

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Detección molecular mediante la técnica de PCR de la infección parasitaria del chinchorro *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), principal vector del mal de Chagas en el suroccidente del Ecuador**

**Proyecto de Investigación**

**Alejandro Maximiliano Alvear Narváez**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 18 de mayo de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección molecular mediante la técnica de PCR de la infección parasitaria del chinchorro *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), principal vector del mal de Chagas en el suroccidente del Ecuador**

**Alejandro Maximiliano Alvear Narváez**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Renato León, Ph.D.

Firma del Profesor

---

Quito, 18 de mayo de 2016

## **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en dichas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad con lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Alejandro Maximiliano Alvear Narváez

Código: 00104028

Cédula de Identidad: 1721646857

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2016

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto a mi madre. La persona que más me ha apoyado durante mis años de estudio. Su cariño y entrega absoluta fueron los medios que me permitieron alcanzar esta meta.

También dedico este trabajo a Alfonso, Lucrecia y Magdalena las personas que conforman mi núcleo familiar, todo mi esfuerzo será siempre por y para ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Todo trabajo bien realizado es un esfuerzo en conjunto, por lo que deseo agradecer a mi familia más cercana: mi madre Ximena Alvear, mis tíos Alfonso y Magdalena de Cazar y mi abuelita Lucrecia Narváez; quienes a lo largo de los años me han brindado todo su amor y apoyo, aspectos que me parece que son fundamentales para que una persona pueda desarrollar sus capacidades profesionales al máximo.

A mis amigos David, Daniela, Juan, Nina y Andrea. Todos ellos me enseñaron que siempre se necesita ayuda, y que los compañeros de verdad siempre estarán dispuestos a brindarla.

A mis profesores Renato, Cristina y Lourdes que confiaron en mi juicio y en mi capacidad para desarrollar este proyecto. Gracias por enseñarme que al ser responsable y dedicado los objetivos se cumplen.

Al Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical y al Instituto de Microbiología de la USFQ. Su personal me capacitó y ayudó con la mejor predisposición posible, lo que contribuyó de manera significativa en la realización de la parte experimental de mi trabajo.

A Karen Ascencio un persona muy especial para mí, que siempre confió en mi capacidad y me ayudó en los momentos más apremiantes. Sin ti, no lo hubiera logrado.

## RESUMEN

*Triatoma dimidiata* es un insecto hematófago que ha sido ampliamente estudiado por ser uno de los principales vectores de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal del mal de Chagas. Esta enfermedad representa una gran problemática para la salud pública de la mayoría de países de las Américas, incluyendo al Ecuador; ya que afecta a los estratos más bajos de la sociedad y no existe una correcta política epidemiológica para su erradicación.

En esta investigación se detectó molecularmente la presencia de *T. cruzi* en muestras de heces de *T. dimidiata* recolectadas en la Península de Santa Elena al suroccidente del Ecuador, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la amplificación de los primers S35/S36. Se confirmó la presencia de este parásito en el 100% de las muestras analizadas. Adicionalmente, se identificó mediante los primers TCC/TC1/TC2 que cepas de *T. cruzi* pertenecientes al tipo II estaban presentes en los chinchorros colectados. Se detectó parásitos activos durante las disecciones entomológicas; se considera, por ende, que posiblemente eran infectivos en los triatomas recolectados. Se discute los aportes e implicaciones de estos hallazgos.

**Palabras clave:** Detección molecular, identificación molecular, primers TCC/TC1/TC2, *Triatoma dimidiata*, *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

*Triatoma dimidiata* is a blood-sucking insect that has been extensively studied as one of the main vectors of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. This disease represents a major public health problem in most countries in the Americas, including Ecuador; it affects the lower strata of society and there is no proper epidemiological policy for eradication.

This research aimed to detect molecularly the presence of *T. cruzi* in stool samples of *T. dimidiata* collected in Santa Elena Peninsula in southwestern Ecuador through the polymerase chain reaction (PCR) technique and amplification of the S35/S36 primers. The presence of *T. cruzi* in all the samples analyzed was confirmed and further identified as type II *T. cruzi* phylogenetic lineage using PCR and TCC/TC1/TC2 specific primers. It is suggested that parasites were active at the time of the entomological collections and therefore possibly infective in the Triatomine bugs found in the study area. Contributions and implications of these findings are discussed.

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción .....	11
Antecedentes de la Enfermedad de Chagas y sus vectores. ....	11
Importancia y biología de <i>Triatoma dimidiata</i> .....	12
Clasificación y distribución.....	14
<i>Trypanosoma cruzi</i> como agente causal de la Enfermedad de Chagas .....	14
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Taxonomía y Morfología .....	14
Ciclo de vida y formas de transmisión .....	15
Patología.....	16
Ciclos de la enfermedad .....	16
Otras formas de contagio.....	17
Patología Aguda .....	18
Patología Crónica .....	18
Detección del parásito .....	19
Criterios de identificación .....	19
La Enfermedad de Chagas en el Ecuador.....	21
Revisión bibliográfica de estudios en el Ecuador.....	21
Transmisión de la enfermedad en focos residuales endémicos .....	22
Justificación.....	23
Objetivos .....	25
Objetivos específicos.....	25
Área de estudio.....	25
Materiales .....	26
Extracción de ADN .....	26
Amplificación de ADN .....	26
Electroforesis en gel de agarosa .....	27
Secuenciamiento.....	27
Métodos.....	28
Extracción de ADN .....	28
Amplificación de ADN .....	28
Electroforesis en gel de agarosa .....	29
Secuenciamiento.....	30
Resultados .....	30



Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i> por el método de PCR.....	30
Identificación Molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	31
Análisis de secuencias.....	31
Discusión.....	31
Conclusiones .....	36
Recomendaciones.....	37
Bibliografía.....	38

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de microscopía y detección molecular de <i>T. cruzi</i> en muestras de heces.....	44
Tabla 2.1: Reactivos utilizados en la reacción de PCR para los primers S35/S36.....	45
Tabla 2.2: Programa de amplificación usado para los primers específicos S35/S36.....	45
Tabla 3.1: Reactivos utilizados en la reacción de PCR para los primers TCC/TC1/TC2.....	45
Tabla 3.2: Programa de amplificación usado para los primers específicos TCC/TC1/TC2.....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo vital de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
Figura 1.1: Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escalera de ADN. Carril 1 al 15: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.....	47
Figura 1.2: Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escalera de ADN. Carril 16 al 21: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.....	48
Figura 1.3: Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escalera de ADN. Carril 22 al 29: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.....	48
Figura 2.1: Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 1 al 15: muestras. Carril (+): control positivo. Carril (-): control negativo.....	49
Figura 2.2: Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 16 al 21: muestras. Carril (+): control positivo. Carril (-): control negativo.....	49
Figura 2.3: Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 22 al 29: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.....	50

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Secuencia obtenida a partir de la amplificación de los primers TCC/TC1/TC2 de la muestra O/15.....	50
Anexo 2: Captura de pantalla del Blast realizado para la secuencia O/15.....	51
Anexo 3: Variabilidad de nucleótidos encontrada en las 5 secuencias de ADN obtenidas a partir de los primers TCC/TC1/TC2.....	51

# INTRODUCCIÓN

## **Antecedentes de la Enfermedad de Chagas y sus vectores**

La Enfermedad de Chagas conocida también como el “Mal de Chagas” es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*, un parásito intracelular flagelado que en la actualidad infecta a 7 millones de personas en el continente Americano y alrededor de 80 millones de personas se encuentran en riesgo de contagio en todo el mundo (WHO, 2002; Bern et al., 2015). La Enfermedad de Chagas se encuentra distribuida en zonas endémicas de 21 países de las américas, el apareamiento de la enfermedad en zonas no endémicas se debe a las crecientes tasas de migración entre países, que hacen que personas contagiadas migren hacia continentes que no poseen zonas endémicas para la enfermedad. A pesar de que se calcula que la tasa de incidencia de la enfermedad en el continente americano es del 1%, en lugares de transmisión hiperendémica la tasa de incidencia puede incrementarse hasta un 4%. La Enfermedad de Chagas es considerada la enfermedad parasitaria más importante del hemisferio occidental, donde hablando de morbilidad y mortalidad causa pérdidas económicas 7.5 veces mayores a las causadas por la malaria (Bern et al., 2015).

En el Ecuador esta patología afecta a 200,000 personas por año y alrededor de 3.8 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (MSP, 2010). Este parásito se transmite por contacto con las heces fecales de insectos hematófagos conocidos vulgarmente como chinchorros, los mismos que tienden a defecar inmediatamente después o al mismo tiempo que se alimentan de la sangre de sus víctimas, que muchas veces incluyen al hombre pues muchas especies son antropofílicas (prefieren alimentarse de la sangre del ser humano). La enfermedad después de un periodo agudo que puede ser leve o pasar desapercibido permanece silente, algunas veces por años, en donde la infección continua y termina produciendo daño a órganos

vitales, el cual muchas veces es irreversible y puede causar la muerte del paciente sin haber recibido un diagnóstico certero o a tiempo (WHO, 2002).

### **Importancia y biología de *Triatoma dimidiata***

*Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) es una especie de insecto chinchorro de interés médico por ser un vector principal de la Enfermedad de Chagas en algunos países de las Américas incluyendo al Ecuador.

Los principales vectores de esta dolencia, en general, pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Guevara et al., 2005); En el país, son dos las principales especies vectoras, *T. dimidiata* y *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & Leon, 1953), sin embargo hasta 16 especies de chinchorros han sido reportados en el territorio ecuatoriano. Algunas de estas especies han sido incriminadas en la transmisión de la enfermedad aunque en la mayoría de los casos su rol es poco conocido especialmente en la región Amazónica.

