

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA LICENCIATURA EN LABORATORIO CLINICO



**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR UTILIZADAS EN INVESTIGACIÓN PARA
EL DIAGNÓSTICO DE CHAGAS EN EL SALVADOR, JULIO 2023.**

Presentado por:

LISSETTE NOHEMY AQUINO OCHOA

Para optar al grado de:

LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO

Asesor:

DRA. BEATRIZ ELENA ARCHILA DE FLORES

Ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, agosto, 2023.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Msc. Roger Armando Arias

Vicerrector Académico

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga

Vicerrector Administrativo

Ing. Juan Rosa Quintanilla

Secretario/a General

Ing. Francisco Antonio Alarcón

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Decana

MsC. Josefina Sabrían de Rodríguez

Vicedecano

Dr. Saúl Diaz Peña

Secretaria

MsC. Aura Marina Miranda de Arce

Director de Escuela

Msc. José Eduardo Zepeda Avelino

Directora de Carrera

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

CONTENIDO

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	ii
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	viii
II. DESARROLLO	10
III. CONCLUSION.....	14
IV. FUENTES DE INFORMACIÓN	15

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme y darme la sabiduría para alcanzar este logro tan grande en mi vida, sin su ayuda esto no hubiese sido posible.

A mis padres, por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia las metas se pueden alcanzar, siempre han sido mis mejores guías de vida. Por darme el apoyo económico todos estos años.

A mis hermanos, por ser parte fundamental en mi vida y por creer en mí, por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mi familia, por siempre comprenderme en aquellos momentos donde por motivos académicos no podía estar con ellos, por sus oraciones. Siempre creyeron en mí.

A mis docentes, que me guiaron en el proceso para obtener mi título universitario, su semilla de conocimiento germinó en el alma y espíritu, gracias por su paciencia, agradecimientos especiales a mi tutor por su ayuda, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable y por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados.

A mi asesora, por dedicar su valioso tiempo a orientarnos para ir mejorando cada día nuestro trabajo. Buscado la manera de perfeccionar nuestros avances con sus aportes.

Al Licenciado **Marvin Stanley Rodríguez Aquino**, por tomarse el tiempo de atender mi consulta y resolver mis dudas referentes al tema. Así como su aporte de información para el actual ensayo.

A mis compañeros y amigos especialmente a Katherine Mejía, no puedo dejar de agradecerle por su apoyo incondicional, sus consejos, por estar siempre allí cuando necesité orientación, por siempre creer en mí y motivarme por medio de sus palabras y oraciones.

A mi novio, Samuel Corado. Quien ha sido una pieza fundamental para la finalización de mi carrera. Su constante motivación para mi superación personal, sus consejos, sus oraciones, su apoyo emocional en todo proceso, y su ejemplo han sido importantes en esta etapa de mi vida.

A MSc. Josefa Morán, y su equipo de FMUES quienes sé reconocer que su tiempo es muy valioso y pudieron dedicarse unos momentos para orientarme en la edición del presente trabajo.

Lisette Nohemy Aquino Ochoa

RESUMEN

Desde que, en 1913, el Dr. Juan Segovia descubrió el primer caso de tripanosomiasis humana en El Salvador, el diagnóstico de esta enfermedad se vuelve relevante como un tema a investigar, siendo un problema en salud pública, aunque también se le considera como una enfermedad desatendida en el país, que actualmente afecta a las personas de escasos recursos económicos. Razón por la cual, como profesionales en el área de la salud, es importante mostrar interés en el correcto diagnóstico de la enfermedad de chagas y otras más del entorno. El Salvador presenta algunas limitaciones para el preciso diagnóstico para dicha enfermedad, debido a la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas y baja especificidad de las técnicas inmunológicas. Por ende, con la implementación de la biología molecular se tendrá una notable mejora en el diagnóstico. Se han descrito varias formas de diagnóstico, siendo las más utilizadas, por su alta sensibilidad y especificidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifican el ácido desoxirribonucleico de *Trypanosoma cruzi*. Aunque la técnica de PCR también tiene algunas limitaciones en cuanto a costo, infraestructura necesaria y sensibilidad en fase crónica de la enfermedad, tiene muchas ventajas especialmente en casos agudos, y resultan adecuadas en la evaluación y seguimiento del tratamiento. Se han desarrollado algunas variantes más avanzadas como PCR en tiempo real. Lo más adecuado sería combinar el uso de las técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares de acuerdo con la fase de la enfermedad que se sospecha y las características del paciente. En El Salvador, las técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, solo se utilizan en laboratorios de investigación, sería recomendable su incorporación al grupo de pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas en el país.

