oelemann, W. y Goldenberg, S. 1990. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 513-517.
39. Da Silveira, J.; Umezawa, E. y Luquetti, O. 2001. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.*, 17: 286-291.
40. Cetron, M.; Hoff, R.; Kahn, S.; Eisen, H. y Van Voorhis, W. 1992. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural northeastern Brazil endemic for Chagas disease. *Acta Trop.*, 50: 259-266.

41. Ferreira, A.; Belem, Z.; Lemos, E.; Reed, S. y Campos-Neto, A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4390-4395.
42. Godsel, L.; Tibbetts, R.; Olson, C.; Chaudoir, B. y Engman, D. 1995. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2082-2085.
43. Gomes, Y.; Pereira, V.; Nakazawa, V.; Rosa, D.; Barros, M.; Ferreira, A.; Silva, E., Ogatta, S.; Krieger, M. y Goldenberg, S. 2001. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant- Chagas-Biomanguinhos kit. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 497-501.
44. Houghton, R.; Benson, D., Reynolds, L.; McNeill, P.; Sleath, P.; Lodes, M.; Skeiky, Y.; Badaro, R.; Krettli, A. y Reed, S. 2000. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J. Infect. Dis.*, 181: 325-330.
45. Kesper, N.; De Almeida, K.; Stolf, A. y Umezawa, E. 2000. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.*, 86: 862-867.
46. Matsumoto, T.; Cotrim, P.; Da Silveira, J.; Stolf, A. y Umezawa, E. 2002. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 42: 187-192.
47. Oelemann, W.; Vanderborcht, B.; Verissimo Da Costa, G.; Teixeira, M.; Borges-Pereira, J.; De Castro, J.; Coura, J.; Stoops, E.; Hulstaert, F.; Zrein, M. y Peralta, J. 1999. A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas disease. *Transfusion*, 39: 711-717.
48. Meira, W.; Galvao, L.; Gontijo, E.; Machado-Coelho, G.; Norris, K. y Chiari, E. 2002. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3735-3740.
49. Umezawa, E.; Bastos, S.; Coura, J.; Levin, M.; Gonzalez, A.; Rangel-Aldao, R.; Zingales, B.; Luquetti, A. y Da Silveira, J. 2003. An improved

serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, 43: 91-97.

50. Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M. y Ward, B. 2006. Purified Excreted-Secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.*, 44: 291-296.
51. Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M. y Ward, B. 2006. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: Comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote secreted-excreted antigens (TESA) from two *T. cruzi* strains. *Transfusion Med.*, 16: 419-431.
52. Nakazawa, M.; Rosa, D., Pereira, V., Moura, M., Furtado, V.; Souza, W., Barros, M.; Abath, F. y Gomes, Y. 2001. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 1024-1027.
53. Umezawa, E.; Nascimento, M.; Kesper, N.; Coura, J.; Borges-Pereira, J., Junqueira, A. y Camargo, M. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2143-2147.
54. Umezawa, E.; Nascimento, M. y Stolf, A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 39: 169-176.
55. Lugo, R. y Irauzquin, M. 1997. Desarrollo y sobrevivencia de los huevos y ninfas I de *Panstrongylus geniculatus*, (Hemiptera: Reduviidae: triatominae) en un gallinero. *Arch. Venez. Med. Trop.*, 1: 94-97.
56. Añez, N.; Crisante, G. y Rojas, A. 2004. Update on Chagas' disease in Venezuela - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 781-787.
57. Rodríguez-Bonfante, C.; Amaro, A.; García, M.; Mejías, W.; Guillen, P.; Antonio, G.; Álvarez, N.; Díaz, M.; Cárdenas, E.; Castillo, S.; Bonfante-Garrido, R. y Bonfante-Cabarcas, R. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saúde Pública*, 23(5):1133-1140.

58. Feliciangeli, MD.; Sánchez-Martín, M.; Suárez, B.; Marrero, R.; Torrellas, A.; Bravo, A.; Medina, M.; Martínez, C.; Hernández, M.; Duque, N.; Toyo, J.; y Rangel, R. 2007. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(5): 915-921.
59. Feliciangeli, M.; Campbell-Lendrum, D.; Martínez, C.; González, D.; Coleman, P. y Davies, D. 2003. Chagas' disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.*, 19: 44-49.
60. González, N. 2001. Estudio retrospectivo del mal de Chagas en el banco de sangre del Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá y evaluación serológica en el municipio Ribero, estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
61. Figuera, L. 2002. Estudio seroepidemiológico del Mal de Chagas en los municipios Arismendi y Ribero del estado Sucre. Trabajo de grado para optar al título de *Magíster Scientiarum* en Biología Aplicada, mención Microbiología aplicada, Universidad de Oriente, núcleo de Sucre, Cumaná.
62. Aza, T. 2003. Evaluación seroepidemiológica del mal de Chagas en la población de San Pedro, parroquia Santa Fe del municipio Sucre, estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
63. Abreu, L. 2003. Evaluación seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en la población de Los Altos de Sucre del municipio Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
64. Flores, V. 2003. Evaluación serológica de *Trypanosoma cruzi* en las comunidades rurales de Cocollar y las Piedras de Cocollar, municipio Montes, estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
65. Aguilera, K. 2003. Evaluación serológica de *Trypanosoma cruzi* en las comunidades rurales de Cocollar y las Piedras de Cocollar, municipio Montes, estado Sucre. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
66. Aguilera, G. 2008. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad en epimastigotes fijados. Trabajo de pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