*T. dimidiata* es considerado actualmente entre los principales vectores de la enfermedad y es el responsable de muchos casos de transmisión al hombre especialmente en focos residuales de zonas dispersas de la costa, que incluyen a comunidades de la Península de Santa Elena (Jiménez, 2013). Esta especie tiende a encontrarse en ambientes urbanos (Suárez et al., 2010) e históricamente ha estado asociada a regiones tropicales y subtropicales del país especialmente en grandes ciudades de la costa como Guayaquil, Machala y Portoviejo en donde a principios de siglo sus poblaciones eran abundantes. A mediados del siglo XX, hacia los años 1950, las exitosas campañas de control vectorial lideradas por el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos, SNEM (Recientemente fue disuelto en 2015 y su personal transferido al Ministerio de Salud Pública, MSP) redujeron significativamente las poblaciones de este vector en zonas urbanas, permaneciendo en focos

residuales de transmisión como en la provincia de Santa Elena en la costa sur del Ecuador (Aguilar, 1999).

Paulatinamente, otra especie, *Rhodnius ecuadoriensis* ha ganado importancia como vector del Mal de Chagas en el país. Esta otra especie, más pequeña en tamaño y de hábitos más asociados a zonas peridomésticas y selváticas ha sido especialmente estudiada en las provincias de Manabí, Loja, Los Ríos y el Oro en donde es vector importante de la enfermedad. En la actualidad, tanto *R. ecuadoriensis* como *T. dimidiata* son considerados como vectores principales del Mal de Chagas en el Ecuador aunque recientemente otras especies han sido involucradas en la transmisión, como *Triatoma dispar* en la provincia de Esmeraldas (Guevara et al., 2014) y *Eratyrus micronatus* en la Amazonía (Amunárriz, 2010).

*T. dimidiata* es una especie que habita tanto ambientes urbanos como selváticos, en estos últimos se la pueden encontrar en madrigueras de mamíferos, nidos de aves, apilamientos de rocas, raíces de los árboles y en las hojas de palmeras (Novelo et al., 2011); en nuestro país, esta especie habita exclusivamente ambientes domiciliarios y peridomiciliarios, y se la puede encontrar en las grietas de paredes de adobe, en lugares de almacenamiento de madera, o en sitios donde habitan animales domésticos o de granja (Morán, 2013).

La dispersión de esta especie está relacionada a su capacidad de vuelo y es estacional (de marzo a julio). Los triatomas migran del ambiente selvático hacia el domicilio y peridomicilio en busca de calor y alimento. En el ambiente domiciliario su alimentación depende principalmente de las aves de corral, los animales domésticos y los humanos (Morán, 2013).

Con respecto al ciclo de vida de los insectos adultos, con una correcta alimentación los machos pueden llegar a vivir 160 días y las hembras 172 (Morán, 2013). Los adultos solo pueden sobrevivir sin alimento un promedio de 60 días debido a las necesidades reproductivas y de vuelo.

Las ninfas deben alimentarse una vez como mínimo para poder mudar al siguiente estadio; en el primer y segundo estadio, las ninfas pueden alimentarse por medio de la coprofagia o directamente de su hospedero y sobreviven hasta 25 días sin alimento. Los individuos de estadios posteriores (ninfas de tercer y cuarto estadio) pueden sobrevivir hasta 75 días sin alimentarse, y las ninfas de quinto estadio soportan 100 días sin alimento alguno. Después del quinto estadio ninfal el insecto se considera adulto (Novelo et. al 2011).

Los machos consumen cerca de 220 ml de sangre y las hembras 282 ml. La cantidad de sangre que consumen las hembras es proporcional a la cantidad de huevos que pueden poner, por lo que una hembra durante su vida reproductiva puede poner entre 600 y 1300 huevos (Novelo et al., 2011).

### **Clasificación y distribución**

*T. dimidiata* es un insecto heteróptero del orden Hemiptera, que pertenece a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Es considerado junto con *T. infestans* y *T. brasiliensis* como uno de los principales vectores de la Enfermedad de Chagas en las Américas (Murray, 2013). Varios estudios hablan de una amplia distribución de *T. dimidiata* en naciones como Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, El Salvador y Venezuela (WHO, 2002; Córdova, 2007; Farfán y Angulo, 2011; Novelo et al., 2011).

### ***Trypanosoma cruzi* como agente causal de la Enfermedad de Chagas**

#### ***Trypanosoma cruzi*: Taxonomía y Morfología**

*T. cruzi* es un protozoo flagelado que pertenece al orden *Kinetoplastida*, grupo de organismos caracterizados por llevar en su única mitocondria a una estructura de ADN conocida como

kinetoplasto. Este ADN mitocondrial o ADN kinetoplastídico (kDNA) está conformado por maxicírculos (20kpb) y minicírculos (1.4Kpb) encadenados formando una estructura compacta (Córdoba, 2007). El nombre completo del parásito es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y está dado por su característica de multiplicarse a nivel intracelular como lo hacen todos los miembros del subgénero *Schizotrypanum* (WHO, 2002).

Dentro de sus diversos hospederos *T. cruzi* presenta tres morfologías fundamentales distintas: tripomastigote, epimastigote y amastigote. El tripomastigote que se encuentra en el contenido rectal del vector, es fusiforme y mide alrededor de 20  $\mu\text{m}$  de largo por 4  $\mu\text{m}$  de ancho, posee un núcleo ovalado en la mitad de su cuerpo y un flagelo. El epimastigote se encuentra y se multiplica en el intestino, es alargado y mide alrededor de 15  $\mu\text{m}$  de largo por 3  $\mu\text{m}$  de ancho. Finalmente, los amastigotes son esféricos y miden de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, se localizan únicamente en las células del mamífero infectado y ahí se multiplican, no tienen un flagelo visible (Córdoba, 2007).

*T. rangeli* es otro protozoo hemoflagelado que infecta a los mismos hospederos y vectores que *T. cruzi*. Este parásito es considerado como infectivo, pero no patógeno para sus huéspedes, por lo que puede generar diagnósticos erróneos de la Enfermedad de Chagas. De igual manera, comparte una morfología muy similar y algunos de los antígenos de *T. cruzi*, características que dificultan la detección de infecciones simultáneas con ambos parásitos, algo que es muy común que suceda tanto en insectos como en mamíferos (Cuba, 1998).

### **Ciclo de vida y formas de transmisión**

*T. cruzi* es un parásito que presenta un ciclo de vida complejo, ingresa en el insecto (vector) cuando este succiona la sangre de un mamífero infectado, en ese momento el insecto ingiere los tripomastigotes. Los parásitos que ingresaron en el insecto se desarrollan en el lumen de

su intestino medio en forma de epimastigotes y, después de 30 días se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del vector (Novelo et. al 2011).

La transmisión de la enfermedad sucede cuando el insecto hematófago pica al mamífero y emite simultáneamente deyecciones fecales con tripomastigotes metacíclicos, esto hace que el vector con la ayuda de sus patas y abdomen lleve las heces cargadas con parásitos hacia la abrasión en la piel causada por la picadura (Jiménez, 2013). Los tripomastigotes metacíclicos pueden ingresar al organismo por medio cualquier tipo de agrietamiento en la piel o a través de membranas mucosas, como la membrana ocular. Una vez que están dentro del mamífero los tripomastigotes ingresan a varias células que se encuentran cercanas al sitio de entrada del parásito, dentro de estas células se transforman en amastigotes los cuales se dividen por fisión binaria y se transforman en tripomastigotes dentro de las células. Finalmente cuando la carga intracelular de tripomastigotes es muy alta las células se lisan y los parásitos son liberados en el torrente sanguíneo. El ciclo de transmisión se completa cuando otro insecto vuelve a succionar la sangre del mamífero infectado. La figura 1 muestra una ilustración que resume el ciclo de transmisión de la enfermedad (Murray, 2013).

## **Patología**

### **Ciclos de la enfermedad**

Existen tres ciclos principales por los que se puede dar la transmisión de *T. cruzi*: el ciclo selvático, el doméstico y el peridoméstico. En el ciclo selvático (o salvaje), el parásito pasa de especies silvestres de mamíferos a los triatomas que habitan el ambiente selvático. Este ciclo es el responsable de un número ínfimo de casos de Enfermedad de Chagas y es el único ciclo que está presente en los Estados Unidos (Jiménez, 2013).



Por otro lado, el ciclo doméstico de transmisión sucede cuando los chinchorros han colonizado áreas muy próximas a las viviendas de localidades rurales, o inclusive, lugares dentro de estas viviendas. Esto ocurre cuando son atraídos por olores fuertes, la luz o inclusive el calor. Al ser atraídos por el olor de la comida este es el momento en el que pueden infectar los alimentos (Farfán y Angulo, 2011). Al ingresar al ambiente domiciliar es usual que este tipo de insectos colonicen adobes primitivos, pastos o casas con techos de paja. Esto ocasiona que la transmisión de la enfermedad se dé entre humanos e insectos (Guevara, et al 2005). Las especies de vectores más representativas del ciclo doméstico de la enfermedad son *T. dimidiata*, *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*. También existe otro ciclo de transmisión de la enfermedad conocido como ciclo peridoméstico. Este es un ciclo de transmisión entre insectos y animales domésticos, que también puede ocasionar que el parásito infecte a humanos (Guevara et al, 2005).

### **Otras formas de contagio**

*T. cruzi* puede transmitirse entre humanos por transfusiones sanguíneas o por donación de órganos, también se puede contraer esta enfermedad al consumir alimentos contaminados con heces de chinchorros o por manipulación indebida de objetos corto punzantes infectados (Aguilar, 1999); esto último, debido a que el parásito puede ingresar al organismo por medio de heridas abiertas en la piel o entrando directamente por la mucosa bucal, ocular o nasal (Jiménez, 2013).

En cuanto a la transmisión vertical de la enfermedad, esta se ha evidenciado tanto en perros como en otros animales, ya sea mediante la vía intrauterina o por medio de la lactancia. En los seres humanos la transmisión transplacentaria puede ocurrir durante el embarazo, y en cualquier etapa de la infección (Botero y Restrepo, 2003).

