

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO CIGEN**

**KIT DE DIAGNOSTICO PARA LA ENFERMEDAD DEL  
CHAGAS  
ESTUDIO DE PRE-FACTIBILIDAD  
INFORME FINAL**

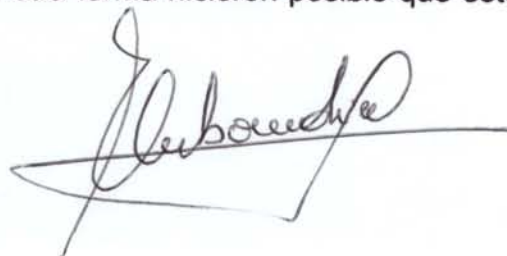
Presentado Por:  
Prof. Michel Dubourdieu

Mérida, Julio 2000

## AGRADECIMIENTOS

Una vez culminadas todas las etapas propuestas para obtener este estudio de factibilidad sobre nuestro proyecto titulado "*Desarrollo de un Kit de diagnóstico para la enfermedad de chagas*", nos es necesario agradecer a todas y cada una de las personas involucradas que hicieron posible el éxito del mismo.

- ❖ A **Cordiplan** y en especial a la **Dra. Beatriz Barrios**, Directora de política y programación de Cooperación Técnica Internacional, por haber creído en la importancia de nuestra propuesta y darnos todo su apoyo en la búsqueda de los recursos para realizarla.
- ❖ A la gente del **FONDO PEREZ GUERRERO** coordinado por el **PNUD**, por haber creído y confiado en la importancia del desarrollo de este estudio y habernos aportado los recursos económicos necesarios para realizar todas y cada una de estas etapas.
- ❖ Al **Sr. Ricardo Tichauer** y la **Sra. Maria Gabriela Briceño**, por su valiosa guía, colaboración y cumplimiento en el manejo de los fondos aportados por dicho fondo.
- ❖ A **Juan Luis**, quien sin su creatividad, conocimiento, experiencia y optimismo no hubiera sido posible llegar a donde estamos.
- ❖ Al personal de laboratorio **Juanita, Hector y David**, que con su constancia y dedicación dieron todo de si para obtener los mejores resultados para la ejecución de este informe.
- ❖ A mi querido colega y amigo **Dr. Jorge Zavala**, del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Naguchi" de la Univ. Autónoma de Yucatán – Laboratorio de Biología celular, ubicado en México por su valioso aporte y colaboración.
- ❖ A la gente de la fundación **Oswaldo Cruz**, especialmente al **Dr. Ricardo Ribeiro**, quienes nos abrieron sus puertas para la prueba de nuestros antígenos, sin ningún celo profesional.
- ❖ A La gente de **GESPROIN**, c.a. por su guía administrativa y logística para que todo se diera en los tiempos estipulados y con la mejor administración de los recursos aportados.
- ❖ Y en general a todos aquellos que de una u otra forma hicieron posible que este proceso culminara exitosamente.



## INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en toda América Latina y afecta cercas de 15-20 millones de personas según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Es una enfermedad insidiosa (pasa desapercibida en la mayoría de los casos), lo que crea un problema muy serio tanto para el enfermo (normalmente la enfermedad es detectada demasiado tarde), como para los bancos de sangre, no solo en América Latina sino también en los países receptores de esa sangre. Actualmente, no existe ni quimioterapia eficiente ni diagnóstico confiable para esa enfermedad. Por lo tanto no se puede seguir fácilmente la evolución de la enfermedad en los pacientes tratados por las drogas comerciales, hecho particularmente grave, cuando se sabe que las drogas utilizadas son por lo generalmente muy tóxicas con fuertes efectos colaterales.

En la actualidad, una persona sospechosa de tener la enfermedad tiene que someterse a diversas pruebas de rutina para el despistaje de la enfermedad de Chagas, las más comúnmente usadas: (a) electrocardiogramas (en muchos casos pruebas de cateterismo), (b) xenodiagnóstico (utilización del insecto vector criado en laboratorio), (c) serodiagnóstico (inmunofluorescencia indirecta, ELISA, hemoaglutinación y fijación de complemento), y (d) hemocultivos. Sin embargo, la mayoría de estos ensayos tienen serias limitaciones debido a la falta de especificidad y de sensibilidad de las pruebas utilizadas. Por lo tanto se multiplica el número de ensayos obtenidos y a menudo se obtienen resultados antagónicos entre laboratorios especializados. La mayoría de estas pruebas no son rutinarias para un laboratorio común. Esto hace muy difícil tomar una decisión para iniciar o continuar una quimioterapia. La falta de diagnóstico confiable hace que algunos bancos de sangre prefieran tratar toda la sangre con drogas. Por otra parte estos test resultan frecuentemente en falsos positivos y falsos negativos. Consecuentemente, la detección de anticuerpos específicos de *T. cruzi* en donantes de sangre es muy importante, pero debido a que en la mayoría si no en todos los casos las preparaciones de antígenos disponibles para los ensayos

serologicos representan una mezcla compleja de moléculas extraídas de los parásitos enteros o fracciones de parásitos.

La carencia de un diagnostico eficaz proviene de la falta de un antígeno específico, que este presente en todos los estadio morfológico y aislados e independiente del área geográfica del cual proviene.

En la pasada década, la tecnología del ADN recombinante ha sido usada para obtener antígenos específicos de *T. cruzi*, algunos de los cuales han sido usados para el diagnostico y potencialmente podrían resolver los problemas de especificidad, y pool de proteínas recombinantes podrían ayudar a incrementar la sensibilidad para propósitos de scrining. Aquí nosotros reportamos la identificación de dos nuevos antígenos recobinantes de *T. cruzi* como agentes específicos y sensibles para el seridiagnostico de infecciones de *T. cruzi*, lo cual podría potencialmente ser usado como componentes de antígenos-multiples-recombinantes para el desarrollo de un Kit de diagnostico y ser usado en el scrining efectivo en bancos de sangre y áreas rurales.

## **1. IDENTIFICACION.**

### **1.1. Título del proyecto**

Desarrollo de un Kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

### **1.2. Número del proyecto**

INT/98/K18/A/95/99

### **1.3. Fecha de realización actividades.**

Junio 1999 - Junio del 2000

### **1.4. Lugar**

Mérida (Venezuela) – México (México) – San salvador (Brasil)

## **2. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.**

Para cumplir con el desarrollo del prototipo del kit de diagnóstico era necesario realizar el estudio de pre-factibilidad técnico, económico y de mercado, donde se proponían las siguientes etapas, en un periodo de tiempo de 12 meses:

- ❖ Prueba del con el grupo Brasileño que ya tiene a su disposición y a la del proyecto mas de 100 sueros de diversos tipos, bien caracterizados.
- ❖ Cloneo de mas genes de proteínas de membrana de glicosoma a partir de anticuerpos existentes, en esa etapa se chequearán también un pool de 30 anticuerpos monoclonales que reconocen de *T. cruzi* (Brasil puede eventualmente ayudar al cloneo de las proteínas glicosómicas).
- ❖ Evaluación de los diferentes antígenos a disposición (provenientes de Venezuela, España y Brasil) y su comparación a fin de escoger los que presentan mayor sensibilidad y especificidad. La evaluación de estos antígenos se realizará por ELISA, con sueros de origen muy variable

utilizando sueros controles de pacientes sanos, con artritis reumatisal, lupus, malaria y leishmaniasis y utilizando también ratones infectados por una docena de cepas de referencia diferentes.

- ❖ Estudio de la respuesta inmune inducida por los antígenos más prometedores y su evaluación en cuanto a su capacidad de producir protección.
- ❖ Secuenciamiento y sobre-expresión de los genes clonados en vectores apropiados.

La innovación esencial de nuestra proposición es el origen de algunos de los antígenos a ser utilizados y el hecho de proponer una mezcla de antígenos caracterizados individualmente por su especificidad y antigenicidad. Se espera por lo tanto:

- La especificidad de nuestros antígenos, ya que el glicosoma es una organela únicamente encontrada en los kinetoplastidae. Las proteínas de membranas plasmáticas suelen ser comunes a diversos organismos, explicando los falsos positivos por los métodos clásicos. Estos antígenos ya han permitido la detección de falso positivo entre pacientes declarados Chagásicos crónicos por medios convencionales.
- La “universalidad” esperada del kit, lo cual es una condición para la comercialización. En efecto, el glicosoma es absolutamente necesario para la vida del parásito, los antígenos provenientes del glicosoma están presentes en todos los estadios del parásito y tenemos evidencias que deberían estar presentes independientemente del aislado y de su procedencia. Mientras que los antígenos hasta ahora en uso presentan reacciones que varían con el origen.
- La sensibilidad, es decir que nuestros antígenos detectan todos los verdaderos positivos, lo que no es el caso de la mayoría de los antígenos usados actualmente.

La fase de desarrollo se ocupará también de producir antígenos estables para garantizar la reproducibilidad del diagnóstico en cualquier condición de utilización.

Todos esos factores harán que el kit desarrollado constituya un avance muy significativo en el diagnóstico de esa enfermedad tan común en nuestro continente.

El producto del desarrollo propuesto podría ser optimizado en el futuro.

### **3. ANTECEDENTES.**

Aunque ya desde el siglo XVI se tenían referencias sobre la peligrosidad de la vinchuca, solo durante el primer cuarto de este siglo se pudo apreciar su participación en la enfermedad de Chagas-Mazza.

En el año 1909, el médico brasileño Carlos Chagas -especialista en enfermedades infecciosas- descubrió que la vinchuca transporta un parásito unicelular al que le dio el nombre de *Trypanosoma cruzi*. La genialidad de Chagas le permitió realizar un triple descubrimiento, a partir de esa información: (a) una enfermedad, (b) su agente causal y (c) su transmisor. Es tal vez el único caso conocido en la historia de la medicina en que un investigador tiene esa triple satisfacción y honor.

En ocasión de estar estudiando las enfermedades palúdicas en la zona de Lassance (estado de Minas Gerais, Brasil), el Dr. Chagas encontró una cantidad de enfermos que presentaban una sintomatología distinta de la que tenían cualquiera de las afecciones conocidas en ese entonces. Cuidadas observaciones le permitieron concluir que se hallaba ante una dolencia que tenía características propias y que constituía una enfermedad. Mas tarde, se la llamo "enfermedad de Chagas". La descripción exhaustiva de sus diversos aspectos clínicos, sobre todo los de la etapa aguda, como así también los efectos que ocasiona sobre los distintos órganos de los individuos, son el punto de partida del conocimiento científico de esta enfermedad. Posteriormente, el Dr. Chagas descubrió el agente causal de la afección: un parásito unicelular microscópico al que denominó "*Trypanosoma cruzi*". Lo pudo estudiar a través de su ciclo evolutivo y valoró el papel que desempeña la vinchuca como agente transmisor.

Mas tarde, en la Argentina, el Dr. Salvador Mazza realizó el estudio de la enfermedad en un gran número de pacientes. Sus observaciones fueron de

tanta trascendencia de que a esta enfermedad se la denomina, precisamente, de Chagas-Mazza.

Por el número de enfermos y la amplitud del área que abarca, por la gravedad de las alteraciones cardíacas y de otros tipos que ocasiona y por su carácter endémico, la enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de la salud pública en todos los países de Latinoamérica.

Las condiciones de vida y la pobreza en general son las dos condiciones que pueden resumir perfectamente el porqué del mal de Chagas, una enfermedad que exige respuestas no solamente de índole científica, sino - fundamentalmente- de orden social.

Los alcances de esta enfermedad se pueden comprender fácilmente a través de sus cifras: afecta aproximadamente a 22 millones de latinoamericanos, debido a las condiciones en que vive la población, donde anualmente nacen trescientos mil niños con enormes chances de contraer esta enfermedad.

La pobreza, la mala calidad de vida de los sectores de menores recursos, la falta de educación sanitaria y la estructura de los ranchos -que facilita la proliferación de la vinchuca, insecto transmisor del mal- favorecen la propagación del *Trypanozoma cruzi*, un parásito que tiene especial predilección por las fibras del músculo cardíaco y que ocasiona serios trastornos en el corazón.

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una de las parasitosis más frecuentes en Latinoamérica y tercera a nivel mundial, después de la malaria y la leishmaniasis. Por sus consecuencias sobre la salud y sus repercusiones socio-económicas constituye uno de los flagelos mayores del continente americano.