67. González, N.; Galindo, I.; Guevara, P.; Novak, E.; Scorza, J.; Añez.; Da Silveira, J. y Ramírez, J. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 153-158.
68. Souto, R. y Zingalez, B. 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 62: 45-52.
69. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Ann. Biochem.*, 72:248-254.
70. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
71. Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 76: 4350-4354.
72. Ochoa, R. 2001. Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos. Tesis doctoral. Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana Instituto Finlay. La Habana, Cuba.
73. Wayne, D. 1999. *Bioestatics: a foundation for analysis in the health sciences*. John Wiley y Sons, INC., Toronto.
74. CIOMS. 1993. *Consejo de Organizaciones de las Ciencias Médicas*. Ginebra.
75. Gordis, L. 2004. *Epidemiology*. Third edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
76. Crowther, J. 2001. *The ELISA guidebook*. Human Press. New Jersey.
77. Racines, J. 1997. Fragmentación en geles de SDS-poliacrilamida e inmunotransferencia para la detección de antígenos de una cepa de *Trypanosoma cruzi* aislada en el país y su evaluación con el método de microELISA. Trabajo de Postgrado de Ciencias Básicas Biomédicas para obtención del Título de Máster en Ciencias Básicas Biomédicas con mención en Inmunología. Quito, Ecuador.

78. Cannova, D.; Aguilar, C.; Pacheco, M.; Simons, M. y Medina, M. 2003. Validación del inmuno ensayo enzimático (ELISA) y hemoaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Salus*, 6(3): 4-9.
79. Telles, S.; Abate, T.; Slezzynger, T. Y Henríquez, D. 2003. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 37(1):23-28.
80. Schechter, M.; Flint, J.; Guhl, F.; Marinkelle, C. y Miles, M. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet*, 2: 939-941.
81. Vargas, F. 2005. Epidemiología molecular de la tripanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región norte de nororiental del Perú. Tesis doctoral. Universidad de Granada-Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Perú.
82. Cerrada, R.; Godoy, V.; González, M.; Guevara, J.; Jaimes, L. y Lizcano A. 2005. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas y su relación con los factores de riesgo epidemiológicos en la población humana y canina en las áreas de influencia de los ambulatorios rurales Los Planes y San Pedro de Curielle del municipio Urdaneta, estado Lara. Trabajo de pre-grado. Universidad Centroccidental Lizandro Alvarado, Departamento de Medicina Preventiva y Social, Medicina Integral en el medio urbano. Barquisimeto, Venezuela.
83. Rodríguez-Bonfante, C.; Amaro, A.; García, M.; Mejías, L.; Guillen, P.; García, R.; Álvarez, N.; Díaz, M.; Cárdenas, E.; Castillo, S.; Bonfante-Garrido, R. y Bonfante-Cabarcas, R. 2007 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saúde Pública*, 23: 1133-1140.
84. Serrano, O.; Mendoza, F.; Suárez, B. y Soto A. 2008. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del municipio Costa de Oro, estado Aragua, Venezuela. *Biomédica*; 28:108-115.
85. Cannova, D.; Arvelo, L. y Simons, M. 2003. Seroepidemiología de tripanosomiasis americana sector Las Cuevas Estado Carabobo. *Rev. Salus*, 7(1): 28-33.