### **Patología Aguda**

La Enfermedad de Chagas se manifiesta en tres fases diferentes: la fase aguda, la fase crónica latente (indeterminada), y finalmente la fase crónica que produce secuelas en su hospedador. En la fase aguda los síntomas pueden ser leves e inespecíficos detectándose aproximadamente en el 2% de los afectados (Córdova, 2007). En pacientes menores de 15 años puede aparecer una zona de inflamación llamada chagoma en el sitio de inoculación del parásito. Si la infección ocurre por medio de la mucosa ocular, se produce una celulitis en el ojo conocida como el Signo de Romana (Córdova, 2007).

En pacientes menores a 2 años la sintomatología es más variada y compleja. Los principales síntomas son fiebre, sensación de indisposición general, hepato o esplenomegalia, poliadenopatías, miocarditis y meningoencefalitis (WHO, 2002).

### **Patología Crónica**

Varias semanas (o meses) después del apareamiento de la fase aguda, comienza la fase crónica latente de la enfermedad, que es cuando los parásitos comienzan a reproducirse intracelularmente de manera más lenta por lo que la parasitemia disminuye en el hospedero; esta fase latente puede durar indefinidamente sin presentar manifestaciones clínicas, o puede generar síntomas propios de la enfermedad crónica (Botero y Restrepo, 2003).

La fase crónica de la enfermedad es caracterizada por una baja parasitemia, y por el daño irreversible de parénquimas (tejidos funcionales de los órganos) que puede generar problemas cardíacos, digestivos o neurológicos (Córdova, 2007). La cardiopatía chagásica se caracteriza por ser una miocardiopatía crónica que altera el ritmo cardíaco. Por otro lado, los problemas en el tracto digestivo ocurren principalmente en el colon y el esófago, produciendo síntomas como

constipación o regurgitación que pueden generar que estos tejidos crezcan y se ensanchan excesivamente (magacolon y megaesófago) (Jiménez, 2013). La neuropatía chagásica se manifiesta después de una destrucción neuronal masiva con síntomas como paresias (ausencia parcial del movimiento voluntario), convulsiones y anormalidades psíquicas (Botero y Restrepo, 2003).

### **Detección del parásito**

La presencia de *T. cruzi* se diagnostica por medio de dos metodologías: la directa (o de certeza) y la metodología indirecta o serológica (Córdova, 2007). El diagnóstico directo se caracteriza por buscar de forma específica al parásito, ya sea en la sangre de los pacientes afectados o en las deyecciones fecales de los triatomas, usando como técnica preferencial a la microscopía (Córdova, 2007).

Varios estudios demuestran que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usada como método de diagnóstico en vectores, mamíferos y humanos, presenta un alto grado de especificidad y sensibilidad, que supera al de cualquier método de diagnóstico directo (Guevara et al., 2005; Córdova, 2007; Jiménez, 2013). Esto es de suma importancia, ya que existen parásitos morfológicamente muy similares a *T. cruzi* como por ejemplo *T. rangeli* (Guevara et al, 2005), que por su morfología puede ser fácilmente confundidos con *T. cruzi* y complicar el diagnóstico del mal de Chagas, cuando este se hace con métodos de identificación microscópica (Cuba, 1998).

### **Criterios de identificación**

Los *T. cruzi* como poblaciones aisladas de parásitos poseen cierto grado de complejidad. Si se estudian las cepas obtenidas de diversos hospederos, se puede notar una clara diferencia en la morfología y virulencia del parásito (Córdova, 2007).

Estudios genéticos preliminares revelaron una variación sustancial de isoenzimas que separó al parásito en tres grupos o zimodemas principales llamados: Z1, Z2 y Z3 (Córdova, 2007), luego estudios posteriores analizaron 15 genes codificantes de isoenzimas que revelaron una heterogeneidad mayor entre las poblaciones de *T. cruzi*, lo que llevo a clasificar a todas las poblaciones estudiadas del continente Americano en 43 zimodemas, que no pudieron ser agrupados en unos cuantos clusters manejables. De esta manera, el análisis de ARN ribosomal y de regiones intergénicas fueron las metodologías que permitieron observar dimorfismo entre linajes (Córdova, 2007).

La amplificación por PCR de una región específica del gen 24S alpha ARNr produjo fragmentos de 125 pb y de 110 pb, lo que definió dos tipos de linajes principales también conocidos como tipos mayores de cepas (WHO, 2002). La estandarización de la nomenclatura para los dos tipos de linajes es la siguiente:

*T. cruzi I* = equivalente a zimodema 1; linaje 2; grupo 1 o unidad taxonómica discreta (DTU) 1; tipo III; ribosoma II/III.

*T. cruzi II* = equivalente a zimodema 2; zimodema A; linaje 1; grupo 2 o DTU 2; tipo II; ribosoma I.

(WHO, 2002).

Estudios de distribución epidemiológica en regiones de Bolivia, Brasil y Perú han revelado que la mayoría de cepas aisladas de humanos, triatomas y animales domésticos que habitan zonas endémicas donde existe la enfermedad pertenecen a *T. cruzi* tipo II, por lo que se ha asociado a este tipo de cepas con el ciclo de transmisión doméstico de la enfermedad, mientras que el ciclo selvático se asocia al *T. cruzi* tipo I (WHO, 2002).

Se ha aislado a cepas de *T. cruzi* tipo II, en la mayoría de pacientes seropositivos de zonas endémicas, por lo que se infiere que este linaje posee características que promueven la infección en humanos y por lo tanto produce una parasitemia más alta (WHO, 2002).

## **La Enfermedad de Chagas en el Ecuador**

### **Revisión bibliográfica de estudios en el Ecuador**

La Enfermedad de Chagas es reconocida por la OMS como uno de los problemas de salud pública que más afectan en los países de América latina, y el Ecuador no es la excepción. El área de estudios epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) muestra tasas de prevalencia de la enfermedad que oscilan entre un rango de 0.12 a 1.16 por cada 100.000 habitantes (MSP, 2010). Estimaciones realizadas por esta entidad muestran que la prevalencia de la enfermedad en promedio, es probablemente del 1.38%; la sierra muestra una prevalencia de 0.65%, mientras que en la Costa y la Amazonía la prevalencia alcanza porcentajes de 1.99% y 1.75% respectivamente.

Alrededor de 8.5 millones de personas en el Ecuador, habitan en zonas de riesgo donde la transmisión vectorial es un hecho o es muy probable que exista. De 3 a 5 millones de personas son consideradas como especialmente vulnerables, debido a su condición socioeconómica, y a las características de sus viviendas (MSP, 2010).

Las provincias que históricamente han sido más afectadas por esta enfermedad son El Oro, Manabí, Santa Elena, Guayas y Loja (Garzón, 2002). Sin embargo, entre los años 2008 y 2009 el 80% de los nuevos casos registrados provenían de las provincias amazónicas de Orellana y Sucumbíos (MSP, 2010). Estudios más recientes (Amunárriz, 2010) confirman que hay un foco autóctono de la enfermedad en el cantón Aguarico ubicado en la provincia de Orellana.

(Abad-franch, 2002; Grijalva et al., 2009; Giraldo y Tamayo, 2012) demuestran la existencia de zonas endémicas para la enfermedad en las provincias de Guayas y Santa Elena. Mientras que (Chico et al., 2001) reporta que se han descubierto focos de transmisión al norte de la Amazonía principalmente en la provincia de Napo.

### **Transmisión de la enfermedad en focos residuales endémicos**

Según el trabajo recopilatorio de (Aguilar, 1999) en las zonas surorientales de endemismo Arteaga desde el año 1927 verificó la presencia de chinchorros, al igual que la prevalencia de la enfermedad en zonas aledañas de la provincia de Santa Elena. En los años 30 se ratificó el endemismo de la Enfermedad de Chagas en áreas urbanas de Guayaquil, en un estudio dónde se identificó y caracterizó a colonias de *T. dimidiata* que estaban reproduciéndose en casas de caña y madera (Aguilar, 1999).

Como señala (Grijalva et al., 2003; 2008; 2009) en nuestro país se ha estudiado a varios vectores que pueden ser posibles transmisores de enfermedades causadas por parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma*. En la provincia de Manabí se ha encontrado a especies de vectores como *Rhodnius ecuadoriensis* y *Panstrongylus howardi*, que se encontraban parasitados con *T. cruzi* de forma natural. Según (Botero, 2003) en el territorio ecuatoriano se ha catalogado a 15 especies de chinchorros que pueden ser potenciales vectores. Sin embargo se considera que *T. dimidiata* y *R. ecuadoriensis* son los vectores de mayor importancia epidemiológica en el país, ya que se desarrollan en ambientes en los que conviven con el hombre. Por otro lado, se ha evidenciado que especies como *Pastrongylus geniculatus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* y *Pastrongylus howardi* invaden hábitats humanos desde ecótopos silvestres. (Botero, 2003) también documentó que las tres primeras especies mencionadas están involucradas en los ciclos de transmisión en focos residuales amazónicos. Mientras que *P. howardi* ha sido

considerado como un importante vector para el ciclo de transmisión selvático en las provincias de la costa.

Investigaciones como las de (Abad-Franch, 2001; Grijalva et al. 2003; Giraldo y Tamayo, 2012; Jiménez, 2013; Mantilla et al. 2014) han demostrado que la prevalencia de *T. dimidiata* en zonas domiciliarias y peridomiciliarias ha aumentado en los últimos años, lo que se debe principalmente a actividades humanas indebidas como la deforestación y la apropiación de terrenos.

## JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, estudios realizados en nuestro país (Guevara et al., 2005; Jiménez, 2013; Mantilla et al., 2014) reportan la presencia de los chinchorros vectores de la Enfermedad de Chagas en focos residuales de zonas rurales con alta afluencia turística, principalmente en las provincias de Guayas y Santa Elena.