El área donde la afección es endémica se extiende desde el Río Grande al norte del continente americano hasta el paralelo 40 al sur, o sea, desde Illinois, (Estados Unidos), hasta Curicó, (Chile) y Chubut, (Argentina).

Casi 90 millones de personas, es decir el 25 por ciento de la población total, se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, de los cuales



unos 22 millones están infectados (son seropositivos) y el 34 por ciento de éstos (alrededor de 5 millones) se hallan clínicamente enfermos.

Los investigadores saben desde 1930 que tanto el agente transmisor (la cucaracha voladora) como el *Trypanosoma* existen en el sur de los Estados Unidos pero allí sólo son "parasitados" los animales porque las mejores condiciones de vida impiden su propagación al ser humano.

Sin embargo, recientemente han aparecido enfermos de Chagas también en los Estados Unidos, la mayoría de ellos son inmigrantes latinoamericanos, si bien hubo algunos casos nativos debido a transfusiones de sangre contaminada.

Primitivamente el parásito atacaba sólo a especies silvestres de mamíferos pequeños y medianos. Pero las malas condiciones de vida han allanado el camino para que este intruso desagradable "haga nido" también dentro del cuerpo de las personas.

El *Trypanosoma cruzi* es transmitido al hombre por cuatro vías posibles:

1. La congénita, de madre a feto a través de la placenta, produciéndose el contagio luego del quinto mes de embarazo. Su frecuencia se hallaría alrededor del uno por ciento de los nacidos de madre chagásica. La contaminación a través de la leche materna, si bien teóricamente posible, es extremadamente rara.
2. Por la vía de las transfusiones, que constituye la forma más frecuente de transmisión en las ciudades. Los movimientos migratorios de las zonas rurales hacia las urbanas que se produjeron a partir de la década de 1940 en América latina como consecuencia de la industrialización, cambiaron los patrones epidemiológicos tradicionales de la Enfermedad de Chagas transformándola de un problema exclusivamente rural a una infección susceptible de ser adquirida en las ciudades por medio de la transfusión sanguínea. Esta última, como ya se ha señalado, también ha extendido recientemente la enfermedad al norte del Río Grande (Estados Unidos y Canadá).

La importancia de este problema va creciendo y el porcentaje de sangre infectada existente en bancos de sangre en los que se realizaron

muestreos varía ampliamente, por ejemplo, del 2,9 por ciento en Sao Paulo, Brasil (1982) al 63 por ciento en Santa Cruz, Bolivia (1983).

3. Factores casuales, tales como el contagio de los laboratoristas o investigadores por ingestión accidental del parásito. No tienen ninguna importancia epidemiológica por su escasa frecuencia.
4. La vía más importante, producida por una cucaracha voladora llamada "Vinchuca" en la Argentina, "Barbeiro, Chupao, Chupanca o Bicudo" en Brasil, "Chirimacha" en Perú, "Chinchorro" en Ecuador, "Cone Nose Bug o Kissing Bug" en los Estados Unidos, "Chipo, Chipito, Chincha, Bandola, andolín o Quipito" en Venezuela y otros países del norte de Sudamérica.

Los porcentajes demuestran que la prevalencia de la infección chagásica es mucho mayor que la de la hepatitis o del virus HIV en los bancos de sangre. En Santiago de Chile, por ejemplo, la presencia del virus de la hepatitis es diez veces menor y la del virus HIV cuatrocientas veces menor que la del *Tripanosoma cruzi*.

La detección de la sangre infectada por *Tripanosoma* es obligatoria por ley únicamente en Argentina, Brasil, Honduras, Uruguay y Venezuela.

Actualmente existen algunos antígenos de alta especificidad y sensibilidad, es decir, altamente confiables, para detectar el parásito en la sangre.

Es indispensable que los administradores de la salud y la población tomen conciencia de la necesidad imperiosa de realizar el control de los bancos de sangre, implantando su obligatoriedad donde no exista, así como haciendo cumplir estrictamente la ley, donde exista.

Las vinchucas anidan, sobre todo, en:

- Los techos de paja y barro de las viviendas
- Los techos de hojas de plantas -según las zonas- de las casas rurales (llamadas ranchos)
- En las paredes resquebrajadas
- Sobre los armarios y objetos colgantes donde no se limpia con frecuencia.

- En estos lugares están protegidas de la intemperie y de sus enemigos naturales y hallan las condiciones necesarias para su óptimo desarrollo.

Los animales domésticos también son susceptibles de contagio, constituyéndose así en reservorios de la enfermedad.

De noche las vinchucas bajan por las paredes o, frecuentemente, se dejan caer desde el techo sobre sus víctimas, atacando con preferencia las partes descubiertas: rostro y extremidades. Pican introduciendo sus estiletes bajo la piel de la víctima, la que no siente nada debido a la presencia de sustancias analgésicas y anticoagulantes en la saliva y chupan su sangre durante unos veinte minutos, con lo cual quedan "llenas".

Luego de la ingestión y debido a otra característica biológica, que es la necesidad imperiosa de evacuar el intestino inmediatamente después de haberse alimentado, la vinchuca gira 180 grados y defeca.

La picadura forma una roncha que produce picazón al sujeto picado, el que automáticamente se rasca. Con ello pone la materia fecal del insecto en contacto con la lesión del rascado, permitiendo así la entrada del tripanosoma en el organismo humano, las formas infecciosas para los humanos salen del insecto a través de sus heces, de las heces depositadas sobre la piel de la persona dormida el tripanosoma pasa al interior del organismo "gracias" al rascado.

Debido a la gran movilidad dada por su flagelo, el parásito penetra activamente los tegumentos, ganando los espacios intercelulares, la grasa del tejido celular subcutáneo y los vasos sanguíneos y linfáticos, utilizados como "autopistas de acceso rápido" a través de las cuales pasa a colonizar distintos órganos, teniendo preferencia por los que son huecos.

Al llegar a un órgano determinado el parásito se introduce en una célula y la utiliza como lugar de reproducción. Dentro de ella construye nidos de formas inmaduras llamadas leishmanias, que inicialmente son redondeadas, pero que avanzada la madurez se vuelven más delgadas y desarrollan el flagelo que las hace muy ágiles.

Los tripomastigotes emigran nuevamente a través del torrente circulatorio, asentándose en sus lugares predilectos: los ganglios del sistema nervioso, sobre todo los ubicados en el tubo digestivo y en el miocardio, donde recomienzan su ciclo reproductivo.

Los pasos fundamentales en la prevención son:

- Controlar al insecto transmisor, vector obligado en la casi totalidad de los casos.
- Evitar las transfusiones de sangre proveniente de personas contagiadas.
- Tratamiento precoz de los hijos de madres chagásicas infectados a través de la transmisión congénita del parásito.

Estas tres medidas son el trípode sobre el que debe apoyarse una acción coherente, la que, de ser llevada a cabo en forma intensa y persistente, podría prácticamente eliminar la enfermedad de Chagas en el curso de una generación.

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

Para la enfermedad de Chagas, problema de salud pública en toda América Latina, no existe actualmente diagnóstico confiable debido a la falta de un antígeno específico presente en todos los aislados de *T. cruzi* (agente etiológico) independientemente del área de origen.

Nuestro Laboratorio ha evidenciado nuevos antígenos provenientes de la membrana del glicosoma de *T. cruzi*, los cuales resultaron altamente específicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Hasta ahora, estos antígenos no han dado reacción cruzada con ninguna de las enfermedades parasitarias que normalmente producen los "falsos positivos".

Para utilizar estos antígenos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se necesita clonar los genes correspondientes y realizar pruebas inmunológicas con cepas de *T. cruzi* provenientes de otras zonas.

## **5. OBJETIVOS.**

Desarrollar los estudios de pre-factibilidad técnica, de mercado y económicos con el objeto de determinar si la propuesta elevada por este laboratorio de producir un nuevo kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas que sea comercialmente atractivo por ser altamente específico, sensible y que se pueda utilizar sin equipamiento sofisticado, es viable en las condiciones actuales de mercado y evolución de los mismos.

### **5.1. Objetivos específicos:**

- Realizar el estudio de pre-factibilidad técnica (Venezuela – Brasil).
- Realizar el estudio de pre-factibilidad de mercado (Venezuela – México).
- Realizar el estudio de pre-factibilidad económica (Venezuela).

## **6. ESTUDIO DE MERCADO.**

### **6.1. DESCRIPCION DEL PRODUCTO**

Como el producto que nos merece este estudio es un kit de diagnóstico para la enfermedad de chagas, se realizó un trabajo de campo en los tres países seleccionados para ello como fueron Brasil, Venezuela y México en sus regiones mas endémicas, con el objeto de detectar la efectividad y especificidad de los kits utilizados en la actualidad para la detección y control del mal y costos de los mismos para poder comprobar así la efectividad de la propuesta elaborada en este proyecto.

### **6.2. ANÁLISIS HISTORICO**

Algunos datos de interés sobre la enfermedad de Chagas. Estadísticas.

## → Latinoamerica.

El mal de Chagas es una enfermedad que azota a Latinoamérica. La infección con el agente causal, *Trypanosoma cruzi*, ocurre generalmente en la niñez o un poco después. Antes de las recientes campañas de control, la Organización Mundial de la Salud efectuó estimaciones de la prevalencia de la enfermedad. Estas estimaciones arrojaron datos de una prevalencia global en Latinoamérica de 24,7 millones de casos y de 830.000 nuevas infecciones anuales (1987) .

En Salta (Argentina) entre 1500 y 2000 chicos menores de 5 años están infectados constituyendo un gran problema. Estas cifras indican que en Latinoamérica la morbilidad de gran parte de enfermedades infecciosas transmisibles han sufrido aumentos considerables en los últimos años, los cuales han tendido a eliminar algunos progresos alcanzados en las décadas del 50 y del 60, discontinuando la tendencia histórica hacia su declinación.

Los profundos cambios económicos y sociales en las ultimas cuatro décadas ha estimulado una migración de zonas rurales ha urbanas, con mas del 60% de la población vive en centros urbanos. Se ha estimado que ha causa de la migración, mas de 300.000 personas infectadas viven hoy en la ciudad de San Paulo y mas de 200.000 en Río de Janeiro y en Buenos Aires. En suma, los pacientes Chagásicos están migrando al norte (USA) llegando a 100.000 individuos infectados, provenientes de México y América Central.

El impacto medico y social de la enfermedad de Chagas es alto. Llegando ha estimar en la pérdida de 752.000 horas/hombre (por muertes prematuras y morbilidad causada por la enfermedad) en los países de Sur América, correspondiendo económicamente en perdidas de 1208.5 US\$ millones /año. Como ejemplo , solo en Brasil, se considera que el 10% de las personas infectadas que desarrollan el estado crónico de la enfermedad acarrear un gasto medico y tratamiento obligatorio que puede llegar a US\$ 250.000. Similarmente , debido al ausentismo al trabajo debido a la morbilidad que produce la enfermedad representa un costo de US \$ 5.625,00 por año.

## → Venezuela.

La población total estimada para 1998 es de 23.242.000 de habitantes. El 86,6% vive en áreas urbanas de 50.000 habitantes y más. A pesar de la creciente importancia de las enfermedades crónicas no transmisibles, las enfermedades transmisibles siguen siendo importantes causa de mortalidad en Venezuela, especialmente en los grupos humanos en peores condiciones de vida. Las infecciones respiratorias agudas, en particular las neumonías, están entre las 10 primeras causas de defunción para todos los grupos de edad, y la enfermedad de Chagas está entre las 10 primeras para las edades de 45 años y más. La malaria es endémica y también la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis, la esquistosomiasis, la lepra y la oncocercosis.

La técnica Dot-ELISA, que usan para diagnosticar la enfermedad de Chagas (Departamento de Parasitología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela, 1988) usa dos preparaciones antigénicas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: 1) La fracción citoplasmática (antígeno citoplasmático) y 2) epimastigotes fijados con formalina (antígeno integral).

El cutoff para el antígeno citoplasmático es de 1:512 y 1-128 para el antígeno integral, con ambos antígenos se obtiene una sensibilidad del 100 % y una especificidad de 96%.

## → Argentina.

La República Argentina es un Estado Federal constituido por 23 provincias y una capital federal. La población de Argentina de acuerdo estimativas para 1998 es de 36.123.000 de habitantes. La enfermedad de Chagas sigue siendo la mayor endemia del país, aunque su prevalencia serológica está disminuyendo.