86. Sandoval, I.; Áñez, N.; Villegas, E. y Scorza, JV. 2003. Persistencia de la transmisión de la enfermedad de Chagas sin colonización por el vector conocido, en localidades controladas de Venezuela. *Rev. Soc. Venezolana de Microbiol.*, 3(2):166-168.
87. Traviezo, L. y Bonfante-Garrido, R. 2004. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad del Caballito, municipio Simón Planas, estado Lara. Venezuela. *Parasitol. Latinoam.*, 59: 46-50.
88. Biancardi, M.; Conca, M.; Torres, N.; Pepe, C.; Altcheh, J. y Freilij, H. 2003. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en 17 parajes del "Monte Impenetrable" de la provincia del Chaco. *Medicina*, 63: 125-129.
89. Solís, H.; Carvalho, E.; Ferreira, C.; Casanova, C.; Huaman, A. y Mendoza, V. 2003. Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona sur del Perú. *Ann. Fac. Med.*, 64(4): 223-227.
90. Palacios, X.; Belli, A. y Espino, A. 2000. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. *Rev. Panam. Salud Pública*, 8(6): 411-417.
91. Albarracín-Veizaga, H.; Carvalho, M.; Do Nascimento, E.; Rodríguez, V.; Casanova, C. y Barota, J. 1999. Chagas' disease in an area of recent occupation in Cochabamba, Bolivia. *Rev. Saúde Pública*, 33(3): 230-236.
92. Barrera, R. 2006. Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años del municipio Fernández Feo, estado Táchira, Venezuela. *Comunidad y Salud*, 4(1): 33-37.
93. Añez, N.; Crisante, G. y Parada, H. 2007. Nuevos casos agudos de enfermedad de Chagas en el occidente de Venezuela. *Rev. Salus*, 11(1): 87-90.
94. Morocoima, A.; Tineo, E.; Ferrer, E.; Herrera, L. y Núñez, M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol. Malariol. Salud Ambiental*, 48(2): 121-126.
95. Áñez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; González, N.; Ramírez, J.; Guevara, P.; Rivero, C.; Borges, R. y Scorza, JV. 1999. Acute Chagas's disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(2): 215-222.

96. Rojas, M.; Vásquez, P.; Villarreal, M.; Velandia, C.; Vergara, L.; Morán-Borges, Y.; Ontiveros, J.; Calderón, M.; Chiurillo-Siervo, M.; Rodríguez-Bonfante, C.; Aldana, E.; Concepción, J. y Bonfante-Cabarcas, R. 2008. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. *Cad. Saúde Pública*, 24(10):2323-2333.
97. Sánchez, Y.; Velásquez, R.; Vásquez, L.; Córdova, E.; Delgado, F.; Ballón, J.; Bocangel, C.; Ancca, J.; Rivas, L. y Zavallos, J. 2007. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en población adulta en una zona de alta endemicidad de Arequipa, Perú. *Acta Med. Per.*, 24(1): 22-26.
98. Canelón, M. y Rovira, D. 2002. Representaciones sociales de la enfermedad de Chagas en comunidades en riesgo: creencias, actitudes y prevención. *Inter. J. Psy.*, 36(1): 215-236.
99. Peixoto, W. 2007. Perfil sócio-cultural-econômico dos portadores de doença de Chagas em áreas endêmicas na zona rural do municipio de Mossoró-RN. *Rev. Verde*, 2(2):101-106.
100. Briceño-León, R. 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cad. Saúde Pública*, 25(1):71-82.
101. Sanmartino, M. y Crocco, L. 2000. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. *Rev. Panam. Salud Pública*, 7(3): 173-178.
102. León, M. y Páez, D. 2002. Representaciones sociales de la enfermedad de Chagas en comunidades en riesgo: creencias, actitudes y prevención. *Rev. Int. Psicol.*, 36(1): 215-236.
103. Herrera, L.; Aguilar, C.; Brito, A. y Morocoima, A. 2007. Conocimiento y riesgos de la infección para la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas en áreas rurales de Venezuela. *Rev. Salus*, 11(1): 27-32.
104. Ávila, G.; Martínez, M.; Ponce, C.; Ponce, E. y Soto, R. 1998. La enfermedad de Chagas en la zona central de Honduras: conocimientos, creencias y prácticas. *Rev. Panam. Salud Pública*, 3(3): 158-163.
105. Lozano, F.; Magallón, E.; Soto-Gutiérrez, M.; Kasten-Monges, M. y Bosseno, M. 2008. Conocimiento epidemiológico y situación actual de la

enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México. *Salud Pú. México*, 50(6): 508-515.

106. Turriago, B.; Vallejo, G. y Guhl, F. 2008. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. *Revista Med.*, 16(1): 11-18.
107. Hoyos, R.; Pacheco, L.; Agudelo, L.; Zafra, G.; Blanco, P. y Triana, O. 2007. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas y factores de riesgo asociados a una población de Morroa, Sucre. *Biomédica*, 27(1): 130-136.
108. Tórtora, C.; Bejarano, I.; Dipierri, J.; Alfaro, E. y García, T. 2000. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en escolares de Jujuy. *Medicina*, 60(4): 469-473.
109. Gütler, R.; Cecere, M.; Lauricella, M.; Cardinal, M.; Kitron, U. y Cohen, J. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural north western Argentina. *Parasitology*, 134(1): 69-82.

APÉNDICE

APÉNDICE 1

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Schneider's insect (SIGMA-ALDRICH®)

1. Medir en una fiola 80% del volumen final de agua destilada.
2. Adicionar el contenido del medio de cultivo (SIGMA-ALDRICH®) y agitar.
3. Enjuagar el empaque original hasta remover trazas de polvo.
4. Agregar a la solución 0,4 g de bicarbonato de sodio por cada litro de volumen final de medio (1 l).
5. Ajustar a pH 9 con NaOH. Agitar por 10 minutos (aparición de turbidez).
6. Ajustar a pH 6,9 con HCl cuidadosamente hasta aclarar.
7. Preparar solución de CaCl₂, disolver 0,6% de CaCl₂ anhidro en 50 ml de agua por cada litro de medio, agregar lentamente en agitación rápida para evitar precipitación y turbidez.
8. Agregar 1% penicilina/estreptomicina.
9. Completar al volumen final.
10. Esterilizar mediante filtración (no autoclavar) utilizando una membrana de porosidad 0,22 µm.