Mediante estos trabajos se evidenció utilizando el diagnóstico microscópico altos índices de infección por *Tripanosoma cruzi* (mayores al 70%) en la especie *Triatoma dimidiata*. Estos índices son una muestra de que existe peligro de contagio para los pobladores de la provincia de Santa Elena, una provincia en la que se ha documentado la presencia de abundantes chinchorros (Aguilar, 1999; Guevara et al., 2005) en el peridomicilio; donde la gente tiene la costumbre de almacenar materiales de construcción como: tejas, madera, recipientes plásticos y planchas de eternit, lo que constituye un hábitat ideal para la presencia de estos insectos vectores.

Un estudio realizado en el cantón Pedro Carbo utilizando la técnica del PCR (Guevara et al., 2005), mostró que la prevalencia de la parasitosis en 271 muestras analizadas correspondía al 91%. Estos altos porcentajes de infección en vectores, fueron también encontrados en la

provincia de Santa Elena por (Mantilla et al. 2014), en un estudio (de diagnóstico microscópico) que mostró porcentajes de infección parasítica de hasta un 72% en el vector *T. dimidiata*.

De esta manera, sería muy importante esclarecer la dinámica y detalles de la transmisión de la enfermedad en la provincia de Santa Elena, en donde los altos índices de infección de los chinchorros se contrastan con los pocos casos de Chagas reportados, lo que ha hecho que aparezcan varias hipótesis que quieran explicar la discordancia entre estos índices. Algunos conocedores del tema (Aguilar, 1999; Guevara et al. 2005) sugieren que la presencia de abundantes animales domésticos en los patios de las localidades rurales de Santa Elena, sirven de fuente de alimento para las poblaciones de chinchorros. Lo que hace que se cree una barrera de transmisión entre *T. cruzi* y los habitantes de las casas, hipótesis que debe ser más estudiada y confirmada en el futuro.

Otra hipótesis que puede explicar porque no concuerdan los altos índices de infección en los chinchorros estudiados con los pocos casos de mal de Chagas reportados, es que los estudios microscópicos (Guevara et al. 2005; Jiménez, 2013; Mantilla et al. 2014) carecen de la sensibilidad y especificidad necesaria para discriminar infecciones producidas por *T. rangeli*.

Por lo que el presente estudio de detección e identificación molecular de *T. cruzi* y/o *T. rangeli* puede confirmar los porcentajes de parasitemia reportados por (Mantilla et al. 2014), y aportar información para entender mejor la dinámica de transmisión del mal de Chagas en el país. Y de esta manera brindar recomendaciones oportunas a las autoridades de salud, que sirvan para erradicar a esta enfermedad del territorio ecuatoriano en un futuro cercano.



## OBJETIVOS

- Detectar e identificar molecularmente a *Trypanosoma cruzi* y/o *Trypanosoma rangeli* en muestras de heces de *Triatoma dimidiata*, su principal vector en las provincias de la costa sur del Ecuador.

### Objetivos específicos

- Extraer ADN de *Trypanosoma cruzi* y/o *Trypanosoma rangeli* de 20 muestras de heces de *Triatoma dimidiata* recolectadas de la comunidad Bajada de Chanduy, ubicada en la provincia de Santa Elena.
- Validar molecularmente la parasitosis encontrada en 20 muestras de heces de *T. dimidiata* previamente diagnosticadas mediante microscopía por (Mantilla, et al. 2014).
- Utilizar los primers específicos S35/S36 para determinar la presencia del parásito *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en muestras de heces provenientes de la provincia de Santa Elena.
- Utilizar los primers específicos TCC/TC1/TC2 para identificar molecularmente el linaje (o tipo mayor) de parásito que está presente en las muestras de heces estudiadas.

## ÁREA DE ESTUDIO

El estudio entomológico de campo se llevó a cabo en focos endémicos residuales de Enfermedad de Chagas en la Península de Santa Elena, específicamente en una población rural llamada Bajada de Chanduy, ubicada a pocos Kms de la carretera Guayaquil-Playas. Dentro de esta población las búsquedas de chinchorros se realizaron específicamente en el barrio Santa Rosa (S 02´ 18.434, W 80´ 17.200). Este barrio se encuentra en el borde entre las provincias de Santa Elena y el Guayas.

La parte de laboratorio del presente estudio fue realizada en las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito Campus Cumbayá. La extracción de heces de los chinchorros se realizó en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical. La extracción de ADN a partir de las heces, reacciones en cadena de la polimerasa, y su posterior electroforesis para visualización de resultados fueron realizados en el Instituto de Microbiología.

## **MATERIALES**

### **Extracción de ADN**

- kit QUAamp DNA Stool
- Proteinasa K (Promega)
- Etanol (70%, 100%)
- Buffer AE (elution buffer)
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Vórtex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño María (Shel LAB)
- Tubos eppendorf 1.5ml
- Micropipetas (Labnet)

### **Amplificación de ADN**

- H<sub>2</sub>O para PCR
- Buffer 5X (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega)
- Primers
  - S35
  - S36
  - TC

- TC1
- TC2
- GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)
- Muestras de heces de *T. dimidiata*
- Termociclador BIO-RAD
- Tubos eppendorf 0.2ml

### **Electroforesis en gel de agarosa**

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- TBE 1X
  - 54 g de TRIS Base (Promega)
  - 27.5 g de ácido bórico (Acros Organics)
  - 20 ml de EDTA pH 8 (0.5 M)
  - 5000 ml agua destilada esteril
- Agarosa LE
- SYBR Safe DNA gel stain (invitrogen)
- Amplicones de *T. cruzi*
- Micropipetas (Labnet)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (invitrogen)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT-600)
- Microondas (Panasonic)

### **Secuenciamiento**

- Amplicones TCC/TC1/TC2
- Software: PREGAP, GAP, MEGA, BLAST

## MÉTODOS

### Extracción de ADN

Se analizaron 20 muestras de heces provenientes del estudio de campo realizado por (Mantilla et al., 2014). En el estudio antes mencionado se diagnosticaron microscópicamente a 29 muestras, 9 de las cuales pertenecían a contenidos estomacales de ninfas. Un tipo de muestras que la literatura (Kirchhoff, 1996) recomienda no se utilice al momento de comparar métodos microscópicos con técnicas moleculares, ya que pueden generar inhibición en las PCR debido a la presencia de compuestos como polisacáridos de alto peso molecular y sales biliares.

Las muestras fueron conservadas en congelación a -20°C en PBS 1X hasta su posterior análisis. La tabla 1 presenta la codificación de las muestras utilizadas y los resultados que se obtuvieron del diagnóstico microscópico realizado por el estudio de campo en mención.

La extracción de ADN fue realizada mediante el kit QIAamp DNA Stool y las muestras obtenidas fueron conservadas en buffer AE a -20°C, hasta su análisis por PCR.

### Amplificación de ADN

Para analizar la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* y/o *T. rangeli* en las muestras de heces estudiadas se amplificó un fragmento de la región variable del minicírculo del kinetoplasto, esperándose obtener amplicones de 330pb para *T. cruzi* y amplicones de tamaños inespecíficos (entre 450pb a 760pb) para *T. rangeli*. Los primers utilizados para la amplificación fueron S35 (5'-AAATAATGTACGGGKGA-GATGCATGA-3') y S36 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3').

El volumen final de la reacción de PCR fue de 20 µl, utilizándose las concentraciones de reactivos y el programa de amplificación detallados en las tablas (2.1 y 2.2) respectivamente.

La temperatura de alineamiento de los primers fue modificada de 60°C a 59.6°C, ya que con esta disminución se lograron observar bandas con mejor resolución.

Para la identificar el tipo mayor de cepas de *T. cruzi* que estaban parasitando a los chinchorros estudiados se amplificó una porción del espaciador no transcrito del gen miniexon, esperándose obtener amplicones de 300 pb para *T. cruzi* de tipo II y de 350 pb para *T. cruzi* de tipo I. Los primers utilizados para la amplificación fueron los siguientes: TCC (5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3'); TC1 (5'-GTGTCCGCCACCTCCTCCGGGCC-3') y TC2 (5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3').

El volumen final de la reacción de PCR fue de 10 µl, utilizándose las concentraciones de reactivos y el programa de amplificación detallados en las tablas (3.1 y 3.2). La temperatura de alineamiento de los primers fue modificada de 50°C a 49.6°C, con la finalidad de obtener bandas con mejor resolución.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1.5%) teñidos con SYBR SAFE. Primero, se procedió a armar la cámara de electroforesis, colocando como correspondía la cama de la cámara, los soportes laterales y finalmente el peine moldeador de pocillos. Para hacer el gel, se diluyó una solución madre de TBE 10X hasta obtener 100 ml de una de TBE solución 1X, después se pesó 1.5g de agarosa y se los colocó en un Erlenmeyer junto con la solución diluida. Esta mezcla se homogenizó con la ayuda de un microondas, calentándola alrededor de 2 minutos. Se procedió a agregar 2 µl de SYBR SAFE una vez que la mezcla se enfrió (tolerable al tacto), el colorante fue homogenizado agitando el Erlenmeyer. Finalmente, se vertió la mezcla en el molde de solidificación de la cámara de electroforesis. Consecuentemente, se dejó solidificar la agarosa y cuidadosamente se retiró el peine,

comprobando que todos los pocillos se formaron en el gel. Como último paso se llenó la cámara de electroforesis de TBE 1X reciclado, hasta el punto en el que cubría todo el gel. Para el análisis de las muestras se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen) en el primer pocillo del gel y posteriormente se cargaron las muestras. La corrida del gel se hizo a 80 V por un tiempo de 40 minutos.

## **Secuenciamiento**

Cinco amplicones (obtenidos a partir de la amplificación del gen miniexón de *T. cruzi*) fueron seleccionados al azar para ser analizados por secuenciamiento de ADN. Cada producto de PCR fue secuenciado en ambas direcciones por la empresa: Funcional Biosciences Inc., MGE Innovation Center, 505 South Rosa Road, Suite 28, Madison, WI 53719.