El mayor número de casos, en 1995, se presentó en la Provincia de Santa Fe (140 de un total de país de 229). La enfermedad afecta grandes zonas rurales y sub-urbanas debajo de los 3600 metros sobre el nivel del mar, afectando las provincias: Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan, San

Luis, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán. El riesgo de infección en áreas rurales (debajo de los 3600 msnm) abarca las provincias Buenos Aires, Corrientes, Chubut, Entre Ríos, Misiones, Neuquen, Río Negro.

Entre los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) que utilizan se encuentran: El día Kit-Chagas (Gador S.A.), que es usado para detectar anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* en los donantes de los bancos de sangre. El EIA consiste en un soporte de plástico sobre el cual reposa una tira de nitrocelulosa con una mezcla de antígenos recombinantes de *T. cruzi* :1, 2, antígeno de fase aguda, 13 y 30 han sido aplicados sobre una línea horizontal. Una línea horizontal de IgG humano es incluido para monitorear el proceso de test. Los resultados obtenidos con el EIA con sueros positivos por xenodiagnóstico muestran un 100% de concordancia, mientras al compararlo con otros dos tipos de test: hemaglutinación indirecta y inmunofluorescencia y ELISA, los resultados fueron 99.1% (347 de 350) y 99.6% (299 de 300), respectivamente.

Otro estudio con 20860 donantes de sangre evaluados con ensayos de hemaglutinación indirecta (IHA) y enzima inmunoensayo (EIA) (basados en una mezcla antigénica de *T. cruzi*). Un total de 576 muestras son reactivas para uno o ambos test (2.76%) y 391 de estos (1.87%) son confirmados positivos. El EIA es el de mayor sensibilidad (100% sensibilidad), mientras que 98 muestras (0.47%) son falsos negativos con el IHA (74.93% de sensibilidad). La especificidad para EIA fue de 99.3% y para IHA 99.8%.

Estos test (hemaglutinación indirecta, aglutinación directa, inmunofluorescencia y ensayos de aglutinación latex) envuelven una interpretación subjetiva de resultados y no están estandarizados para procesos automáticos requeridos para grandes laboratorios. El más apropiado para este fin es el de ELISA, basado en antígenos purificados de la membrana y el citoplasma del parásito. (este test no indica sensibilidad ni especificidad).

Con unos dos millones y medio de infectados, Argentina más que duplica el promedio latinoamericano de incidencia del letal mal de Chagas, y algunos culpan a las transfusiones de sangre.



Argentina, el país más rico del continente en términos per cápita, tiene entre un siete y un 8,6 por ciento de infectados con la "enfermedad de la pobreza" (las cifras varían según a quien se consulte).

Eso supera ampliamente el 3,4 por ciento de promedio para toda Latinoamérica, donde según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) hay unos 17 millones de infectados.

En 1997, Argentina logró, con la ayuda de la OPS, reducir en casi un 75 por ciento el nivel de infestación en hogares del norte, donde el mal es endémico, aunque el índice de incidencia de la enfermedad se mantiene.

Los porcentajes más altos se registraron en los bancos de sangre de las provincias de La Rioja (20 por ciento), Santiago del Estero (17 por ciento) y Chaco (16 por ciento), donde hay mucha pobreza y altas temperaturas, preferidas por el insecto.

→ **Belice.**

En un estudio realizado sobre tres poblaciones de Belice para determinar la prevalencia de *T. cruzi* se evaluaron 1) 962 muestras de donadores de un banco de sangre (Hospital de la Ciudad de Belice), obteniéndose 0.5% de muestras positivas ( $P < 0.001$ ), 2) 467 miembros del ejercito de las fueras de defensa de Belice, donde no se encontraron muestras positivas., y 3) una tercera población que incluía trabajadores y familias provenientes de países de América Central que viven en plantaciones de banano in un área rural de el país. 70 (6.1%) de 442 sueros fueron reactivos. La prevalencia fue de 5.3% de 75 < 15 años de edad, 4.2 %de 236 (entre 15 y 34 años de edad) y 9.7 % de 124 ( > de 35 años de edad) ( $P= 0.11$ ). La prevalencia en recién nacidos fue igual al encontrada en El Salvador (9 de 110, 8.2%), Guatemala (6 de 117, 5.1%), y Honduras (8 de 129. 6.2%).

Los test usados fue el EIA de antígeno simple (extracto de epimastigotes de *T. cruzi*) y el ensayo de radioinmunoensayo (RIPA).

→ **Bolivia.**

La enfermedad de Chagas es endémica de zonas rurales y sub-urbanas, debajo de los 3600 metros sobre el nivel del mar, con la mayor tasa de infección reportada para los departamentos de Cochabamba, Sucre, Tarija y Santa Cruz.

Un trabajo de epidemiología usando el test de Inmunofluorescencia por anticuerpos (IFAT) es usado para detectar anticuerpos IgG y IgM anti-*T. cruzi* en filtros de papel impregnados con sueros de 128 sujetos (73 femeninos, 55 hombres) de el departamento de Cochabamba. Resultando positivos el 12.5% (16/128): Mujeres, 15.2% (11/73); hombres, 9.1% (5/55).

→ **Brasil.**

Anualmente Brasil registra un millón de casos de malaria, 10 millones de esquistosomiasis y 4 millones del mal de Chagas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad de Chagas es el cuarto problema de salud más serio que enfrenta América latina, después de las enfermedades respiratorias, la diarrea y el SIDA. En todo el hemisferio, el mal afecta a 20 millones de personas y anualmente cobra 45.000 vidas.

Solamente en Brasil, donde afecta al cuatro por ciento de la población, el gasto médico para el tratamiento de los enfermos alcanza a los 250 millones de dólares cada año, de acuerdo con el estudio.

→ **Chile.**

De acuerdo a la información generada de el censo de 1992 y de un extensivo estudio epidemiológico en 7 áreas endémicas del norte de país: Total de la población en el país 13.348.401. Población en regiones endémicas 8.824.205 (urbana 8.050.700, rural 773.505). Numero de infectados 142.000 (16.7%).

Numero total de cardiopatías 26.554 (18.7%). En consideración al régimen de ayuda y atención médica (hospitalización, test de laboratorio e intervenciones quirúrgicas) y un mínimo precio en el valor

de los medicamentos, es posible estimar el costo de atención y tratamiento, en \$ U.S.A. , para cada paciente chagásico. Promedio de costo anual de cada paciente con cardiopatía chagásica U.S \$439.29 a 584.25. Si este valor es multiplicado por 26.554 , mencionado anteriormente, la cifra aumenta de \$ 11.644.906 a 15.514.474 \$ . Las regiones endémicas del norte y centro son: Tarapacá, Antofagasta, Atacama, Coquimbo, Valparaíso, Santiago y O'Higgins; pero la campaña nacional de fumigación realizada durante la pasada década ha reducido la tasa de infección casera entre un 80 y 95% de la tasa reportada para 1993.

Por razón para 1996 el país entero se decreto libre de la transmisión de la enfermedad por el insecto. La transmisión a través de las transfusiones de sangre esta bajo control gracias al fuerte screenig en los bancos de sangre.

La prevalencia de anticuerpos positivos en el banco de sangre de un Hospital General en Santiago es de 1.2% (1011 sujetos analizados entre 1994 y 1996). Las reacciones serológicas son confirmadas por ELISA y reacciones de inmunofluorescencia indirecta. Otro estudio realizado en 22 hospitales localizados en el mitad norte de Chile, involucro el análisis de 16841 donadores de sangre, resultando en un 2.7% de positividad, porcentaje que permite estimar en 126477 los potenciales donadores de sangre infectados en las áreas urbanas estudiadas. Esto demuestra que es necesario un fuerte control serológico y de forma rutinaria en las regiones endémicas del país, y además reforzar o adoptar las medidas de prevención.

#### → **Colombia.**

El factor de riesgo esta en el área rural debajo de 2500 metros sobre el nivel del mar y abarca los departamentos : Boyacá, Caquetá, Cesar, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Meta, Santander del Norte, Santander del Sur, Tolima, Valle de Cauca.

En un estudio donde realizan un muestreo en una población indígena, se recolectaron 454 muestras de sueros en papel de filtro para detectar anticuerpos por ELISA. *Trypanosoma cruzi* tuvo una prevalencia de 8.7%.

Se realizaron algunos contacto con la Fundación Valle del Lili en Colombia y obtuvimos la siguiente información: Acerca de la prueba para Chagas que realizan en la Fundación Valle del Lili: Aquí lo que hacemos es una prueba de tamizaje de anticuerpos básicamente para los donantes de sangre. Esto debido a que nuestra ciudad es cercana a la zona de la Costa Pacifica, donde proliferan este tipo de enfermedades tropicales. La prueba que utilizamos es un inmuno ensayo para la detección cualitativa de anticuerpos frente a *T. cruzi*. Para tal efecto se utilizan unas esferas recubiertas con el antígeno de *T. cruzi* y estas se incuban con los controles y sueros previamente diluidos , luego se hace un lavado y se coloca un conjugado de inmunoglobulina antihumana de cabra con peroxidasa de rábano, se incuba y luego se lava, finalmente se agrega un sustrato para evidenciar la reacción, se para con ácido sulfúrico y se lee con un espectrofotómetro. Esta técnica es de Abbott Chagas Antibody EIA (IgG).

La detección serológica de los anticuerpos es un ayuda para el diagnostico, sin embargo estos permanecen elevados de por vida y el problema de algunos ensayos es la especificidad. Es necesario correlacionar su significado con la historia clínica del paciente así como la epidemiología. Otras técnicas de diagnostico para esto son el serodiagnóstico o los cultivos de sangre para *T. cruzi* pero son técnicas dispendiosas y no se realizan sino a nivel de laboratorios de investigación , nosotros no las realizamos. Cualquier muestra que de positiva se repite y se envía el paciente a valoración por infectología.

#### → Ecuador.

El factor de riesgo esta en las zonas rurales de Ecuador. Siendo el mayor factor de riesgo las provincias costeras incluyendo áreas: Esmeraldas, Guayas, El Oro, Los Ríos y Manabi.

En un estudio realizado entre diciembre de 1992 y mayo de 1993 en el banco de Sangre Red Cros en Quito (zona no endémica), y analizadas por ELISA usando un extracto de epimastigotes de una cepa brasileña de *T. cruzi*, se obtuvo que de 162 muestras analizadas en Diciembre de 1992, 12.1, 13.9 y 74% son seropositivos, indeterminados y seronegativos, respectivamente. De 173 muestras tomadas en Mayo de

1993, 6.2%, 17.9% y 75.9% son seropositivos, indeterminados y seronegativos, respectivamente. Estos estudios indican que la necesidad de aumentar el screening en los bancos de sangre para reducir el riesgo de transmisión por transfusión de la enfermedad en áreas de países endémicos donde el vector no este presente.

Un screening de donantes de sangre en el banco de sangre de Quito mostró una baja incidencia de seropositividad (0.01% en 1994, 0.04% en 1995 y 0.02 en 1996) y en otros pequeños bancos de sangre (0.4% en 1994, 0.28% en 1995 y 0.13% en 1996) localizados en áreas consideradas endémicas . En 18 poblaciones indígenas autóctonas localizadas en la región Amazónica se encontró que de 1011 individuos examinados 61 (6.03%) resultados positivos. Una prevalencia de la infección de 4.8% fue encontrada en niños de 1-5 años. La prevalencia de la infección incremento con la edad, en adultos mayores de 50 años fue de 18.8% (1997).

#### → **Guatemala.**

El factor de riesgo esta en áreas rurales debajo de los 1500 msnm y abarca los departamentos: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Jutiapa, San Marcos, Santa Rosa, Zacapa.

Un estudio serologico realizado en tres comunidades de la municipalidad de Olopa, Departamento Chiquimula. Muestras de sangre de un total de 92 individuos son examinados por ELISA. La seropositividad se encontró entre un rango de 0% a 20.8% para las tres comunidades con una media de 15.1%.

#### → **Paraguay.**

La importancia de la enfermedad de Chagas en Salud Pública radica sobre todo en la cantidad de problemas cardiacos que produce en los enfermos crónicos.

En algunas regiones América, la enfermedad es la causa más frecuente de mio cardiopatías e incluso de muerte. De acuerdo al informe sobre el Desarrollo Mundial, dado a conocer por el Banco Mundial, la carga

de morbilidad que representa la enfermedad de Chagas sobre la población de las Américas, medida por el número de años de vida ajustados en función a la discapacidad, es superior a la carga que producen las otras enfermedades tropicales. Se calcula que por lo menos 16 a 18 millones de habitantes de zonas rurales y urbanas están infectados por *Trypanosoma cruzi*, en el continente Americano y por lo menos el 10 % de los mismos tendrán síntomas de la enfermedad, en la fase crónica . Según algunos autores la prevalencia para el mal de Chagas en el Paraguay estaría alrededor del 20 % de la población . Sin embargo estudios realizados en bancos de sangre, la seroprevalencia observada oscila entre 2,8 y 11,5 % .