APÉNDICE 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA SDS-PAGE

10% (w/v) SDS:

Disolver 10g SDS en 90ml de agua desionizada y luego enrasar a 100ml.

Solución de Tris-Hcl 1,5 M pH: 8,8:

27,23g Tris-base (18,15g/100ml)

80ml Agua desionizada

Ajustar el pH: 8,8 con Hcl 6N luego enrasar el volumen a 150ml con agua desionizada. Conservar a 4°C.

Solución de Tris-Hcl 1M pH: 6,8:

12,11g Tris-base

80ml Agua desionizada

Ajustar el pH: 6,8 con Hcl 6N y luego enrasar el volumen a 100ml con agua desionizada. Conservar a 4°C.

Solución de Acrilamida-Bis-acrilamida (30% T; 2,6% C):

29,2g Acrilamida

0,8g Bis-acrilamida

Disolver en 50ml de agua destilada y luego aforar hasta 100ml con agua destilada. Filtrar y guardar a 4°C en frasco ámbar “PREPARAR CADA 30 DIAS”.

Solución buffer de corrida 10X Buffer pH: 8,3 (1L):

30,3g Tris-base

144,0g Glicina

10,0g SDS

Disolver a un volumen total de 1000ml con agua desionizada. No ajustar pH con ácido o base. Conservar a 4°C. Si ocurre precipitación llevar a temperatura ambiente antes de usar.

Solución buffer muestra:

Mezclar los siguientes volúmenes de estas soluciones:

Agua destilada	3,55ml
Tris-Hcl 0,5M pH: 6,8	1,25ml
Glicerol	2,50ml
SDS 10%	2,00ml
Azul de Bromofenol 0,5%	0,20ml
Volumen total	9,50ml

Solución buffer muestra reductor (β -2-mercaptoetanol)

950 μ l Buffer muestra

50 μ l β -2-mercaptoetanol

Solución de APS 15%:

Pesar 0,15g (150mg) de APS y disolver hasta 1ml con agua destilada.

“PREPARARLO A DIARIO”

Azul de Coomassie (1L):

1,0g	Coomassie Blue R-250
450ml	Metanol
450ml	Agua destilada
100ml	Ácido acético glacial

Mezclar, filtrar y conservar a oscuridad.

Solución decolorante de Comassie Blue:

100ml	Metanol
100ml	Ácido acético glacial
800ml	Agua destilada.

Preparación de los Geles (7%):Lower:

Agua destilada	4,964ml
30% Acrilamida	2,33ml
1,5M Tris-HCl (pH: 8,8)	2,5ml
10% SDS	0,1ml
15% APS	0,1ml
Temed	0,006ml (6 µl)
Volumen Total	10ml

<u>STACK</u>	4ml
Agua destilada	2,7ml
30% acrilamida/Bisacrilamida	0,67ml
1,0M Tris (pH: 6,8)	0,5ml
10% SDS	0,04ml
15% APS	0,04ml
TEMED	0,004ml (4µl)

APÉNDICE 3

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA WESTERN BLOT

Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,4

16 g NaCl

2,3 g Na₂HPO₄

0,4g K₂HPO₄

0,4g KCl

Disolver a un volumen total de 900 ml con agua desionizada, ajustar pH con ácido o base y completar a 2 l con agua desionizada.

Solución de Bloqueo (PBS-0,1% Tween 20-5% leche descremada) pH 7,4

200 ml PBS pH 7,4

10 g leche descremada

200 µl Tween 20

Mezclar bien, por 30 min aproximadamente

Solución de Lavado PBS-0,05% Tween 20, pH 7,4

1 l PBS pH 7,4

500 µl Tween 20

Solución Buffer de Transferencia

3,03 g Tris-base

14,41 g Glicina

200 ml Metanol

Completar a 1 litro con agua destilada

APÉNDICE 4

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ELISA

Buffer sodium carbonato pH 9,6

0,159 g Na_2CO_3

0,293 g NaHCO_3

Disolver a un volumen total de 90 ml con agua desionizada, ajustar pH con ácido o base y completar a 100 ml con agua desionizada.

Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,4

16 g NaCl

2,3 g Na_2HPO_4

0,4g K_2HPO_4

0,4g KCl

Disolver a un volumen total de 900 ml con agua desionizada, ajustar pH con ácido o base y completar a 2 l con agua desionizada.