Se utilizó el paquete de programas staden con la finalidad de limpiar y alinear las 5 secuencias. El software BLAST fue utilizado para comparar las secuencias problema (por ejemplo la secuencia de la muestra O/15; ver anexo 1) con la base de datos del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI).

El software Mega fue utilizado para comparar la variabilidad nucleotídica entre las secuencias obtenidas (ver anexo 3), los resultados demostraron un alto grado de homología entre las cinco secuencias, lo que significa que todas ellas se agruparan con secuencias pertenecientes al mismo tipo de *T. cruzi*.

# **RESULTADOS**

## **Detección de *Trypanosoma cruzi* por el método de PCR**

Para confirmar la presencia, calidad e integridad del ADN de parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma* en las muestras de heces estudiadas, se realizó una PCR con la finalidad de

amplificar la región variable del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi*, por medio de los primers S35/S36. Las figuras 1.1, 1.2 y 1.3 muestran los resultados obtenidos, donde se puede ver que se obtuvo un producto de amplificación de 330pb para las 20 muestras analizadas.

### **Identificación Molecular de *Trypanosoma cruzi***

Las muestras en estudio fueron sometidas nuevamente a una PCR con la que se buscó amplificar una porción del espaciador no transcrito del gen miniexón de *T. cruzi*. Se utilizó los primers específicos TCC/TC1/TC2 para la caracterización molecular de las cepas de *T. cruzi*. Los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa (figuras 2.1, 2.2 y 2.3) evidenciando bandas de 300 pb lo que demuestra la presencia de *Trypanosoma cruzi* tipo II en las muestras de heces analizadas.

### **Análisis de secuencias**

Se recibió las secuencias de 5 productos de amplificación (B/2, F/6, O/15, R/18 y T/20) que fueron escogidos de manera aleatoria y obtenidos a partir de los primers TCC/TC1/TC2. La secuencia del amplicón que proviene de la muestra O/15 es presentada como anexo 1.

El software BLAST mostró que la secuencia FJ463160.1 presenta la mayor homología con las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del gen miniexón (ver anexo 2). Esta secuencia pertenece a un *T. cruzi* “Cepa 2”, y esta cepa pertenece al tipo mayor II de cepas de *T. cruzi*.

El anexo 3 muestra la baja variabilidad nucleotídica que existe entre las secuencias analizadas, lo que permite demostrar que todas ellas tendrán un alto grado de homología con la secuencia FJ463160.1.

## **DISCUSIÓN**

El diagnóstico microscópico ha sido tradicionalmente utilizado para detectar infección en las heces de chinchorros parasitados; es un método directo que no necesita de un laboratorio ni

equipos especializados, es poco costoso y permite determinar con relativa facilidad, los porcentajes de infección de los especímenes examinados (Guevara et al., 2005). La microscopía puede ser una metodología de diagnóstico específica, pero carece de la sensibilidad necesaria para detectar la presencia de parásitos en heces, especialmente si consideramos que la parasitosis en las heces de los insectos vectores suele disminuir si estos mueren durante las colectas o si son sometidos a periodos prolongados de ayuno (Shikanai-Yasuda et al., 1996) lo que pudo suceder en el presente estudio ya que los chinchorros fueron colectados de comunidades rurales y luego fueron analizados en laboratorios especializados de la USFQ. Por otro lado, la examinación microscópica de las heces de insectos se basa en la observación de parásitos móviles, razón por la cual es un proceso tedioso que debe ser realizado en un periodo corto de tiempo después de que el material fecal fue colectado. En este contexto, la fatiga del observador también puede explicar la poca sensibilidad de método microscópico tradicional (Coronado, 2006).

En la actualidad, el diagnóstico molecular (PCR) es cada vez más utilizado para determinar la presencia de *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en heces de insectos chinchorros, ya que tiene sensibilidad y especificidad comprobada para detección de infecciones dobles, y se pueden utilizar diferentes primers disponibles en la bibliografía. En este estudio se seleccionaron los primers S35/S36 por su especificidad, ya que amplifican una región determinada del ADNk de ambas especies de parásitos, produciendo amplicones de diferentes tamaños que nos permiten diferenciarlas en un gel de agarosa (Jiménez, 2013).

Esta técnica también tiene alta sensibilidad, ya solamente se requiere de pocos microgramos de material genético del parásito para que este pueda ser detectado en las muestras de heces. Los primers S35/S36 amplifican una secuencia de 330bp de la región variable de los minicírculos



del kinetoplasto, y existen de 10000 a 20000 copias de esta secuencia por parásito (Kirchhoff, 1996).

En este estudio se utilizó los primers S35/S36 para detectar la presencia de *T. cruzi* en 20 muestras de heces de *T. dimidiata* previamente diagnosticadas por microscopía en el trabajo de (Mantilla et al., 2014). Mediante la microscopía se logró detectar infección en 16 (80%) de las 20 muestras examinadas; al contrario, el diagnóstico molecular por PCR reveló la presencia de parásitos en las 20 muestras estudiadas (100% de infección). Porcentajes tan altos de infección son poco frecuentes de encontrar en estudios de esta y otras enfermedades vectoriales en donde los porcentajes más bien pueden ser muy bajos; se sugiere que estos datos preliminares puedan ser corroborados por futuros estudios con mayor número de muestras de chinchorros. Sin embargo, existen una serie de estudios donde se demuestra que los porcentajes de infección investigados mediante métodos moleculares son más altos que los que se obtiene si se diagnostica a los vectores únicamente mediante microscopía. (Guevara et al., 2005) demostró que el diagnóstico molecular detectó la parasitosis en *T. dimidiata* en un porcentaje ligeramente más alto de muestras (46.13%: 125 de 271) que la microscopía (44.16%: 121 de 271). Trabajos como el de (Dorn et al., 1999) indican que por técnicas moleculares se pueden detectar porcentajes de infección en insectos, 1.5 veces más altos que los que se encontrarán solo usando examinación microscópica. En otros estudios para detectar a *T. cruzi* en diferentes especies de triatomas también se obtuvieron resultados de mayor sensibilidad mediante técnicas moleculares: (Shikanai-Yasuda et al., 1996) determinó presencia de infección en 32 de los 54 grupos de insectos vectores que estudió (59% de infección) por PCR, mientras que por microscopía solo encontró 13% de infección en el mismo grupo de insectos.

Es necesario mencionar que no solo los métodos microscópicos presentan problemas que pueden afectar la validez de sus resultados. En ocasiones, los resultados obtenidos mediante

métodos de diagnóstico molecular pueden sesgarse por la presencia de falsos positivos causados por la contaminación de mezclas de reacción de PCR con productos que fueron generados en amplificaciones pasadas donde se utilizó el mismo par de primers (Kirchhoff, 1996). Para evitar que este tipo de problemas afecten los resultados del presente estudio, el procesamiento de las muestras de heces y la preparación de las mezclas de reacción para PCR fueron realizadas en un espacio físico diferente al que se utilizó para realizar las reacciones de PCR en sí, y las electroforesis para visualización de resultados (Garzón, 2002). Esto permitió asegurarnos que los altos porcentajes de infección determinados en los chinchorros estudiados no son producto de falsos positivos generados por contaminación de mezclas de reacción para PCR.

Las figuras (1.1, 1.2 y 1.3) muestran que los productos de amplificación obtenidos a partir de los primers S35/S36 tienen un tamaño de 330pb, lo que permite confirmar la presencia de *T. cruzi* (y no de *T. rangeli*) en las 20 muestras analizadas. Otro paso importante en el proceso de detección molecular es llegar a identificar la división filogenética o tipo mayor de *T. cruzi* que está activamente infectando a los chinchorros recogidos de zonas peridomiciliares. Esta identificación permite corroborar la identificación realizada en otros estudios en la zona como el de (Jiménez, 2013) que pueden servir de base para establecer asociaciones entre la taxonomía y la biología del parásito, que puedan ayudar a comprender mejor la dinámica de transmisión y el desarrollo de la enfermedad en ambientes domiciliarios del territorio ecuatoriano, principalmente en la costa sur (Botero et al., 2006).

Para identificar molecularmente el tipo de parásito que infectaba a los chinchorros estudiados se utilizó el set de primers TCC/TC1/TC2 que fue desarrollado por (Souto et al., 1996) y sirven para amplificar una porción del espaciador no transcrito del gen miniexón de *T. cruzi*. La PCR con estos primers genera un amplicón de 350 pb para *T. cruzi* tipo I y otro de 300 pb para *T. cruzi* tipo II. Las figuras 2.1, 2.2 y 2.3 muestran amplicones de alrededor de 300 pb lo que

permite identificar la presencia de *T. cruzi* tipo II en las muestras de heces estudiadas. Para confirmar estos resultados, se envió a secuenciar 5 productos de amplificación obtenidos a partir de los primers TCC/TC1/TC2. Las secuencias obtenidas fueron colocadas en el software Blast para confirmar que eran homólogas al ADN de *T. cruzi* de tipo II; efectivamente se comprobó que todas ellas tenían un alto grado de homología con varias secuencias existentes en el GenBank pertenecientes a *T. cruzi*; la secuencia que demostró tener una mayor homología con las secuencias problema fue la FJ463160.1 que pertenece a un *T. cruzi* “Cepa 2” como se ve en el anexo 2. Esta cepa de *T. cruzi* pertenece a la división filogenética (o tipo mayor) II de este parásito, lo que permite confirmar los resultados obtenidos a partir de la amplificación del gen miniexon.