Otros reporte indican que la enfermedad de Chagas en América tiene una prevalencia promedio del 7,6 %. En el Paraguay, la misma oscila entre el 11 % y más del 70 %, en distintas zonas geográficas. ), según distintos autores la prevalencia actual de la enfermedad de Chagas en el Paraguay oscila entre el 5 % y el 20 %. Sin embargo estudios realizados en bancos de sangre, la seroprevalencia observada oscila entre 2,8 y 11,5 % En el Departamento de Paraguarí, varios estudios muestran una prevalencia de aproximadamente 20 % y específicamente, en Guazú-Cuá, estudios anteriores encontraron un 32 %. Con el fin de hallar la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en una localidad rural, en enero de 1997, se obtuvieron muestras de sangre de 315 personas, de todas las edades y de 91 perros, de la localidad de Guazú-Cuá, del departamento de Paraguarí, resultando serológicamente positivos por Inmunofluorescencia indirecta para el mal de Chagas 17,1 % de los humanos y el 16,4 % de los caninos. Cabe resaltar la alta prevalencia del mal en menores de 15 años, constituyendo el 29,2 % del total de muestras positivas. En Paraguay no se realizan, en forma rutinaria, estudios serológicos para el mal de Chagas, por lo que debería adoptarse como medida previa para el ingreso a instituciones militares, en donde se realizan tareas que implican un esfuerzo físico. Datos de países vecinos, antes del establecimiento de la Iniciativa del Cono Sur, revelaban que en Uruguay la tasa estimada de infección era del 1,25%, en Brasil 4,3%, en Argentina 7,2%, en Chile 10,6% y en Bolivia 22,2%. Hoy en día, la mayoría de estos países ha logrado disminuir estas cifras a tal punto que en el año 1995 la prevalencia de infección en donantes de sangre fue en Argentina 4,9%, en Brasil 0,75%, en Chile 1,2% y en Uruguay

0,6% . Paraguay y Bolivia, a pesar de haber iniciado más recientemente los trabajos de control y prevención, demostraron también importantes progresos. En el Paraguay no existen referencias estadísticas completas que reflejen la situación real de la enfermedad y por otro lado, las campañas de fumigación y mejoramiento de viviendas tampoco han cubierto aún, de forma homogénea, a la totalidad del país.

→ **Uruguay.**

Uruguay ha sido el primer país de América Latina en lograr la interrupción de la transmisión del vector de la enfermedad. La ausencia de casos agudos y la situación seroepidemiológica certifican el freno de la propagación. De los 13 departamentos endémicos, 7 la han eliminado totalmente, mientras que en los restantes departamentos continúan las acciones tendientes a eliminar la infestación domiciliaria (en los que actualmente está por debajo del 1%).

→ **México.**

La escasa información que existe en México sobre la enfermedad de Chagas, así como la polémica sobre su importancia, sirvió de pauta al estudio de seroprevalencia contra *Trypanosoma cruzi* dentro de la Encuesta Nacional de Seroepidemiología (ENSE), representativa de la realidad nacional en cuanto a la prevalencia de las enfermedades o factores con impacto en la salud pública.

Desafortunadamente, para la investigación de la tripanosomiasis americana, que se distribuye en áreas rurales dispersas, la cobertura de la ENSE no fue óptima. Sin embargo, los resultados de la encuesta indican que la enfermedad de Chagas se presenta irregularmente en todo el territorio nacional y tiene una prevalencia de 1.6, 0.5 y 0.2 para las diferentes diluciones aplicadas en el análisis, aunque su importancia parece ser menor a las estimaciones calculadas por diversos autores. La ENSE permitió ratificar los focos de transmisión ya conocidos e identificar algunos nuevos en los estados de Hidalgo, Chiapas y Veracruz, así como detectar trabajadores migratorios infectados en las ciudades fronterizas de Baja California, situación que indica un riesgo para la transmisión por hemotransfusión en zonas aparentemente libres de la infección. El

74.5 por ciento de los seropositivos fueron menores de 39 años. Asimismo, haber detectado infección en niños menores de cuatro años sugiere que en algunos focos la transmisión natural aún es importante. La seroprevalencia, aunque mayor en los estratos bajos, también se detectó en individuos pertenecientes al nivel socioeconómico elevado, particularmente en aquellos que poseen casas de fin de semana en regiones tropicales.

Durante mucho tiempo se ha especulado sobre la importancia de esta enfermedad en México. Existe toda una gama de suposiciones al respecto: desde las que la consideran un padecimiento exótico y le niegan cualquier importancia, hasta las que la asumen como un importante problema de la salud pública mexicana,(5,6) e incluso aquellos que, basándose en las encuestas seroepidemiológicas realizadas en los últimos años, calculan que están infectados entre tres y cuatro millones de mexicanos.(3,7).

En México no existían antecedentes de encuestas seroepidemiológicas masivas como las llevadas a cabo en Argentina, Brasil y Venezuela, por lo que no se había establecido un título de corte para considerar infección en la población mexicana, según lo señalado por Camargo:(8) "el límite serológico cuantitativo entre individuos infectados y no, varía de acuerdo a la región, por lo que en los laboratorios locales deben realizarse estudios serológicos cuantitativos que delimiten las poblaciones chagásicas de las no chagásicas".

Por lo que se pudo determinar los siguientes datos históricos en nuestro trabajo de campo:

#### **CRECIMIENTO DE LA ENFERMEDAD.**

Se reportaron hasta 1990, 300 casos agudos

Se reportaron de 1990 a 1998, 174 casos crónicos

Se reportaron de 1991 a 1997, 79 decesos

#### **POBLACIÓN AFECTADA EN LOS ULTIMOS DIEZ AÑOS.**

1.6% de la población general

1.5% de los donadores de sangre

20% de la población residente en zonas endémicas



## **DIAGNOSTICOS CERTEROS Y EQUIVOCADOS EN LAS ACTUALES CONDICIONES.**

No determinado

Se pudo detectar en trabajos realizados en México que un grupo de campesinos, al igual que la detección de algunos individuos seropositivos en las principales ciudades de Baja California Norte (Tijuana, Mexicali, Ensenada y Tecate) permitió detectar a trabajadores infectados que emigran a esas ciudades, con frecuencia provenientes de la Mixteca oaxaqueña, de donde cada año salen más de 100 000 individuos y sólo 25 por ciento de ellos regresa a sus asentamientos de origen.

Este hallazgo parece ser un indicador del riesgo de transmisión de *T. cruzi* por hemotransfusión que existe en esa y otras zonas, ya que los bancos de sangre mexicanos hasta ahora no están obligados a la detección de hemodonadores chagásicos.

En general, 74.5 por ciento de los seropositivos fueron menores de 39 años, lo que se ubica dentro de lo esperado, ya que después de esta edad, los títulos que predominan son los altos (y que en este estudio se colocan como sinónimos de caso) y los chagásicos suelen morir en general alrededor de los 50 años.

Por otro lado, el grupo comprendido entre 1 y 4 años de habitantes de zonas rurales, también resultó seropositivo con relativa frecuencia (1.5%) a títulos de 1:8, lo que parece ser un indicador de que la transmisión natural, aunque aparentemente en baja escala, continúa ocurriendo en muchos asentamientos rurales.

### **6.3. USUARIOS**

El mercado previsto para el kit a desarrollar es:

- Epidemiología en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en toda Latinoamérica y despistaje sistemático en hospitales.

- Seguimiento de aquellas personas que están recibiendo o han recibido tratamiento quimioterapéutico.
- Vigilancia en bancos de sangre, no solo de Latino América sino también de Estados Unidos y otros países del Norte (debido a la migración y compra de sangre a Latino América). Ese mercado está todavía en una fase emergente. Sin embargo, existe una necesidad creciente como lo indica la práctica sistemática, en diversos países, de tratar la sangre donada con drogas antitripanosomales, por falta de un sistema de diagnóstico confiable.

La OMS ha hecho y sigue haciendo grandes esfuerzos para fomentar la producción de antígenos de alta relevancia con el fin de detectar la enfermedad de Chagas, ya que existe en esta organización la conciencia de las limitaciones de las técnicas serológicas actuales. Es sorprendente que, en la actualidad, un paciente chagásico tratado con drogas no pueda saber con seguridad si está curado.

#### **6.4. DEMANDA POTENCIAL**

Para determinar la demanda potencial se realizó un trabajo de campo tanto en Brasil, México como en Venezuela en las áreas más endémicas y con los Ministerios de Sanidad de los países involucrados.

De sus resultados podemos observar las siguientes estadísticas:

##### **6.4.1. UNIDADES DE SANGRE CAPTADAS POR AÑO**

	<b>MEXICO</b>	<b>VENEZUELA</b>
1997	936 .622	744.408
1998	1.000.000	827.120
2000 (estimación)	1.200.000	1.033.900

#### 6.4.2. NÚMERO DE USUARIOS POTENCIALES

	Bancos de sangre	Laboratorios	Pacientes
MEXICO	607	17	1.200.000
VENEZUELA	262	28	1.033.900

#### 6.4.3. NUMERO DE KITS CONSUMIDOS POR AÑO. (\*)

País / Zona	Kits/hospital	Kits/Lab.
VENEZUELA		
El vigía	2000	1
Mérida	65	3
Barinas	3036	7
Guanare	2767	1
Cojedes	32	
Lara	65	7
Portuguesa	816	3
Yaracuy	43	3
Aragua	70	3
Carabobo	180	24
Caracas	889	73
Maracaibo	300	13
Trujillo	33	
Tachira	43	

(\*) Encuestas levantadas directamente. Original en el laboratorio – Anexo No 1.

#### 6.4.4. CLIENTES POTENCIALES

Los clientes potenciales están marcados por los diferentes bancos de sangre (613 en México y 262 en Venezuela), laboratorios y clínicas ( 17 en México y 38 en Venezuela) existentes en los diferentes países analizados. (Ver anexo No 2).

#### **6.4.5. DEPARTAMENTO QUE TOMA LA DECISIÓN DE LA COMPRA.-**

En México los secretarios de salud, Instituto Nacional de referencia y diagnóstico epidemiológico, Centro Nacional de la Transfusión sanguínea, jefes de laboratorio en Institutos y Centros de Investigación.

En Venezuela están basados principalmente por la adquisición del Ministerio de Sanidad quien es el encargado a nivel Nacional de adquirirlos. En las clínicas privadas los dueños o departamento de compras de los mismos.

#### **6.5. OFERTA POTENCIAL.**

En el mercado Venezolano se han identificado 7 kits para el diagnóstico de la enfermedad de chagas, de los cuales 3 corresponden a pruebas tipo ELISA, 2 a pruebas rápidas tipo prueba de embarazo, 1 de hemaglutinación indirecta (HAI) y 1 por aglutinación con latex.

Para ahondar un poco sobre estos diferentes kits, podemos ver los diferentes informes realizados tanto en Brasil como en Venezuela al respecto de los mismos (Anexo 3), donde se describen las características, materiales suministrados por el kit, empresa que lo fabrica y/o distribuye, precios y alguna información adicional de utilidad para nuestra propuesta. Así mismo se puede encontrar en el Anexo No 1 los análisis realizados sobre los kits estudiados y el propuesto por nuestro proyecto.

En México se recabo la siguiente información sobre los kits de diagnóstico que utilizan para la detección del mal de Chagas.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>DISTRIBUIDORES</b>
CHAGAS EIA	ABBOT LABORATORIES
CHAGAS SERODIA	FUJIREBIO
CHAGAS HAI	INTERBIOL
CHAGAS ELISA	ORGANON
CHAGAS ELISA	SANOFI

CHAGAS LATEX  
CHAGAS ELISA  
CHAGATEST ELISA  
CHAGAS HAI  
CHAGAS ELISA-  
RECOMBINANTE

SANOFI  
TECNOSUMA  
WIENER LAB  
WIENER LAB  
WIENER LAB

COSTOS.- 45 – 400 USD

EFFECTIVIDAD DE DIAGNÓSTICO.- Se reporta una especificidad del 97-99%, Sensibilidad 98.2-100%, Efectividad 97.3%.

CONDICIONES DE PAGO.- Efectivo a la entrega.