Solución de Bloqueo (PBS-0,1% Tween 20-5% leche descremada) pH 7,4

200 ml PBS pH 7,4

10 g leche descremada

200 μl Tween 20

Mezclar bien, por 30 min aproximadamente

Solución de Lavado PBS-0,05% Tween 20, pH 7,4

1 l PBS pH 7,4

500 μl Tween 20

APÉNDICE 5

Tabla 1. Clasificación de sujetos de acuerdo al estatus de la enfermedad y el resultado de la prueba diagnóstica.

Resultado del test	ENFERMEDAD		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+c+b+d

$$\text{SENSIBILIDAD} = a/(a+c) \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = d/(b+d) \times 100$$

$$\text{VPP} = a/(a+b) \times 100$$

$$\text{VPP} = c/(c+d) \times 100$$

$$\text{CONCORDANCIA} = (a+d)/(a+b+c+d) \times 100$$

Donde:

a= número de individuos con la enfermedad y positivos por la prueba que se está evaluando (verdaderos positivos).

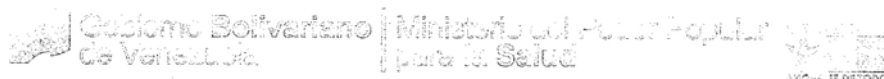
c= número de individuos con la enfermedad pero negativos por el test que se está evaluando (falsos negativos).

d= número de individuos sin la enfermedad y negativos por la prueba que se está evaluando (verdaderos negativos).

b= número de individuos sin la enfermedad pero positivos por el test que se está evaluando (falsos positivos).

APÉNDICE 6

CONSENTIMIENTO DE LOS PACIENTES PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO



APÉNDICE 6 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Participante: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Dirección: _____

Fecha: _____ Hora: _____

Yo, _____ portador(a) de la C.I. _____

Por medio de la presente otorgo mi libre consentimiento en participar en el proyecto de investigación titulado: "Análisis de los factores involucrados en la dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas en la población rural y urbana de Venezuela, e implementación de sistemas de control comunitario", registrado en el Ministerio del Poder Popular para la Salud con el N° 79791, Acción Especial 490026001, con duración de 05 años iniciando en el año 2008.

El objetivo de este proyecto es determinar los factores de riesgo vinculados en la transmisión de la Enfermedad de Chagas en la población urbana de las parroquias: Atagracia y Peñero de la Región Capital y, en la población rural de los estados: Barinas, Portuguesa, Guárico y Sucre, con la implementación de sistemas locales de control comunitario, con los cuales se pretende generar conocimientos y estrategias que permitan orientar responsable, oportuna y eficientemente los programas nacionales de prevención y control de esta epidemia.

Como parte de la realización de este estudio autorizo efectuar: encuestas de caracterización familiar, búsqueda activa de vectores en el domicilio y peridomicilio, la extracción de muestras sanguíneas y la documentación fotográfica y audiovisual de la visita.

Declaro que se me ha informado ampliamente, que de acuerdo a los derechos constitucionales que me asisten, mi participación en el estudio es totalmente voluntaria, comprometiéndome los investigadores en preservar la confidencialidad de los datos otorgados, cuyo uso será exclusivo a los fines que persigue esta investigación.

Doyle, que se hizo de mi conocimiento, que no se ocasionará ningún daño ni molestia a mi persona por la participación en este estudio, por el contrario como beneficios derivados se me efectuará de manera gratuita el análisis serológico para diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se me informará oportunamente de los resultados obtenidos, se me orientará y se garantizará mi inclusión en los programas de control que adelante el Ministerio del Poder Popular para la Salud en caso de haber seroreactividad.

Hago constar que el presente documento es de mi entero conocimiento, de manera libre y espontánea participo en el proyecto,

Firma (Participante o Responsable Legal)

Investigador responsable	Testigo I	Testigo II
Nombre: _____ C.I: _____	Nombre: _____ C.I: _____	Nombre: _____ C.I: _____

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y EDUCACIÓN
Edificio Sur, Centro Simón Bolívar, piso 4, El Silencio, Caracas-Venezuela.
Telf.: 0212.408.01.12. Fax: 0212.408.01.60. www.MPPS.gob.ve

APÉNDICE 7

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

MUNICIPIO: _____

NOMBRE DEL CENTRO POBLADO: _____

CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN: _____

NÚMERO DE LA VIVIENDA: _____

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL INDIVIDUO: _____

FACTORES DE RIESGO INDIVIDUALES

NOMBRE Y APELLIDO: _____

EDAD: _____

SEXO: _____

OCUPACIÓN:

Agricultura: _____

Hogar: _____

Estudiante: _____

Otro: _____

NIVEL DE CONOCIMIENTO A CERCA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

¿Sabe que es la enfermedad de Chagas?

Si _____

No _____

¿La enfermedad la transmite?

Perro _____

Gato _____

Chipo _____

Cachicamo _____

No sabe _____

¿Cómo se trasmite?