La identificación de cepas de *T. cruzi* tipo II en zonas peridomiciliares de una zona rural habitada de la Península de Santa Elena puede tener importancia epidemiológica. En un estudio realizado en el Brasil se encontró que las cepas de *T. cruzi* tipo I se asocian principalmente al ciclo selvático de transmisión de la enfermedad, mientras que las cepas de *T. cruzi* tipo II estaban más relacionadas al ciclo de transmisión doméstico de la enfermedad, lo que concuerda con los hallazgos obtenidos en el presente estudio, ya que los chinchorros parasitados que se estudiaron vivían y se desarrollaban junto a los seres humanos en sus casas y peri domicilio. Esto coincide también con los datos presentados en un estudio realizado en cuatro comunidades del Cantón General Villamil-Playas (Jiménez, 2013), en el que se aisló únicamente a cepas pertenecientes al tipo II de *T. cruzi* de todos los chinchorros que fueron colectados del domicilio y peridomicilio. Por lo que es pertinente que en el futuro se siga investigando si *T. cruzi* tipo II está más estrechamente asociado a los ciclos de transmisión domésticos de la enfermedad de Chagas y a la especie de vector *T. dimidiata*.

*T. cruzi* tipo II ha sido asociado con el apareamiento de afecciones cardíacas durante la fase crónica de la Enfermedad de Chagas (Andrade y Magalhaes, 1996). Según los datos del MSP se podría inferir que el *T. cruzi* tipo II es el genotipo de parásito que presenta un tropismo preferencial por los tejidos del corazón en el Ecuador, ya que de los 35000 casos que presentan la fase crónica sintomática de la enfermedad en nuestro país, 30000 muestran afecciones cardíacas (MSP, 2010). Este tipo de afecciones representan pérdidas económicas para el estado (en términos de carga social) del orden de 23 millones de dólares al año (MSP, 2013), que podrían evitarse con adecuadas medidas de control vectorial si efectivamente se determina que la infección en humanos se está generando por transmisión vectorial en el domicilio.

Finalmente, se recomienda que la detección de parásitos por microscopía sea en lo posible siempre complementada mediante análisis de diagnóstico molecular, que permitan obtener datos más exactos de la infección parasitaria presente en los vectores del Mal de Chagas.

## CONCLUSIONES

El método de diagnóstico microscópico demostró ser poco específico, y menos sensible para detectar la infección parasitaria en heces de *T. dimidiata*.

El estudio complementario de diagnóstico mediante PCR mostró ser más sensible y específico que el diagnóstico microscópico. Se detectó la presencia de *T. cruzi* en el 100% (20) de la muestras analizadas.

La identificación molecular realizada mostró que *Trypanosoma cruzi* tipo II está presente en los triatomas recolectados de la comunidad Bajada de Chanduy ubicada en la provincia de Santa Elena.

## RECOMENDACIONES

Realizar un estudio más amplio (con mayor número de muestras) para determinar y corroborar la prevalencia de *T. cruzi* en *T. dimidiata* en las zonas endémicas residuales para la Enfermedad de Chagas de la Península de Santa Elena.

Realizar análisis de variabilidad genética para tener una mejor idea del origen y la estructura poblacional de *T. cruzi* en la región costa sur de nuestro país. Se recomienda realizar análisis de caracterización molecular para saber que cepas de *T. cruzi* son las que prevalecen en las zonas endémicas para la Enfermedad de Chagas del territorio ecuatoriano.

Realizar análisis de las glándulas salivares y probóscides de los triatomas colectados para buscar la presencia de parásitos como *Trypanosoma rangeli* (que poseen otro tipo de ciclo de vida extrínseco en el insecto vector), lo que permitiría descartar la posibilidad de infecciones dobles en los triatomas estudiados.

Implementar estrategias de control vectorial eficientes para erradicar a *Triatoma dimidiata* de la zona suroeste del país y de la península de Santa Elena. Estas posibles estrategias deben tomar en cuenta los datos de estudios entomológicos y epidemiológicos (como el presente estudio) que ayudan a entender mejor el ciclo biológico del insecto, principalmente en el peridomicilio.

Realizar investigaciones con suero de pacientes, y de animales domésticos como perros, en la península de Santa Elena para confirmar la prevalencia de *T. cruzi* en reservorios humanos y no humanos a nivel domiciliar. De esta manera se determinará si los animales domésticos pueden servir como barreras de transmisión a nivel peridoméstico que evitan la transmisión del Mal de Chagas a humanos en esta zona como sugiere (Guevara et al., 2005).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch, F., Paucar, C., Carpio, C., Cuba, C., Aguilar, M., & Miles, M. (2001). Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the design control strategies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 611-620.
- Abad-Franch, F. (2002). The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador, with emphasis on *Rhodnius ecuatoriensis* (Triatominae). Phd Thesis, Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Universidad de Londres, Reino Unido, 411 pp.
- Aguilar, M., Abad-Franch, F. Racines, J. (1999). Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. *A Brief Review*. *Mem Inst Río de Janeiro*. Vol. 94, 387-393.
- Amunárriz, M., Quito, S., Tandazo, V., y López, M. (2010). Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en el cantón Aguarico, Amazonía ecuatoriana. *Rev Panam* (1): 28.
- Andrade, S y Magalhaes, J. (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains; correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30 (1): 27-35.
- Botero & Restrepo. (2003). *Parasitosis Humana*. Cuarta edición: 210-235.
- Botero, A., Mejía., A y Triana., O. (2006). Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia.
- Brenière, S.F. (1998). Different behaviour of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Experimental Parasitology*, 89:285–295.
- Bern C. (2015). Chagas Disease. *The New England Journal of Medicine* 373: 456-66

- Coronado, X., Zulantay, I., Reyes E., Grittith, S. (2006). Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease.
- Chacín, C. Y Torres, R. (2010). Estudio de la inserción del ADNk de *Trypanosoma cruzi* en el genoma de pacientes con enfermedad de Chagas. Univ. Med. Bogotá 51 (4): 371-384.
- Chico, H., Sandoval, C., Guevara, A., Calvopiña, M., Cooper, P., Reed, S., Guderian, R. (2001). Chagas' disease in Ecuador: evidence for disease transmission in an indigenous population in the Amazon region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 317-320.
- Cuba, A. (1998). Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Revista Sociedad Brasileña de Medicina Tropical 30 (2): 111-119.
- Dorn, P. L. Engelke, D. Rodas, A. Rosales, R. Melgar, S. Flores, J. y Monroy, C. (1999). Utility of the polimerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas disease vectors. *Trop Med Hyg* 60 (5): 740-745.
- Farfán, A. y Angulo, S. (2011). Conducta alimentaria de poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en una zona endémica y sus implicaciones epidemiológicas. *Rev salud pública* 13(1): 163-172
- Fernandes, O. et al. (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58:807–811.
- Garzón, E., Barnabe, C., Córdova, X., Bowen, C., Gómez, E., Ouaiissi, A., Tibayrenc, M., Guevara, A. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first

observation of zymodeme III genotypes in chagasic chronic patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Giraldo, J y Tamayo, M. (2012). Determinación de la presencia de anticuerpos anti. *T. cruzi* en caninos en zonas endémicas para la Enfermedad de Chagas de la provincia del guayas: Cantón General Villamil Playas-Posorja. Cerrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Quito: UCE. 59 p.

Gómez, 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.

Guevara, A., Ruiz, C., Houghton, R., Reynolds, L., Sleath, P., Benson, D., Ouaisi, A., y Guderian, R. (1999). Evaluation of a recombinant protein (RTC24) and synthetic peptides in anti-*Trypanosoma cruzi* positive samples from blood bank donors in chagasic endemic areas of Ecuador. Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 27, 19-22.

Guevara, A., J. Moreira, H. Criollo, S. Vivero, M. Racines, V. Cevallos, R. Prandi, C. Caicedo, F. Robinzon and M. Anselmi. (2014). "First description of *Trypanosoma cruzi* human infection in Esmeralda's province, Ecuador." Parasit Vectors 7: 358.

Grijalva, M., Escalante, L., Paredes, R., Costales, J., Padilla, A., Rowland, E., Aguilar, H., & Racines, J. (2003). Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 69: 380-385.

Grijalva, M., Terán, L., Villaces, A. (2008). Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)



- under laboratory conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 380-385.
- Grijalva MJ, Palomeque-Rodriguez FS, Costales JA, Dávila S, Arcos Terán L. (2009). High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in Southern Ecuador. *J Med Entomol* 42: 68-74.
- Guevara, A., Garzón, E. Bowen, C. Córdova, X. Gómez, E. y Ouaiissi, A. (2005). High Infection rates of *Triatoma dimidiata* are associated with low levels of *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in Pedro Carbo. Ecuador.12, 65-68.
- Jiménez, S. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR en muestras recolectadas en cuatro comunidades del cantón general villamil playas, provincia del guayas. Departamento de Ciencias Biológicas. Escuela Politécnica del Ejército.
- Kirchhoff, L., Votava, J., Ochs, D., & Moser, D. (1996). Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1171-1175.
- Mantilla, B. Lascano, M. Jimenez, F. Quinde, L. Espinoza, M. Guevara, A. y León, R. (2014). Epidemiological profile of Chagas disease in southern coastal Ecuador: pilot study of the *Trypanosoma cruzi* infection in vector *Triatoma dimidiata*. Quito. *Avances en Ciencias e Ingenierías* 6(2): B1-B6.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2013). Proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades Metaxénicas. Recuperado el 1 de abril del 2016 de:

[http://instituciones.msp.gob.ec/dps/snem/images/proyectocontroldevectorismetaxenic  
as.pdf](http://instituciones.msp.gob.ec/dps/snem/images/proyectocontroldevectorismetaxenic<br/>as.pdf)

Monroy, J. (2010). Informe de gestión: componente Chagas-Leishmaniasis-Oncocercosis. Programa Nacional de Control de enfermedades infecciosas. Recuperado el 1 de abril del 2016 de:

[http://instituciones.msp.gob.ec/dps/snem/images/rendicionde\\_cuentas\\_chagas\\_leish\\_o  
nco.pdf](http://instituciones.msp.gob.ec/dps/snem/images/rendicionde_cuentas_chagas_leish_o<br/>nco.pdf)

Morán, A. (2013). Ficha técnica de *Triatoma dimidiata* (Latrielle, 1881). Universidad de Salvador (CENSALUD).