PLAZOS DE ENTREGA.- 15-30 días

VÍA DE COMERCIALIZACIÓN.- Representantes y proveedores locales.

DESCUENTOS.- Ninguno

PRESENTACIONES.- 96, 100, y 192 determinaciones.

## **6.6. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACION.**

Una vez evaluadas las posibilidades de llevar a ejecución la propuesta realizada y después de conversaciones con los países socios, se llegó a la conclusión que después de cumplir con el periodo de prueba de estabilidad de los resultados (un año) se puede lograr efectivamente la producción del prototipo que saldría al mercado en mejores condiciones que cualquiera de los kits de diagnóstico estudiado en los tres países.

## **7. ESTUDIO DE PRE-FACTIBILIDAD TÉCNICA.**

Se podrán observar los resultados y análisis realizados de este estudio en el anexo No 4 del presente informe final.

## **8. ESTUDIO DE PRE-FACTIBILIDAD ECONOMICA.**

Para este estudio se realizaron las actividades inherentes a determinar los costos de producción del kit en laboratorio, ya que su procesamiento a nivel industrial quedo acordado con los socios de Brasil, quienes se encargaran de la producción a nivel industrial una vez finalizado el proceso de pruebas y verificaciones.

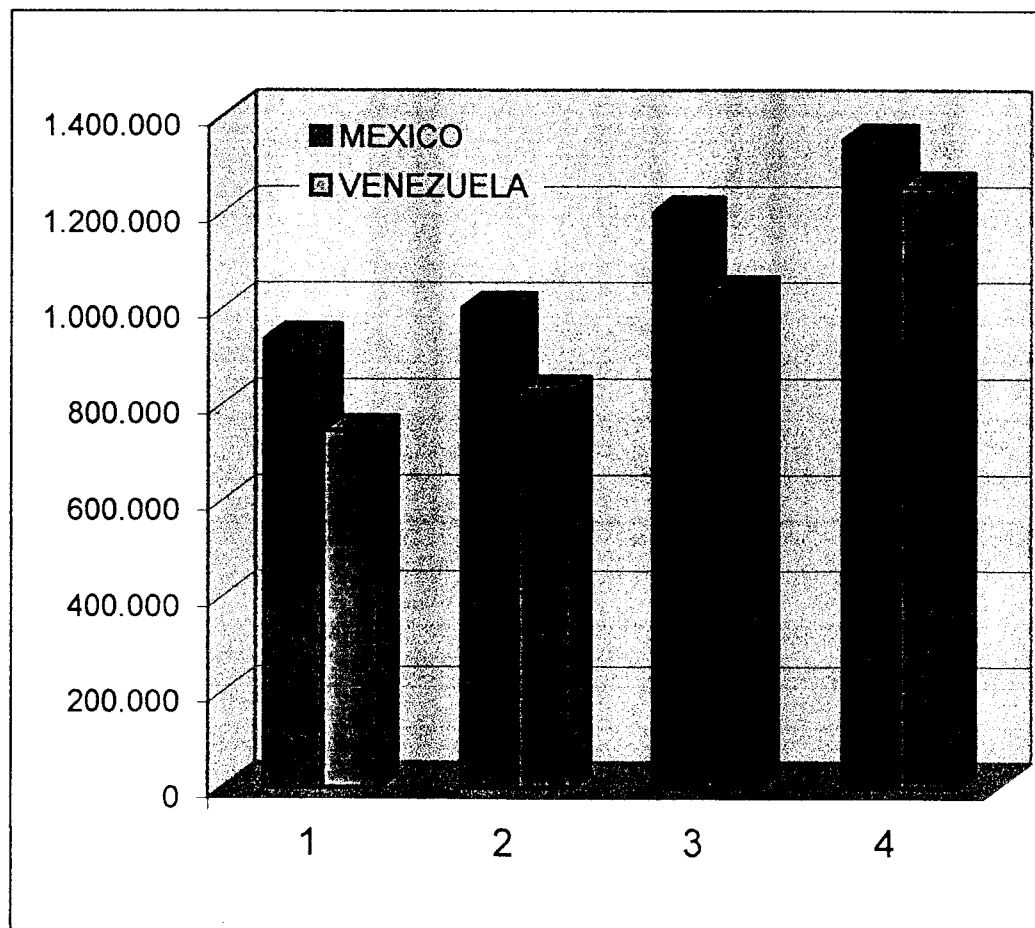
Se realizó un estudio tentativo de inversión en maquinarias y equipos para la producción, el cual asumirá el Instituto de Brasil una vez se dé comienzo a la implementación.

Se pudo igualmente obtener el acuerdo de comercialización para los tres países, teniendo en cuenta la acogida que tubo la propuesta en México (como se puede apreciar en el cuadro No 1), se acordó que una vez concluidas las pruebas de estabilidad y almacenamiento que requieren de una año mas de pruebas se procederá a la industrialización del prototipo ya que este presenta una serie de ventajas frente a sus competidores existentes actualmente en el mercado, como se demuestra en el anexo Nro. 1 con los resultados del estudio de mercado.

Igualmente en el cuadro No 2 podemos apreciar los costos de producción del kit actualmente en laboratorio, pero que al ser producido en cantidades y a nivel industrial se pueden optimizar los costos, de acuerdo a las investigaciones realizadas en un 20 % favorable para mejorar su adquisición y lograr que se democratizen las pruebas en las zonas mas deprimidas por su bajo costo.

# CUADRO No. 1 DEMANDA POTENCIAL KIT - CHAGAS

AÑOS	MEXICO	VENEZUELA
1997	936.622	744.408
1998	1.000.000	827.120
1999	1.200.000	1.033.900
2000	1.350.000	1.250.000



**CUADRO No. 2**  
**COSTOS DE PRODUCCION**  
**KIT-CHAGAS**

CONCEPTO	MONTOS
<b>1.- PROTEINAS RECOMBINANTES</b>	
- Sobre expresión de un (1) liro de cultivo de bacteria E.coli	14000,00
- Inducción del medio de cultivo IpTG	10.500,00
- Centrifugado del culivo para obtener extracto	7.000,00
- Purificación de las proteínas recombinantes	38.500,00
	<u>70.000,00</u>
<b>2.- PRODUCCION DE 30 KITS</b>	
- Colocación del Antígeno en Nitrocelulosa	182.000,00
- Colocación del anticuerpo para la reacción	154.000,00
- Revelado (Actividad enzimática)	14.000,00
- Bloqueado y lavado.	8.400,00
- Personal técnico	84.000,00
- Estuche y envases para comercialización	4.200,00
- Almacenamiento y conservación	3.500,00
- Publicidad y Mercadeo	14.000,00
	<u>464.100,00</u>
<b>COSTO PARA ELABORAR TRES MIL PRUEBAS</b>	<u>534.100,00</u>
<b>COSTO DE CADA KIT DE 100 PRUEBAS CADA UNO</b>	<u>17.803,33</u>

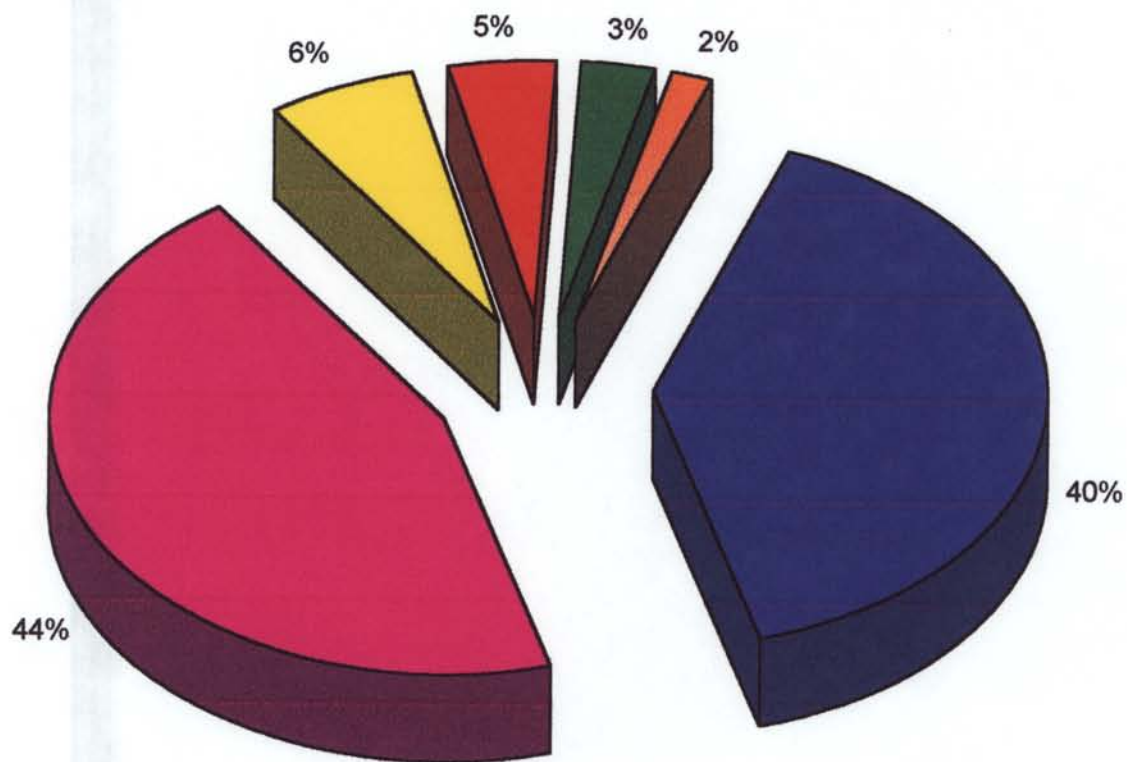
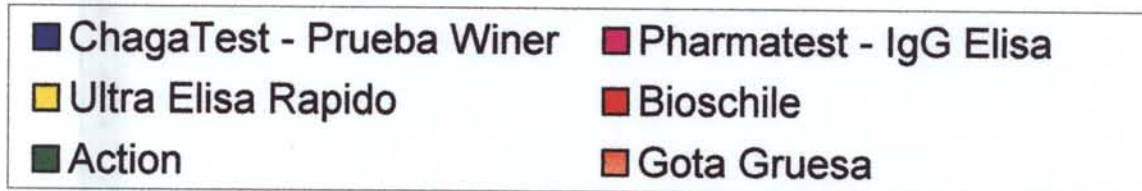
Dolar Americano calculado a Bs.- 700,00 x \$



ANEXO 1  
ENCUESTAS - RESULTADOS

## KIT DE DIAGNOSTICO MAS USADOS EN VENEZUELA

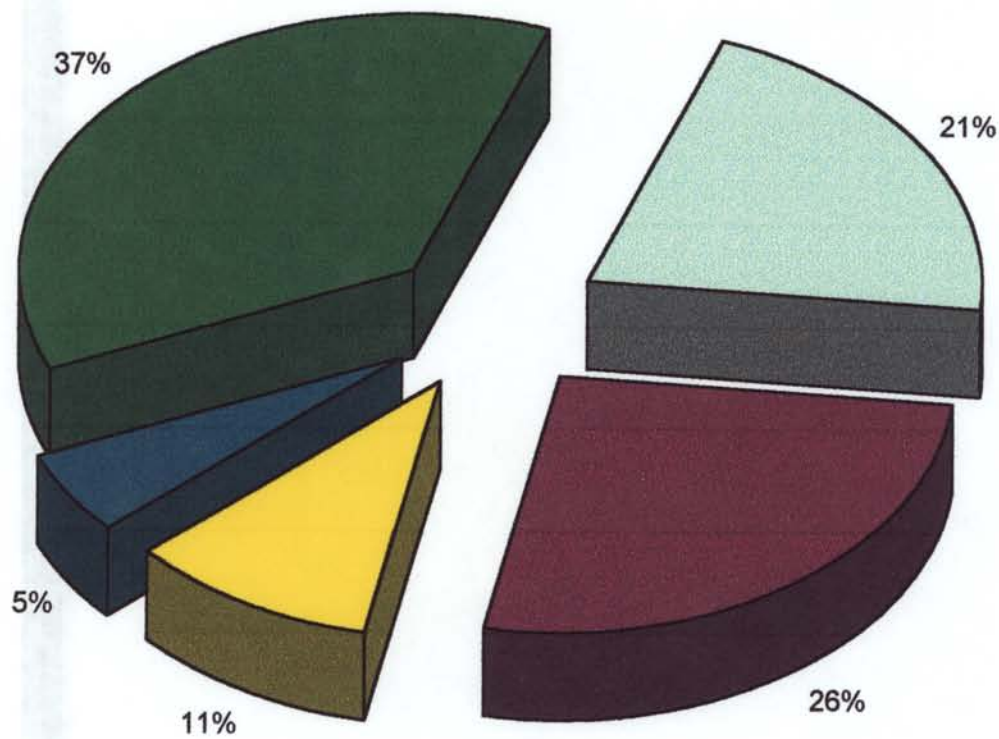
ChagaTest - Prueba Winer	26
Pharmatest - IgG Elisa	29
Ultra Elisa Rapido	4
Bioschile	3
Action	2
Gota Gruesa	1