Transfusiones _____

Picadura del chipo _____

Alimentos contaminados _____

Por la basura _____

No sabe _____

¿El agente causal de la enfermedad es?

Una bacteria _____

Un parásito _____

Un hongo _____

No sabe _____

¿La enfermedad afecta?

El corazón _____

Los huesos _____

Los riñones _____

La sangre _____

No sabe _____

Lugares donde se pueden encontrar chipos:

Gallineros _____

Grietas de paredes _____

En sitios desordenados _____

Anexos de bahareque _____

No sabe _____

Criterio de evaluación:

Buen nivel de conocimiento: 4 ó más respuestas correctas.

Escaso nivel de conocimiento: menos de 4 respuestas correctas.

¿USTED VIVE O VIVIÓ EN CASAS CON PAREDES Y/O TECHOS DE BAHAREQUE?

Si: _____

No: _____

¿CUÁNTO TIEMPO LLEVA HABITANDO LA ACTUAL VIVIENDA?

<1 año: _____

1-3 años: _____

3-5 años: _____

5-10 años: _____

>10 años: _____

¿HACE CUANTO TIEMPO VIÓ AL INSECTO VECTOR?

El último año: _____

< 5 años: _____

>5 años: _____

CARACTERÍSTICAS DE LAS VIVIENDAS

TIPO DE VIVIENDA

Casa: _____

Rancho: _____

MATERIALES DEL TECHO:

Láminas: _____

Palma: _____

MATERIALES DE LAS PAREDES

Bloque: _____

Adobe: _____

Acho: _____

MATERIALES DEL PISO

Tierra: _____

Cemento: _____

FACTORES INTRADOMICILIARIOS

PRESENCIA DE DESORDEN DENTRO DE LA VIVIENDA

Si: _____

No: _____

PRESENCIA DE ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL INTERIOR DE LA VIVIENDA:

Perros: _____

Gatos: _____

Gallinas: _____

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES EN EL INTERIOR DE LA VIVIENDA:

Roedores: _____

Cachicamos: _____

Rabipelados: _____

Cerdos: _____

FACTORES PERIDOMICILIARIOS

PRESENCIA DE ANIMALES DOMÉSTICOS EN LOS ALREDEDORES DE LA VIVIENDA:

Perros: _____

Gatos: _____

Gallinas: _____

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES EN LOS ALREDEDORES DE LA VIVIENDA:

Roedores: _____

Cachicamos: _____

Rabipelados: _____

Cerdos: _____

PRESENCIA DE PLANTACIONES DE PALMA CERCANAS A LA VIVIENDA

Si: _____

No: _____

PRESENCIA DE CORRALES DE ANIMALES EN LOS ALREDEDORES
DE LA VIVIENDA

Si: _____

No: _____

PRESENCIA DE ANEXOS DE BAHAREQUE EN LOS ALREDEDORES
DE LA VIVIENDA

Si: _____

No: _____

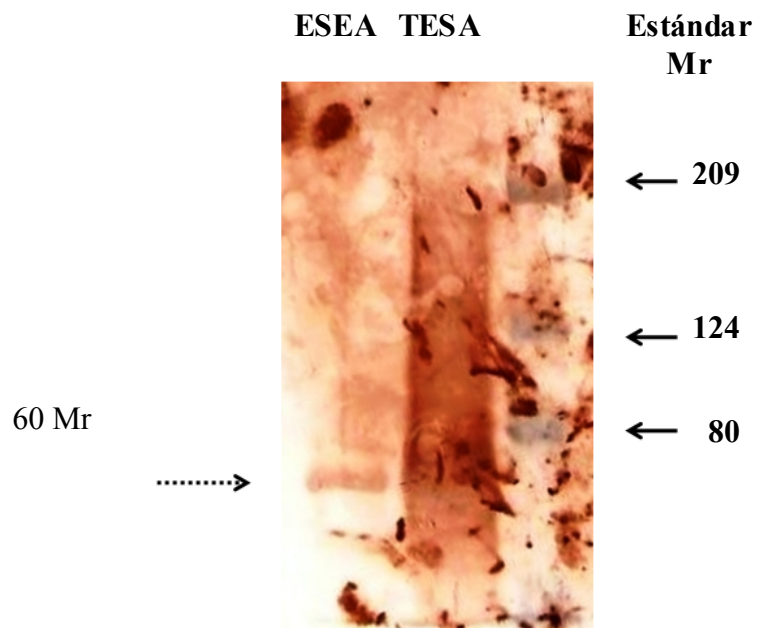
PRESENCIA DE CUEVAS DE ANIMALES SILVESTRES EN LOS
ALREDEDORES DE LA VIVIENDA

Si: _____

No: _____

APÉNDICE 8

WESTERN BLOT DE LAS PROTEÍNAS ESEA SEPARADAS POR SDS-PAGE



APÉNDICE 9

Tabla 2. Factores individuales no asociados a la enfermedad de Chagas

	Negativos	Positivos	Total	Chi ²	p
SEXO	n (%)	n (%)	n (%)		
Femenino	157 (50,65%)	15 (4,84%)	172 (55,48%)		
Masculino	131 (42,26%)	7 (2,26%)	138 (44,52%)		
Total	310 (92,90%)	22 (7,10%)	310 (100%)	1,04	0,307+
Nivel de conocimiento de la enfermedad					
Bueno	50 (16,13%)	4 (1,29%)	54 (17,42%)		
Malo	238 (76,77%)	18 (5,81%)	256 (82,58%)		
Total	288 (92,90%)	22 (7,10%)	310 (100%)	0,92	1,000+