Murthy, V. Dibbern, M. y Campbell, D. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Molecular and cellular probes 6: 237-243.

Murray, P. Rosenthal, K y Pfaller, M. (2013). Microbiología Médica. Protozoos sanguíneos y tisulares. Elsevier Saunders. 7ma edición.

Novelo, E. Piña, H. Ortigón, J. & Pérez, M. (2011). Biología y Ecología de *Triatoma dimidiata*, algunos aspectos de estudio. Universidad de Guadalajara. Dugesiana 18 (1): 11-16.

Shikanai-Yasuda, M., Ochs, Z. and Kirchhoff, L (1996). Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. Molecular and cellular probes 6: 230-237.

Vallejo, G. Guhl, F. Chiari, E & Macedo, A. (1998). Species-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polimerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Tropica 72: 203-212.

World Health Organization. (2002). Chagas Disease: Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series.

Zingales, B. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal of Parasitology*, 28:105–112.

Zingales, B. (1998). *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trópica*, 68:159–173.

## TABLAS

**Tabla 1.** Resultados de microscopía y detección molecular de *T. cruzi* en muestras de heces

Codificación de triatomas	Detección por microscopía (Mantilla et al., 2014)	Detección Molecular
<b>A/1*</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
B/2	Positivo	Positivo
C/3	Positivo	Positivo
D/4	Positivo	Positivo
F/6	Positivo	Positivo
G/7	Positivo	Positivo
L/12	Positivo	Positivo
<b>M/13</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
N/14	Positivo	Positivo
O/15	Positivo	Positivo
P/16	Positivo	Positivo
R/18	Positivo	Positivo
S/19	Positivo	Positivo
T/20	Positivo	Positivo
U/21	Positivo	Positivo
<b>V/22</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
W/23	Positivo	Positivo
X/24	Positivo	Positivo
BB/28	Positivo	Positivo
<b>CC/29</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>

\*El número que se encuentra al lado derecho del slide sirve para identificar las muestras en los geles de agarosa.

**Tabla 2.1** Reactivos utilizados en la reacción de PCR para los primers S35/S36.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl)/rxn</b>
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	6.2
Buffer	2
dNTPS	1
MgCl <sub>2</sub>	2.8
Primer: S35	1
Primer: S36	1
Taq	2
<b>Volumen total</b>	<b>16</b>
ADN	4
<b>Volumen reacción</b>	<b>20</b>

**Tabla 2.2** Programa de amplificación usado para los primers específicos S35/S36

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización Inicial 95°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización 95°C	1 minuto	35 ciclos
Alineamiento 50°C	30 segundos	35 ciclos
Extensión 72°C	30 segundos	35 ciclos
Extensión final 72°C	5 minutos	1 ciclo
12°C	∞	

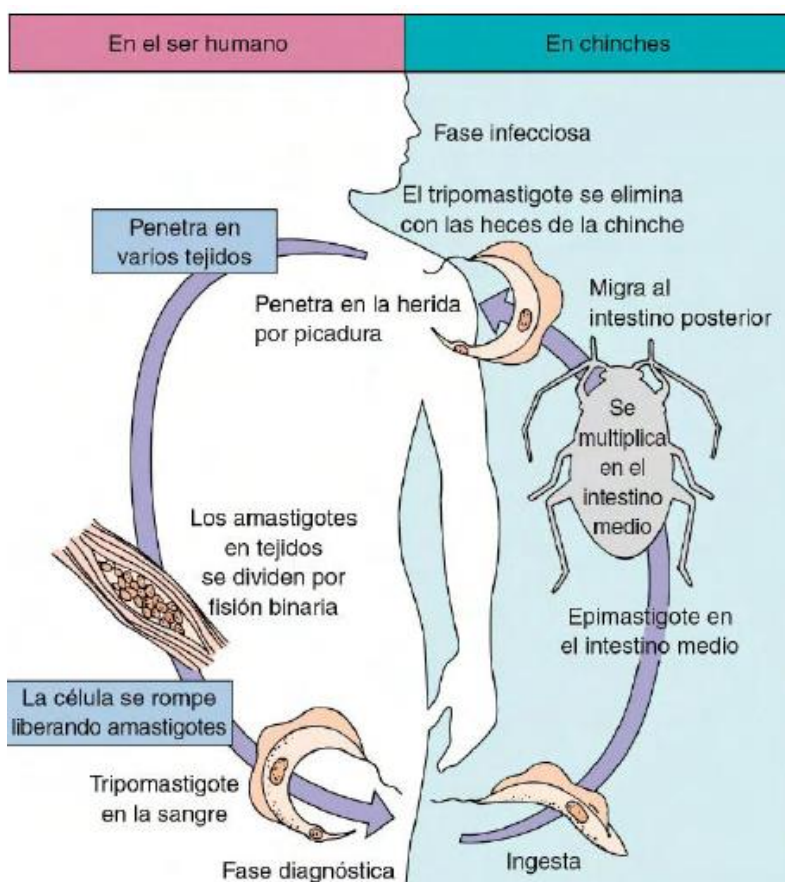
**Tabla 3.1** Reactivos utilizados en la reacción de PCR para los primers TCC/TC1/TC2.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl) /rxn</b>
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	0.6
Buffer	2
dNTPS	1
MgCl <sub>2</sub>	1.4
Primer: TCC	1
Primer: TC1	1
Primer: TC2	1
Taq	1
<b>Volumen total</b>	<b>9</b>
ADN	1
<b>Volumen reacción</b>	<b>10</b>

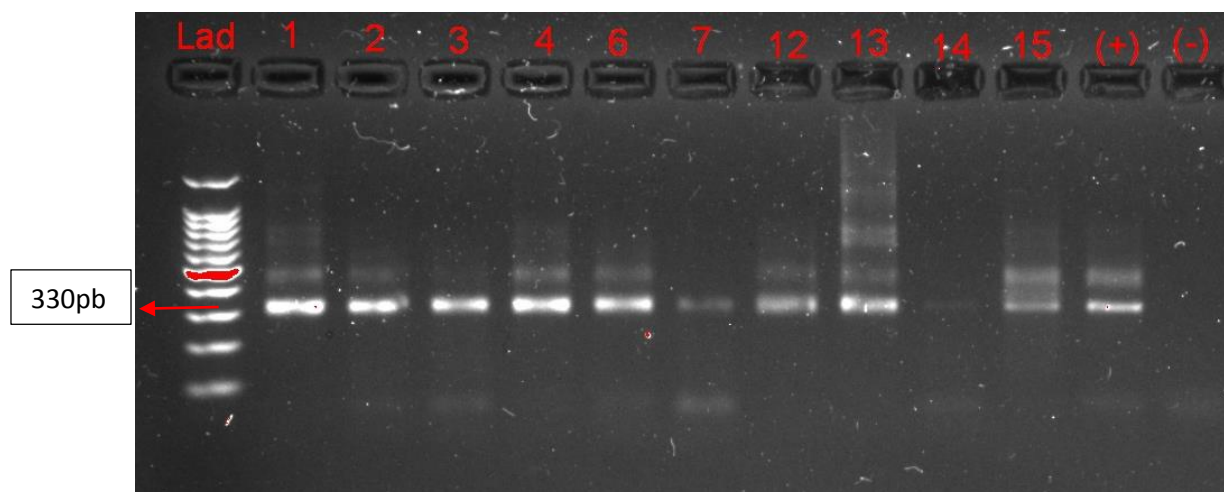
**Tabla 3.2** Programa de amplificación usado para los primers específicos TCC/TC1/TC2

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización Inicial 95°C	5 minutos	1 ciclo
Desnaturalización 95°C	1 minuto	30 ciclos
Alineamiento 60°C	1 minuto	30 ciclos
Extensión 72°C	1 minuto	30 ciclos
Extensión final 72°C	5 minutos	1 ciclo
12°C	∞	