## KIT DE DIAGNOSTICO MAS USADOS EN BRASIL

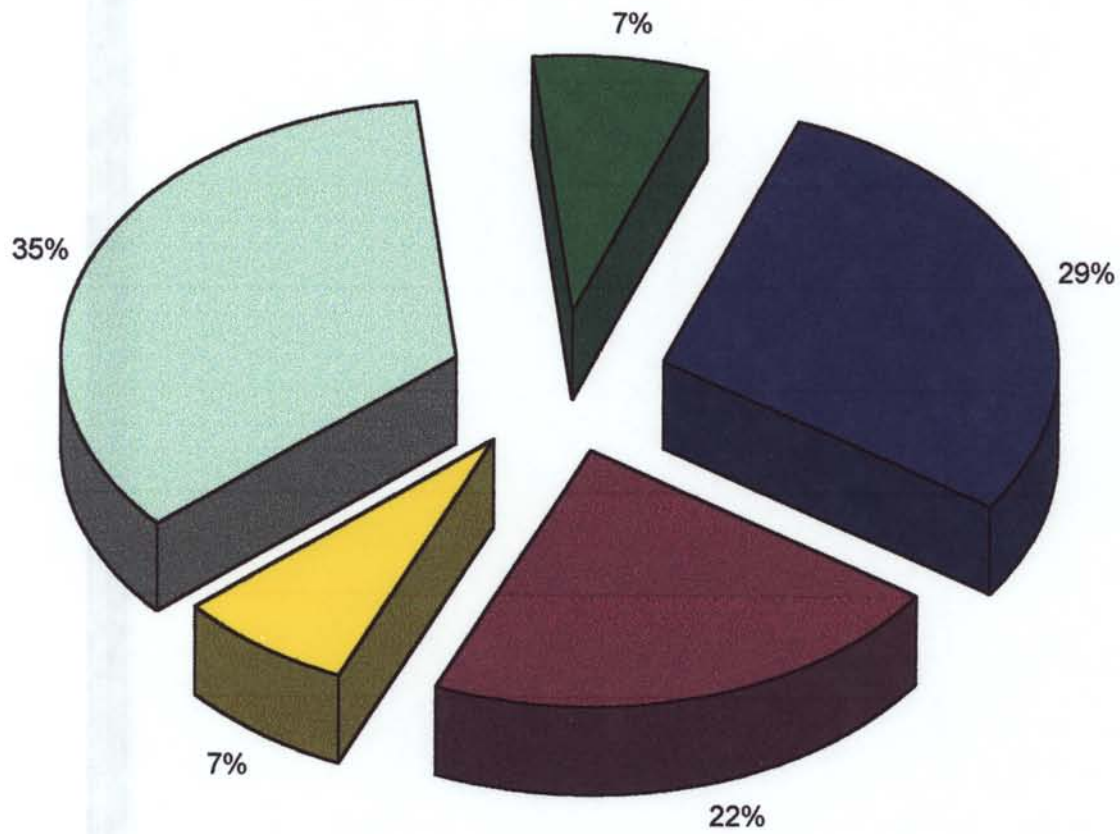
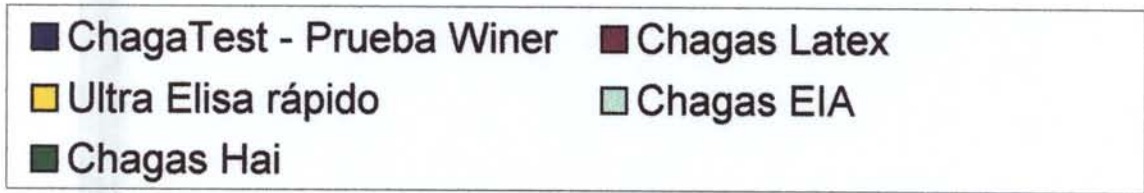
Hemobio-Chagas	20
Chagas Hemagen	25
Polichaco	10
Kit Ihat	5
Bioelisacruzi	35

■ Hemobio-Chagas ■ Chagas Hemagen ■ Polichaco  
■ Kit Ihat ■ Bioelisacruzi



## KIT DE DIAGNOSTICO MAS USADOS EN MEXICO

ChagaTest - Prueba Winer	20
Chagas Latex	15
Ultra Elisa rápido	5
Chagas EIA	24
Chagas Hai	5

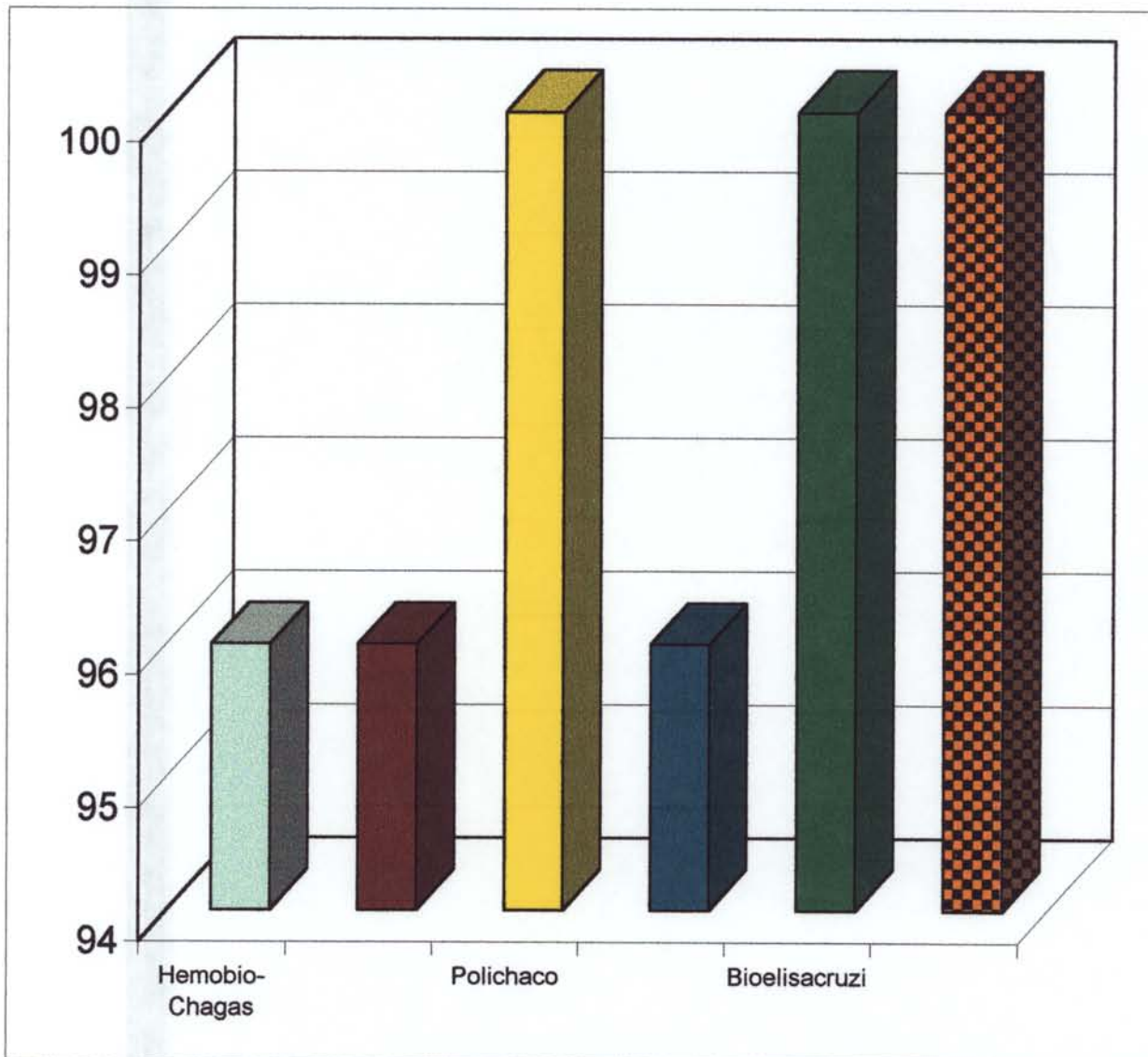




# ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO BRASILEIRO Vs. PROPUESTA

Hemobio-Chagas	96
Chagas Hemagen	96
Polichaco	100
Kit Ihat	96
Bioelisacruzi	100
Propuesta Venezuela	100

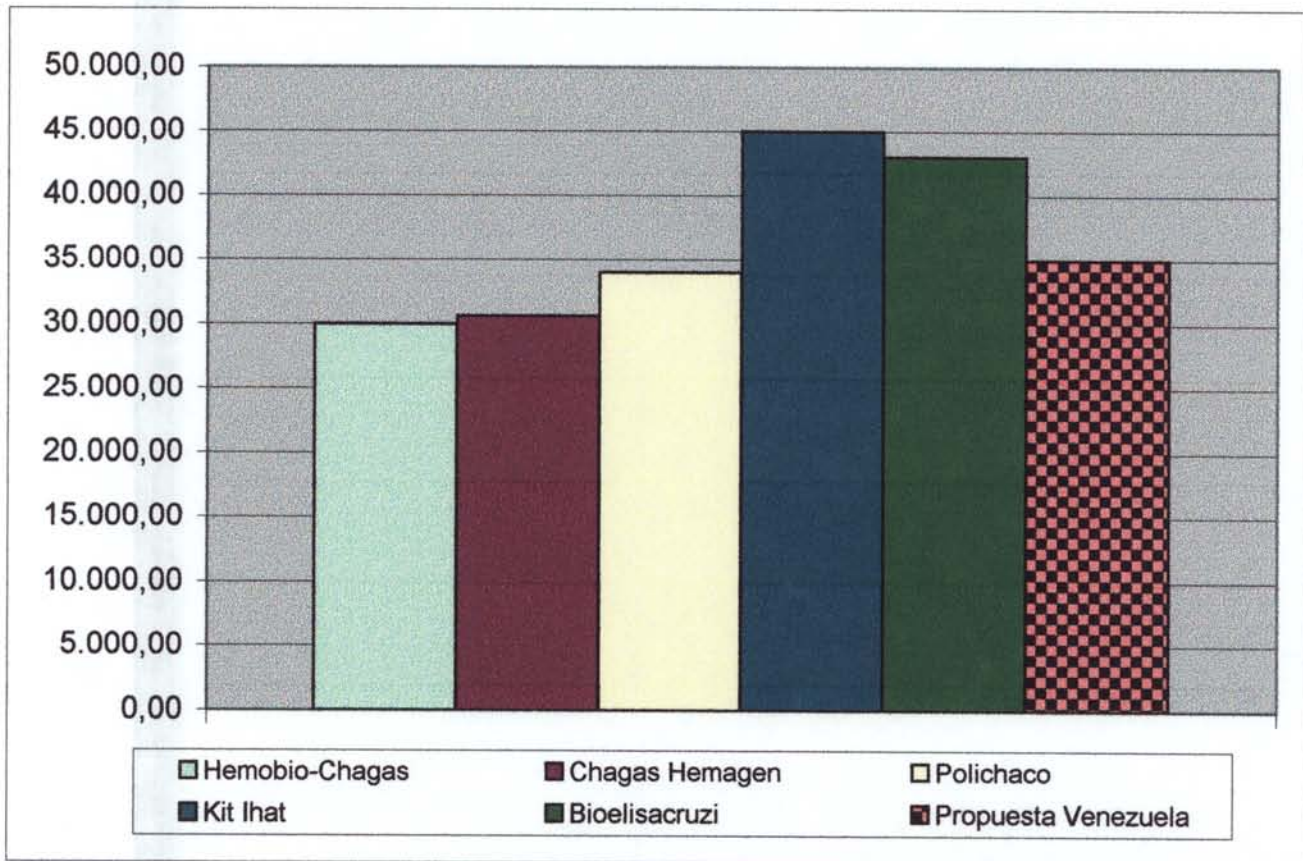
I. Número de Pruebas Permitidas por cada Kit.



## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO BRASILEIRO Vs. PROPUESTA

Hemobio-Chagas	30.000,00
Chagas Hemagen	30.600,00
Polichaco	34.000,00
Kit Ihat	45.000,00
Bioelisacruzi	43.000,00
Propuesta Venezuela	35.000,00

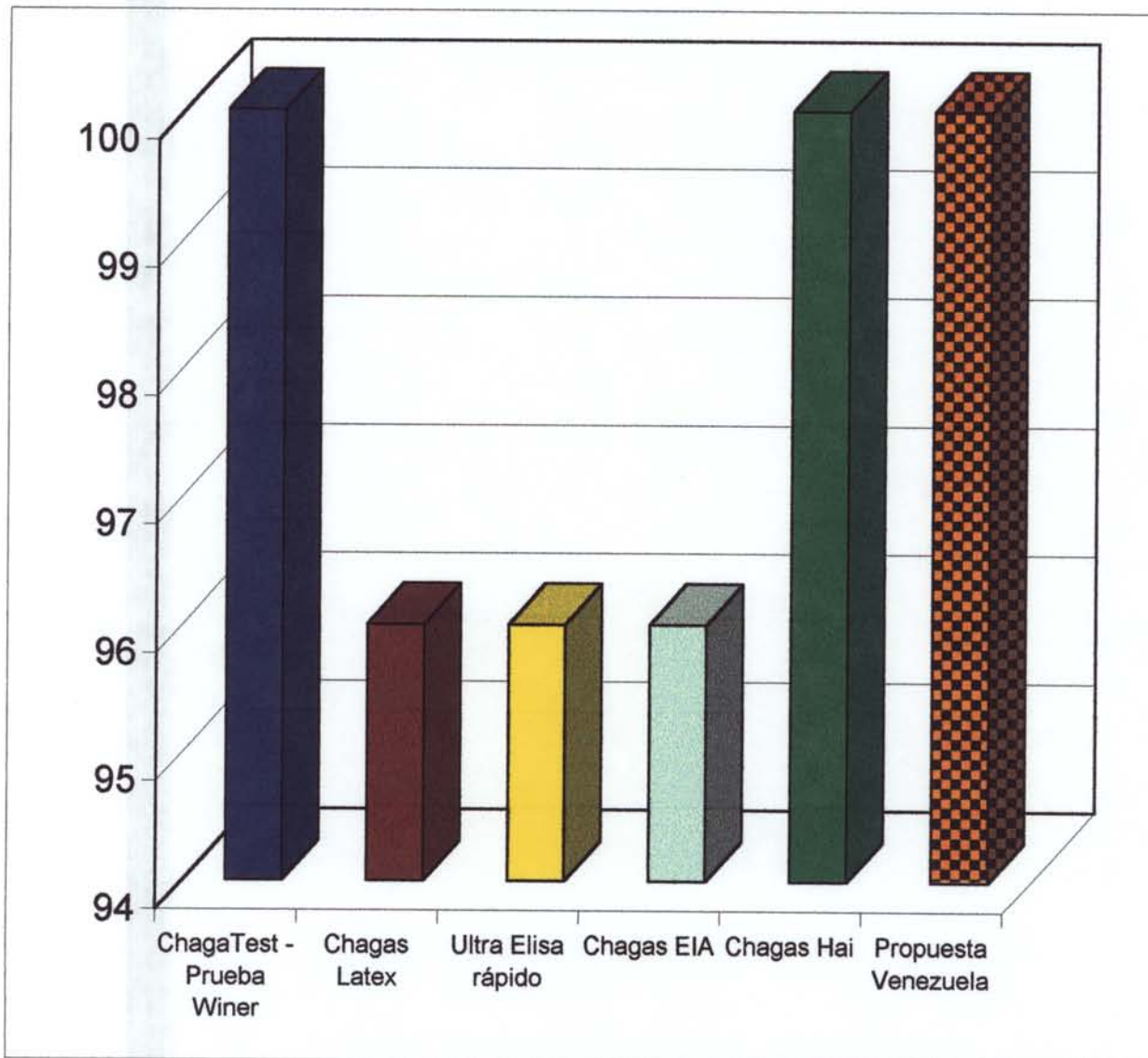
II. Costo promedio.



# ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO MEXICANO Vs. PROPUESTA

ChagaTest - Prueba Winer	100
Chagas Latex	96
Ultra Elisa rápido	96
Chagas EIA	96
Chagas Hai	100
Propuesta Venezuela	100

I. Número de Pruebas Permitidas por cada Kit.

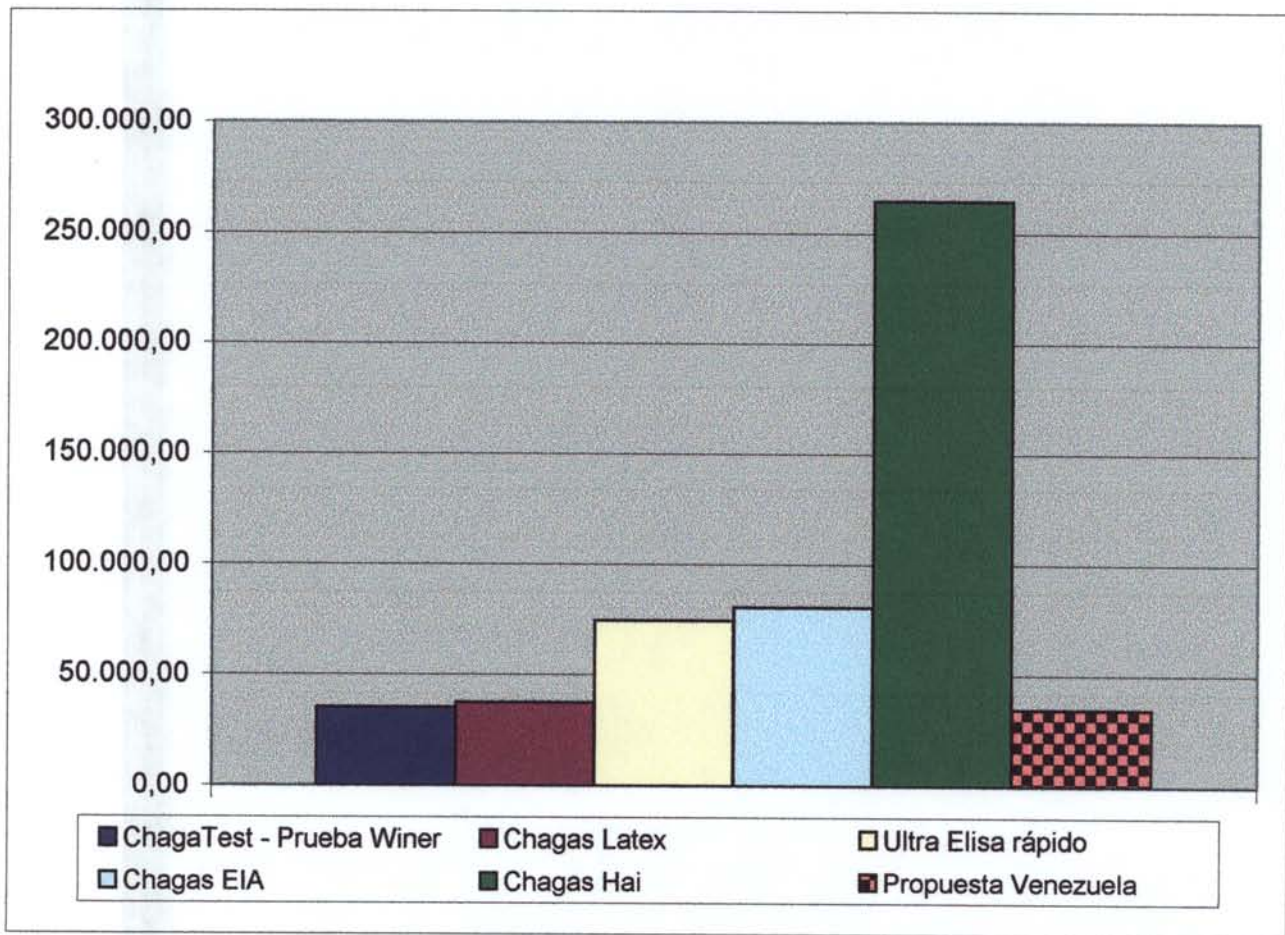




## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO MEXICANO Vs. PROPUESTA

ChagaTest - Prueba Winer	35.297,00
Chagas Latex	37.672,00
Ultra Elisa rápido	75.000,00
Chagas EIA	81.000,00
Chagas Hai	264.298,00
Propuesta Venezuela	35.000,00

II. Costo promedio.

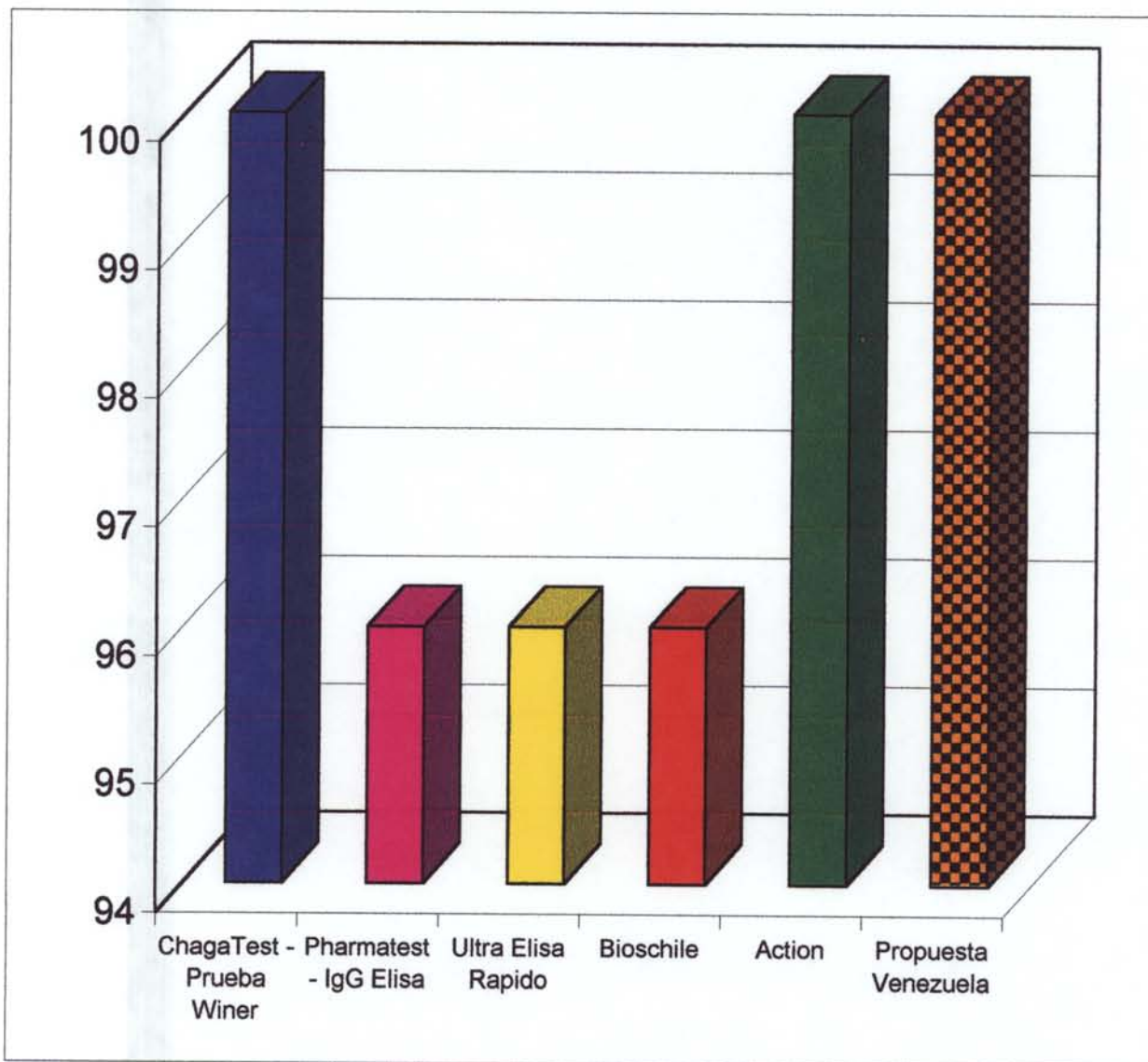




## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO - PROPUESTA

ChagaTest - Prueba Winer	100
Pharmatest - IgG Elisa	96
Ultra Elisa Rapido	96
Bioschile	96
Action	100
Propuesta Venezuela	100