p> 0,05 (no significativo). +Con la corrección de Yates

APÉNDICE 10

Tabla 3. Características de las viviendas, no asociado a la enfermedad de Chagas

Tipo de vivienda	Positivos	Negativos	Total	hi ²	C	p
	n (%)	n (%)	n (%)			
Casa	13 (18,06%)	39 (54,17%)	52 (72,22%)			
Rancho	5 (6,94%)	15 (20,83%)	20 (27,78%)			
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,00		1,00+
Tipo de techo						
Láminas	14 (19,44%)	50 (69,44%)	64 (88,89%)			
Palma	4 (5,56%)	4 (5,56%)	8 (11,11%)			
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	1,69		0,194+
Paredes						
Bloque	8 (11,11%)	23 (31,94%)	31 (43,06%)			
Adobe	6 (8,33%)	18 (25,0%)	24 (33,33%)			
Acho	4 (5,56%)	13 (18,06%)	17 (23,61%)			
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,03		0,985
Piso						
Cemento	12 (16,67%)	24 (33,33%)	36 (50,0%)			
Tierra	6 (8,33%)	30 (41,67%)	36 (50,0%)			
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	1,85		0,174+

p>0,05 (no significativo). + Con la corrección de Yates.

APÉNDICE 11

Tabla 4. Factores intradomiciliarios no asociados a la enfermedad de Chagas

Presencia de animales domésticos	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total n (%)	Chi ²	p
Perros					
SI	6 (8,33%)	26 (36,11%)	32 (44,44%)	0,68	0,4113+
NO	12 (16,67%)	28 (38,89%)	40 (55,56%)		
TOTAL	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Gatos					
SI	4 (5,56%)	19 (26,39%)	23 (31,94%)	0,53	0,4656+
NO	14 (19,44%)	35 (48,61%)	49 (68,06%)		
TOTAL	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Gallinas					
SI	6 (8,33%)	14 (19,44%)	20 (27,78%)	0,09	0,7613+
NO	12 (16,67%)	40 (55,56%)	52 (72,22%)		
TOTAL	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Animales silvestres (Roedores)					
SI	13 (18,06%)	47 (65,28%)	60 (83,33%)	1,20	0,2733+
NO	5 (6,94%)	7 (9,72%)	12 (16,67%)		
TOTAL	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Desorden dentro de la vivienda					
S	13 (18,06%)	30 (41,67%)	43 (59,72%)	0,94	0,3315+
I	5 (6,94%)	24 (33,33%)	29 (40,28%)		
N	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
O	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		

p>0,05 (no significativo). + Con la corrección de Yates.

APÉNDICE 12

Tabla 5. Factores peridomiciliarios no asociados a la enfermedad de Chagas

Animales silvestres	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total n (%)	Chi ²	p
Cerdos					
SI	2 (2,78%)	11 (15,28%)	13 (18,06%)	0,28	0,5956+
NO	16 (22,22%)	43 (59,72%)	59 (81,94%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Roedores					
SI	12 (16,67%)	41 (56,94%)	53 (73,61%)	0,21	0,6433+
NO	6 (8,33%)	13 (18,06%)	19 (26,39%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Cachicamos					
SI	2 (2,78%)	1 (1,39%)	3 (4,17%)	1,04	0,3070+
NO	16 (22,22%)	53 (73,61%)	69 (95,83%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		
Rabipelados					
SI	3 (4,17%)	1 (1,39%)	4 (5,56%)	3,18	0,0747+
NO	15 (20,83%)	53 (73,61%)	68 (94,44%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)		

p>0,05 (no significativo). + Con la corrección de Yates.