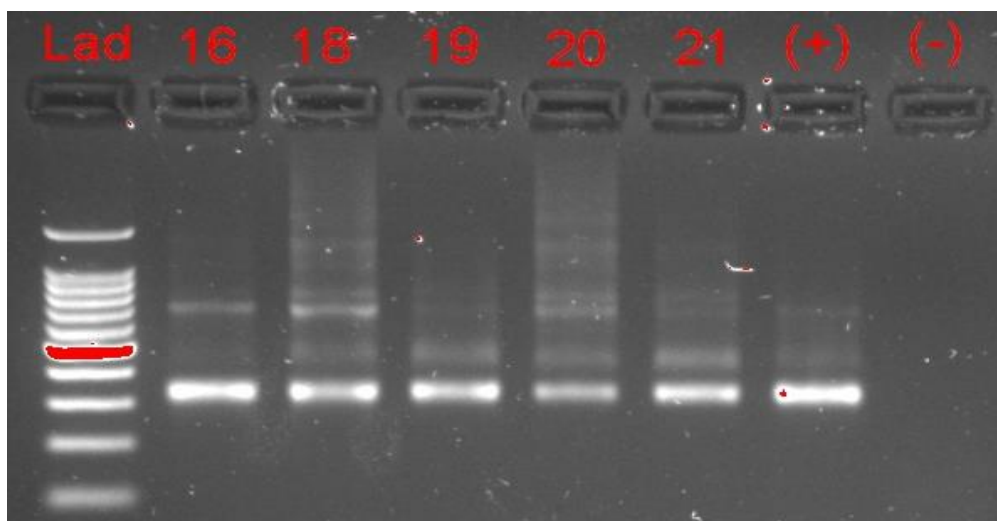
## FIGURAS



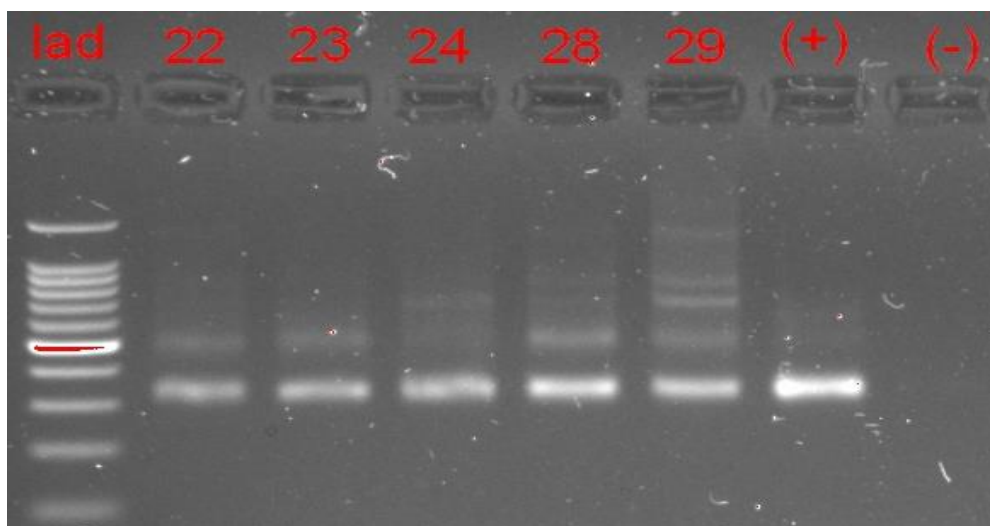
**Figura 1.** Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi* (obtenido de Murray 7<sup>ma</sup> edición)



**Figura 1.1** Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escala de ADN. Carril 1 al 15: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.

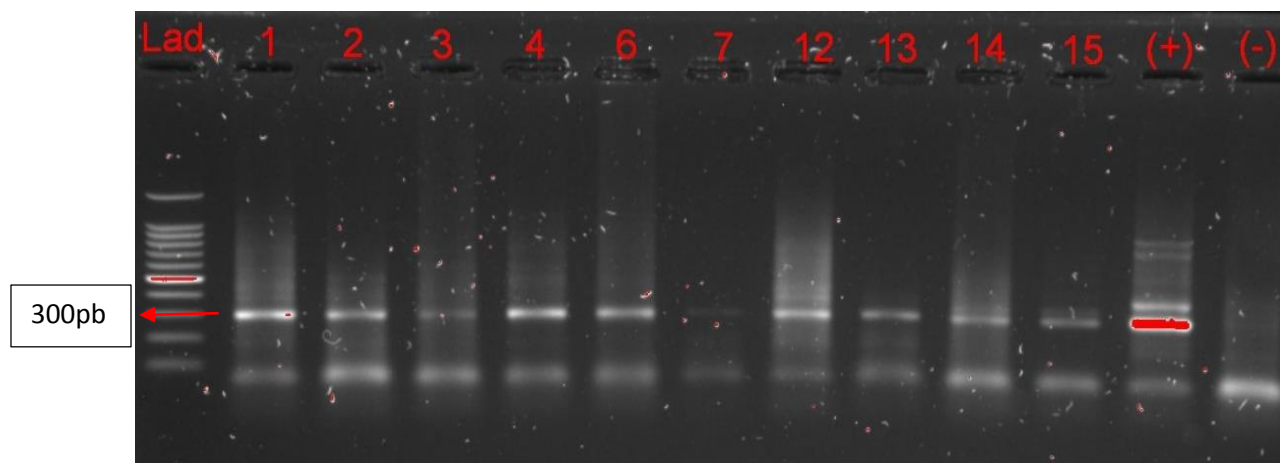


**Figura 1.2** Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escalera de ADN. Carril 16 al 21: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.

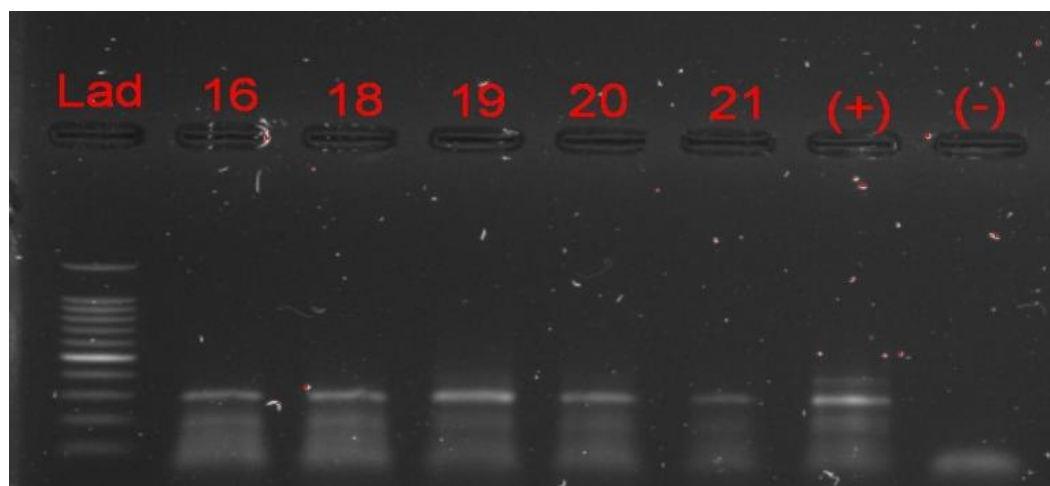


**Figura 1.3** Amplificación de los primers S35/S36. Lad: escalera de ADN. Carril 22 al 29: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.

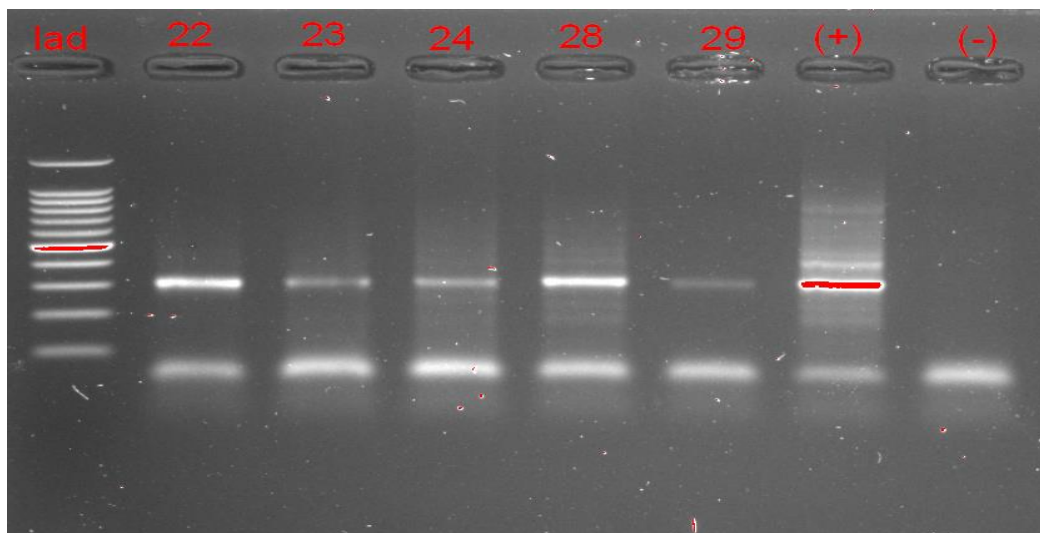




**Figura 2.1** Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 1 al 15: muestras. Carril (+): control positivo. Carril (-): control negativo



**Figura 2.2** Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 16 al 21: muestras. Carril (+): control positivo. Carril (-): control negativo



**Figura 2.3** Amplificación de los primers TCC/TC1/TC2. Lad: escalera de ADN. Carril 22 al 29: muestras. Carril (+): Control positivo. Carril (-): Control negativo.

## ANEXOS

CTCCTTCATGTTTGTGTCGTCGCTGCCCTTGTCTGCGCAAGCACGGTGTCTGTCT  
 TGTCCGTCTCGCTGCTTTGTGTTCTCGCACTCCACCGCGTGTTTTACGGCGTTGCCT  
 GCGTTTTTTGGTGTTTTTCTGCTTTTTTCCCGTCTTTTGGCTCCTCGCACTGAACCG  
 CCTGACACACCGCTCCGCACGCATTAGTCGCGTGTGTTCCGCCCCCGACACTTTC  
 TGTGGCGCTGAT

**Anexo 1.** Secuencia obtenida a partir de la amplificación de los primers TCC/TC1/TC2 de la muestra O/15.

**Nucleotide Sequence (238 letters)**

RID [H64B15YU015](#) (Expires on 04-18 12:30 pm)

Query ID [Icl|Query\\_135077](#) Database Name [nr](#)  
 Description [None](#) Description [Nucleotide collection \(nt\)](#)  
 Molecule type [nucleic acid](#) Program [BLASTN 2.3.1+](#) [Citation](#)  
 Query Length [238](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

**Graphic Summary**

**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trypanosoma cruzi strain Cepa2 spliced leader mini-exon repeat region</a>	429	429	100%	1e-116	99%	<a href="#">EJ463160.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trypanosoma cruzi strain Mg9 C spliced leader mini-exon repeat region</a>	429	429	100%	1e-116	99%	<a href="#">EU626738.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trypanosoma cruzi isolate M16cl4 mini-exon spliced leader intergenic region genomic sequence</a>	427	427	100%	4e-116	99%	<a href="#">JQ581492.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Trypanosoma cruzi isolate 11541 mini-exon spliced leader intergenic region genomic sequence</a>	425	425	100%	2e-115	99%	<a href="#">JQ581484.1</a>

**Anexo 2.** Captura de pantalla del Blast realizado para la secuencia O/15.

M7: Sequence Data Explorer

Conserved: 292/300      Data

**Anexo 3.** Variabilidad de nucleótidos encontrada en las 5 secuencias de ADN obtenidas a partir de los primers TCC/TC1/TC2.