Palabras clave: Biología molecular, chagas, técnicas, El Salvador, ADN

ABSTRACT:

Since, in 1913, Dr. Juan Segovia discovered the first case of human trypanosomiasis in El Salvador, the diagnosis of this disease has become relevant as a topic to be investigated, being a public health problem, although it is also considered as a neglected disease in the country, which currently affects people with limited economic resources. Which is why, as professionals in the health area, it is important to show interest in the correct diagnosis of Chagas disease and other diseases in the environment. El Salvador presents some limitations for the precise diagnosis of said disease, due to the low sensitivity of parasitological techniques and low specificity of immunological techniques. Therefore, with the implementation of molecular biology there will be a notable improvement in diagnosis. Several forms of diagnosis have been described, the most used being, due to its high sensitivity and specificity, the polymerase chain reaction (PCR) that amplifies the deoxyribonucleic acid of *Trypanosoma cruzi*. Although the PCR technique also has some limitations in terms of cost, necessary infrastructure and sensitivity in the chronic phase of the disease, it has many advantages, especially in acute cases, and is suitable for the evaluation and monitoring of treatment. Some more advanced variants have been developed such as real-time PCR. The most appropriate thing would be to combine the use of parasitological, immunological and molecular techniques according to the phase of the disease suspected and the characteristics of the patient. In El Salvador, molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease are only used in research laboratories; it would be advisable to incorporate them into the group of diagnostic tests for Chagas disease in the country.

Keywords: Molecular biology, chagas disease, techniques, El Salvador, DNA

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de biología molecular han desempeñado un papel fundamental en la investigación y el diagnóstico de enfermedades infecciosas, incluida la enfermedad de Chagas, en todo el mundo, y El Salvador no es una excepción. La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos vectores, representa un importante problema de salud en América Latina, incluido El Salvador. Aquí se presentan las técnicas de biología molecular utilizadas en la investigación y el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en El Salvador. El principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros (chinchas), de la subfamilia Triatominae (que se alimentan de sangre). Infectan personas expuestas a su picadura, al depositar sus heces infectadas en heridas de la piel o sobre mucosas. Otras modalidades de transmisión son por medio de una transfusión sanguínea, congénita, trasplantes de órganos u oral. Aunque la mortalidad ha disminuido significativamente, la enfermedad puede causar consecuencias irreversibles y crónicas en el corazón, el sistema digestivo y el sistema nervioso. De la situación de Chagas se sabe que es casi 100% curable si se trata en sus etapas iniciales. La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de las Américas y afecta a un estimado de 6 millones de personas. En las Américas, se registran 30.000 nuevos casos cada año, 12.000 muertes en promedio y aproximadamente 9.000 recién nacidos se infectan durante la gestación. Actualmente, unos 70 millones de personas en las Américas viven en áreas expuestas al Chagas y están en riesgo de contraer la enfermedad. (Organización Panamericana para la Salud, 2020)¹ En El Salvador, la enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más graves. Con un total estimado de 232,000 personas infectadas y 2,500 personas fueron infectadas en 2005. La seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre fue desde 2.1 a 3.3% entre el año 2004 y 2007. Estos datos indican que el índice de la enfermedad de Chagas en El Salvador es el más alto en

Centro Américas y sobrepasa a la de VIH, Hepatitis B y C y Sífilis. Alrededor de 100 casos agudos de la enfermedad de Chagas se detectaron anualmente entre 2005 y 2007. (Japan International Cooperation Agency, sin fecha de publicación)²

He aquí la importancia de aumentar los esfuerzos en la mejora de los métodos diagnósticos, específicamente para la enfermedad de chagas. El desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas, ha transformado al diagnóstico molecular en una herramienta clave para el directo beneficio del paciente. Se quiere mostrar las principales técnicas de biología molecular para el diagnóstico de chagas en El Salvador utilizadas en el área de investigación que pueden ser útiles en la posteridad para diagnosticar chagas en todo el país y no solo investigación.

II. DESARROLLO

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente por un vector hematófago. La enfermedad de Chagas comprende una fase aguda, que puede presentar síntomas o no. Se caracteriza por una gran cantidad de parásitos en la sangre, seguida de una recuperación y del establecimiento la fase crónica de la enfermedad, con una cantidad de parásitos sanguíneos escasa y ausencia de síntomas hasta una enfermedad severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que puede ocasionar la muerte. El diagnóstico de la enfermedad se basa en los signos y síntomas clínicos, así como con los resultados de laboratorio, incluyendo pruebas parasitológicas, inmunológicas, y moleculares. (Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco J. Triana Alonso BIOMED, 2015)³. Como se sabe, la biología molecular ha ido evolucionando, y mejorado convirtiéndose en una herramienta útil en el diagnóstico de todo tipo de enfermedades que se desarrollan en el país. Utilizada grandemente en la parte de investigación, pues hasta el momento los métodos diagnósticos de Chagas en El Salvador continúan siendo la serología, gota gruesa, examen directo de las heces de las chinches entre otros. En el área de investigación se toman dos puntos de partida para el diagnóstico: Se estudia detenidamente al triatomino y al humano. Según el orden de las pruebas realizadas en investigación para el diagnóstico de chagas, las técnicas son las siguientes: El examen parasitológico de las heces de triatomino se basa en la observación microscópica de las heces del triatomino para detectar la presencia de parásitos. Se realiza mediante la preparación de extensiones del contenido intestinal del insecto, que se tiñen y examinan bajo un microscopio para identificar los parásitos. PCR de punto final, utilizando los primers 121 y 122. Los primers 121 y 122 son secuencias de ADN diseñadas para unir y amplificar el ADN de *Trypanosoma cruzi*. La PCR de punto final se realiza para detectar la presencia de ADN de *T. cruzi* en las muestras de heces de triatomino. Esta técnica por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3

pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar. Lo anterior descrito es la forma en la que se hace el diagnóstico directamente de la chinche. El diagnóstico que se realiza en humanos es similar pues incluye serología, parasitología agregando también técnicas de biología molecular. El método concentrado de Strout consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 mL de sangre recogida sin anticoagulante y dejando el tubo a 37 °C durante dos horas para que se retraiga el coágulo. Si hay parásitos migrarán hacia fuera del coágulo. Se transfiere el suero a otro tubo y tras varios ciclos de centrifugación se realiza una observación del sedimento en fresco o bien después de realizar un frotis y teñirlo con Giemsa. Al igual que para el microhematocrito la sangre debe ser reciente y observada dentro de las 4 - 8 horas posteriores a su obtención. Puede ser conservada en nevera a 4 °C o bien a temperatura ambiente hasta ser procesada. Los ensayos como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es una técnica inmunológica que se utiliza para detectar anticuerpos específicos contra *T. cruzi* en muestras de suero sanguíneo. Puede ser útil para identificar infecciones pasadas o actuales por *T. cruzi* en humanos o animales que hayan estado en contacto con triatominos. Estas técnicas combinan la sensibilidad de la PCR con la especificidad de las pruebas serológicas, lo que permite detectar tanto el material genético del parásito como los anticuerpos en una sola prueba. Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo substrato

tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un lector de microplacas ELISA. Las pruebas de diagnóstico rápido (pdr) se fundamentan en la detección inmunocromatográfica de anticuerpos anti-T. cruzi presentes en sangre total, suero o plasma. Generalmente consisten en:

1. Una combinación de antígenos recombinantes adsorbidos a la membrana y una proteína específica conjugada con un fluorocromo.
2. La proteína se une a los anticuerpos presentes en la muestra del paciente.
3. El complejo anticuerpo-proteína es capturado por los antígenos recombinantes.
4. Se lee una reacción de color, generalmente en 15 minutos. Es necesario confirmar un resultado de PDR con una prueba confirmatoria, como ELISA. Aunque se ha visto que el desempeño de las PDR es variable, hay estudios donde se reporta una concordancia de 98% entre PDR y ELISA.

La Hemaglutinación Indirecta Cuantitativa (HAI) para Chagas se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos del tipo IgG específicos contra los antígenos citoplasmáticos del *Trypanosoma cruzi* presentes en el suero del paciente, de producir una aglutinación cuando se ponen en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los antígenos de *Trypanosoma cruzi* de cultivo.

La PCR en tiempo real es una técnica ampliamente utilizada en la detección de material genético de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre o tejidos. En El Salvador, esta técnica se ha empleado para identificar la presencia del parásito en pacientes sospechosos y para caracterizar genéticamente las cepas de *Trypanosoma cruzi* presentes en la población.

La técnica se basa en la PCR punto final, o sea PCR convencional sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. Tiempo real se refiere a que la

detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. El término cuantitativo se refiere a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, pues el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Es muy específico y eficiente.

III. CONCLUSION

Las técnicas de biología molecular utilizadas como herramientas diagnósticas, son de beneficio para el área de investigación, ya que son versátiles, rápidas, y mucho más sensibles. Han permitido una detección más precisa del parásito, la cuantificación de la carga parasitaria y la caracterización genética de las cepas presentes en la región. Estos avances son esenciales para el control y la gestión de la enfermedad en la población salvadoreña y para contribuir a la comprensión global de la enfermedad de Chagas. Cada método se caracteriza por la confiabilidad y rapidez en la obtención del resultado, robustez, especificidad, sensibilidad y flexibilidad, si se compara con métodos fenotípicos, siendo este un aporte directo y accesible para el desarrollo de biología molecular. Cabe recalcar la importancia de cada uno de ellos. El examen parasitológico de las heces es útil para identificar parásitos vivos, mientras que las técnicas moleculares como la PCR ayudan a confirmar la infección y evaluar su carga. Los ensayos serológicos, como ELISA y hemaglutinación, detectan la respuesta inmunitaria del paciente. El diagnóstico definitivo de la enfermedad de Chagas a menudo se basa en una combinación de estos métodos para obtener resultados más precisos.

Falta mucho camino que recorrer para llevar las técnicas de biología molecular más allá de la investigación y puedan formar parte de hospitales dentro del sistema Nacional de salud y extender el diagnóstico de biología molecular a otras enfermedades.

IV. FUENTES DE INFORMACIÓN

¹ Organización Panamericana para la Salud (2020). Enfermedad de Chagas.

<https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>

² Japan International Cooperation Agency (Sin fecha de publicación). Proyecto de Control de la Enfermedad de Chagas Fase 2.

<https://www.jica.go.jp/Resource/project/spanish/elsalvador/0700890/02/index.html#:~:text=La%20enfermedad%20de%20Chagas%20es,el%20a%C3%B1o%202004%20y%20200>

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas Dr. Francisco J. Triana Alonso (BIOMED). (2015).

Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de chagas.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000300002