APÉNDICE 13

Tabla 6. Factores peridomiciliarios no asociados a la enfermedad de Chagas

Plantaciones de palma	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total n (%)	Chi2	p
SI	5 (6,94%)	10 (13,89%)	15 (20,83%)		
NO	13 (18,06%)	44 (61,11%)	57 (79,17%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,25	0,6152+
Gallineros					
SI	6 (8,33%)	14 (19,44%)	20 (27,78%)		
NO	12 (16,67%)	40 (55,56%)	52 (72,22%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,09	0,7613+
Anexos de bahareque					
SI	10 (13,89%)	28 (38,89%)	38 (52,78%)		
NO	8 (11,11%)	26 (36,11%)	34 (47,22%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,00	1,0000+
Cuevas de animales silvestres					
SI	4 (5,56%)	14 (19,44%)	18 (25,0%)		
NO	14 (19,44%)	40 (55,56%)	54 (75,0%)		
Total	18 (25,0%)	54 (75,0%)	72 (100%)	0,00	1,0000+
<p>p>0,05 (no significativo). + Con la corrección de Yates.</p>					

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Desarrollo y aplicación de un ensayo ELISA utilizando las proteínas excretadas y secretadas de las formas epimastigotes de Trypanosoma cruzi, para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas
--------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Figuerola L, Milagros Del V.	CVLAC	13772817
	e-mail	mdelvfl@yahoo.es

Palabras o frases claves:

Epimastigotes, ELISA, proteínas de excreción/secreción.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	microbiología

Resumen (abstract):

En el siguiente trabajo se estandarizó una prueba de ELISA indirecta, utilizando como antígeno proteínas de excreción/secreción de las formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (ESEA), lo cual no ha sido previamente descrito. Los antígenos ESEA fueron obtenidos del sobrenadante del medio de cultivo Schneider's sin suero fetal bovino, al cuarto día de cultivo axénico, siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (2006). Una vez determinada la concentración de la proteína por el método de Bradford, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot para identificar las bandas inmunogénicas. Para la estandarización del ELISA indirecto se realizaron titulaciones de la concentración de ESEA a utilizar, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y número de lavados. Las diferentes concentraciones del antígeno fueron incubadas con un pool de sueros previamente confirmados como positivos y negativos por tres métodos serológicos diferentes para la enfermedad de Chagas (IFI, HAI y ELISA). Las condiciones que permitieron obtener una mejor discriminación entre el control positivo y negativo para cada uno de los pasos de la prueba fueron: proteína 5,0 µg/ml, anticuerpo primario (pool de sueros positivos y negativos) 1/400, anticuerpo secundario 1/32000, número de lavados 4. La densidad óptica obtenida para el pool de sueros positivos y negativos fue de 1,753 y 0,214, respectivamente, lo que permitió una proporción entre el control positivo y negativo de 8. Por su parte, la electroforesis en gel de poliacrilamida mostró dos bandas de 60 y 66 Mr, de las cuales la de 60 Mr fue reconocida por el pool de sueros positivos en el Western blot. Una vez lograda la estandarización del ESEA-ELISA, se procedió a determinar la sensibilidad (98%) y especificidad (88%) de dicha prueba, para así ofrecer un test altamente sensible, específico y novedoso, que se espera contribuya a un diagnóstico certero y oportuno de la enfermedad de Chagas en el estado Sucre. Para la segunda etapa de este estudio se validó el test estandarizado en 12 centros poblados del municipio Montes, confirmando los resultados obtenidos con hemaglutinación indirecta (HAI), a fin de proporcionar cifras actuales y oportunas de seroprevalencia en ésta región, utilizando además una técnica novedosa y relacionando los resultados obtenidos con las variables epidemiológicas, se analizaron 310 individuos de los cuales 138 eran hombres (44,52%) y 172 mujeres (55,48%), con edades comprendidas entre 1 y 78 años, y fueron analizadas 72 casas, obteniéndose como resultados una seroprevalencia de 7,10%, los centros poblados más afectados fueron San Salvador, Los Dos Ríos y El Potrero con 1,30% respectivamente, con la finalidad de evaluar la asociación entre la seropositividad a *T. cruzi* y los factores de riesgo para la transmisión vectorial, fue aplicada una encuesta epidemiológica a los sujetos participantes en el estudio, resultando asociados ($p < 0,05$) a la seropositividad a *T. cruzi*: edad (> 60 años), ocupación (agricultura), persistencia en casas de bahareque, tiempo de residencia en la vivienda actual (> 10 años) y tiempo de haber visto al vector (> 5 años), el hallazgo de un caso en un joven de 14 años es indicativo de transmisión vectorial activa. Las proteínas ESEA representan una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que no requieren de procesos químicos de purificación, además los antígenos provenientes de las formas epimastigotes son de producción relativamente fácil y pueden ser generados en laboratorios de escasos recursos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Berrizbeitia, Mariolga	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6119292
	e-mail	mberriz@yahoo.com
Mary Isabel Gonzatti	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
Antonio Morocoima	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	11	27
------	----	----

Lenguaje: ESPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-milagrosfigueroa.doc	Application/word

Alcance: regional

Espacial: regional, municipal (Opcional)

Temporal: temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:
Magister Scientiarum en Biología Aplicada

Nivel Asociado con el Trabajo: Maestría

Área de Estudio:
Biología-microbiología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:
Universidad de oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

En mi carácter de autor, autorizo a la Universidad de Oriente
para el uso y publicación de éste trabajo de investigación
con fines educativos.