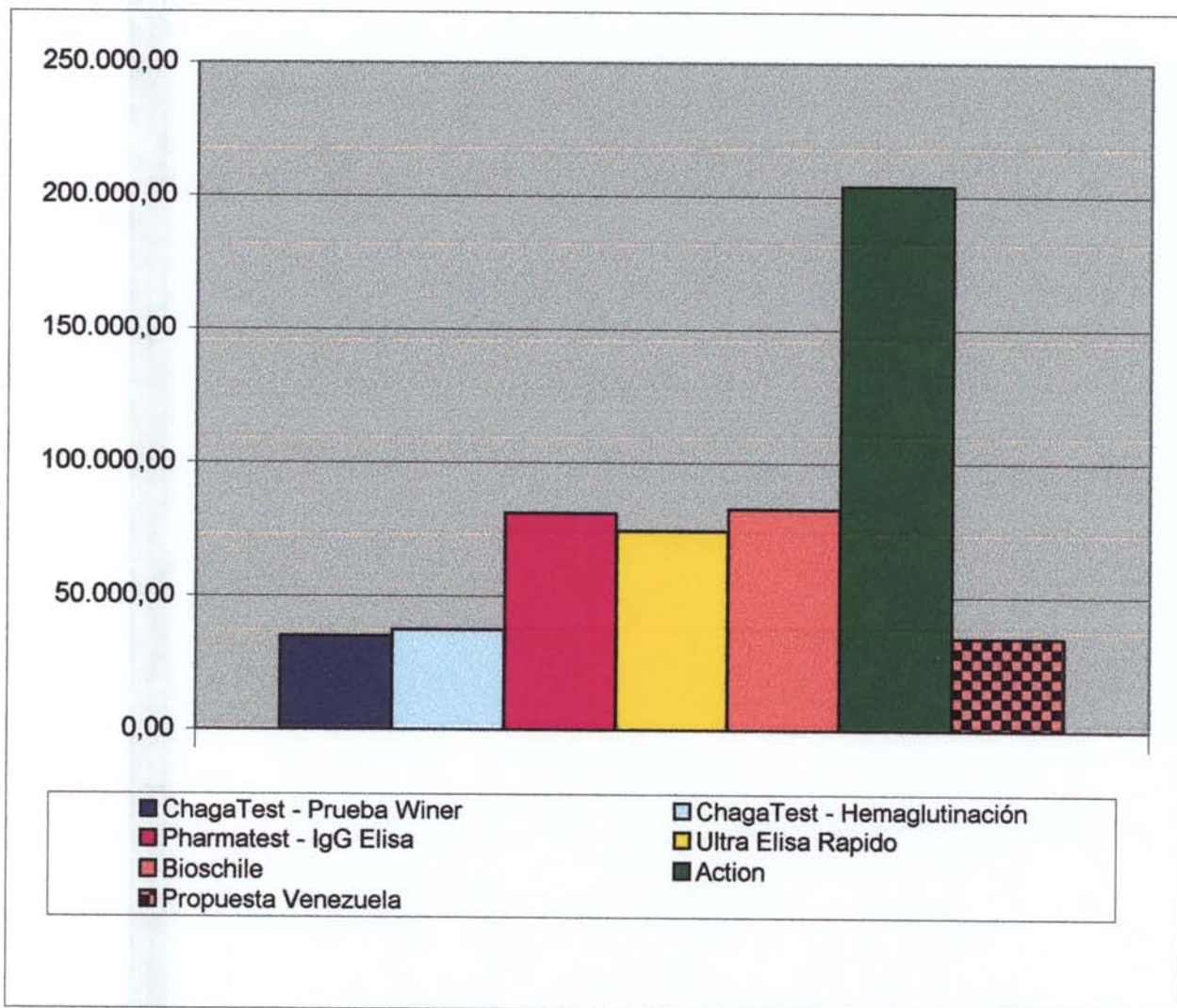
I. Número de Pruebas Permitidas por cada Kit.



## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO - PROPUESTA

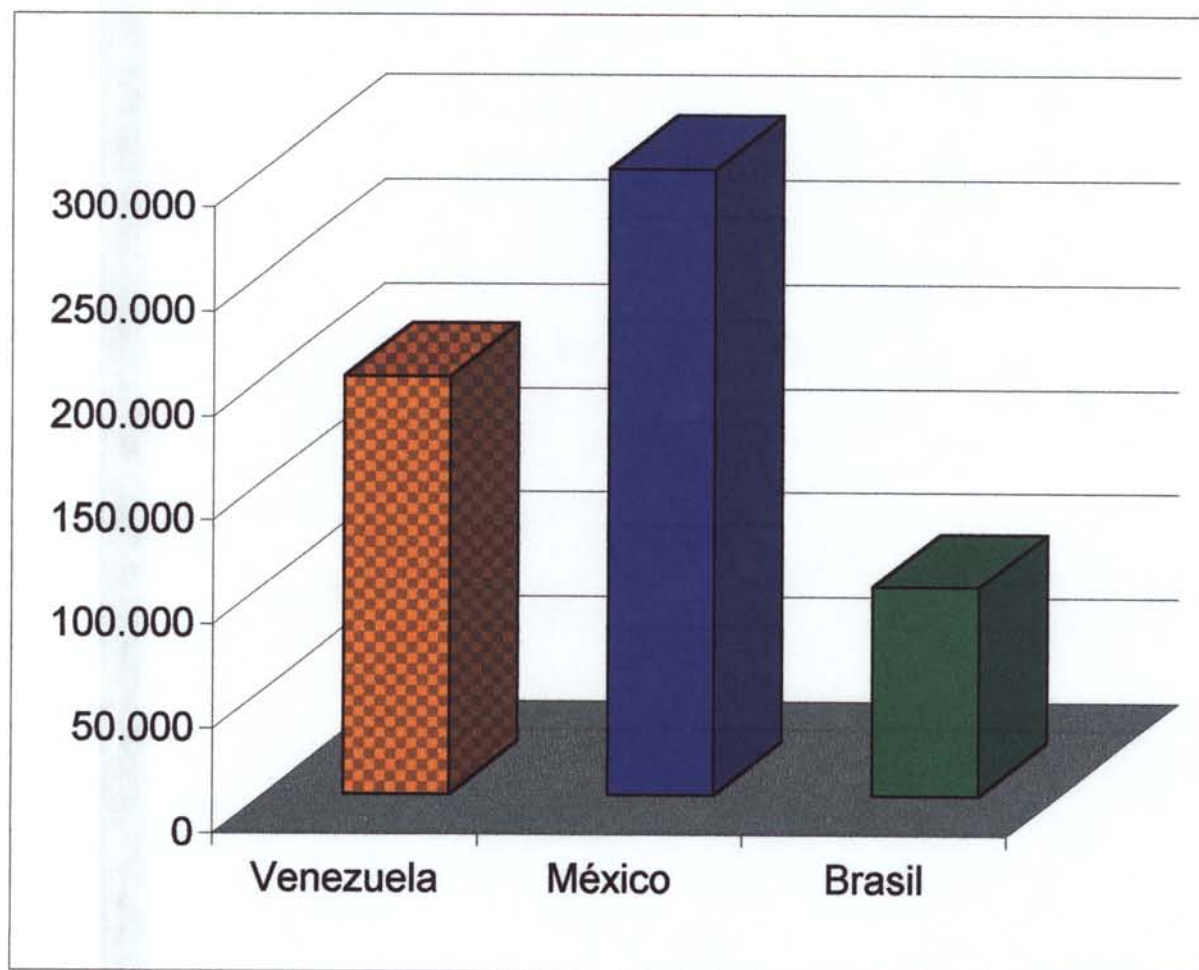
ChagaTest - Prueba Winer	35.297,00
ChagaTest - Hemaglutinación	37.672,00
Pharmatest - IgG Elisa	81.399,00
Ultra Elisa Rapido	75.000,00
Bioschile	83.170,00
Action	204.000,00
Propuesta Venezuela	35.000,00

II. Costo promedio.



## KITS DE DIAGNOSTICO PROPUESTO MERCADO POTENCIAL / ANUAL

Venezuela	200.000
México	300.000
Brasil	100.000

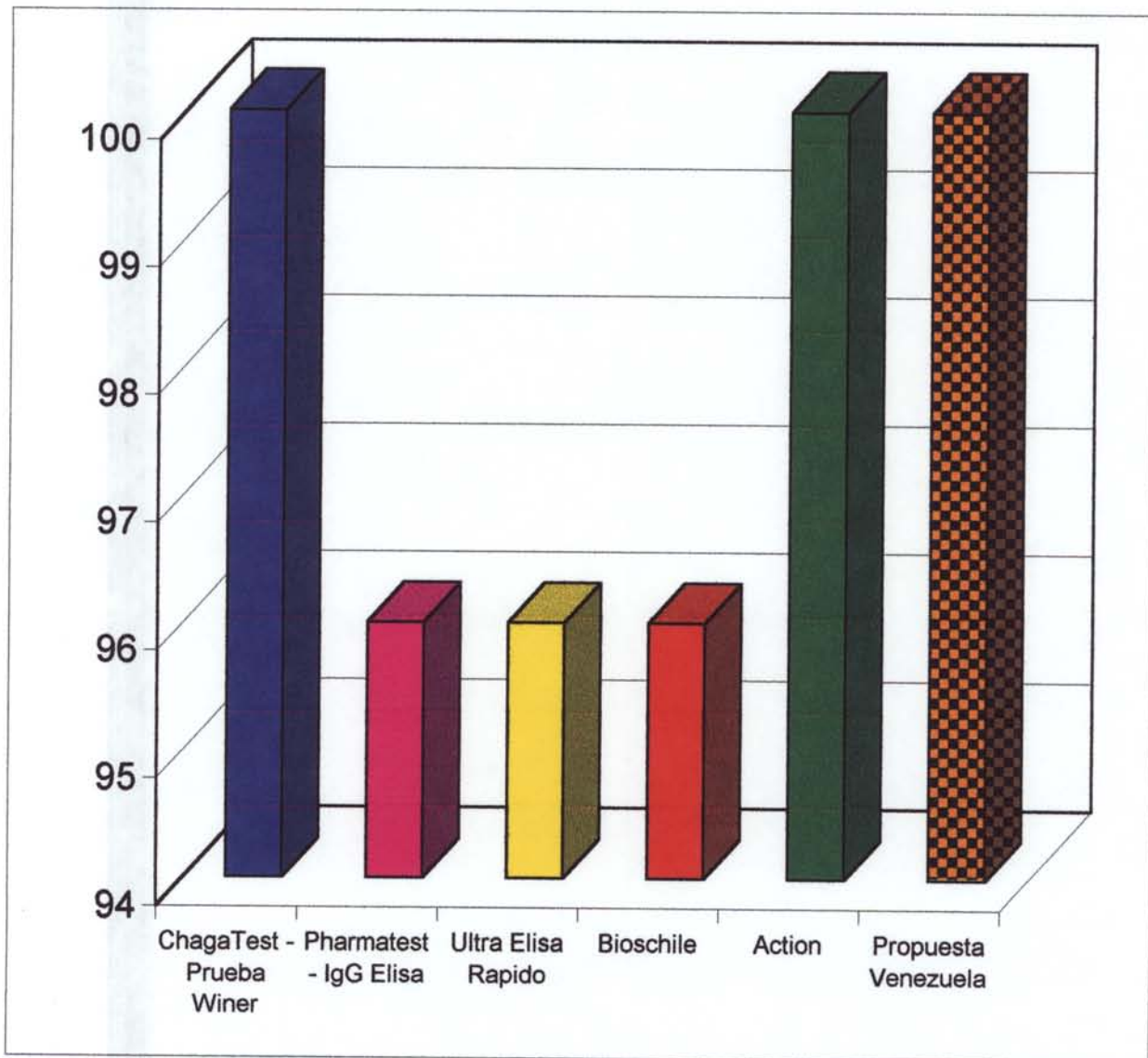




## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO - PROPUESTA

ChagaTest - Prueba Winer	100
Pharmatest - IgG Elisa	96
Ultra Elisa Rapido	96
Bioschile	96
Action	100
Propuesta Venezuela	100

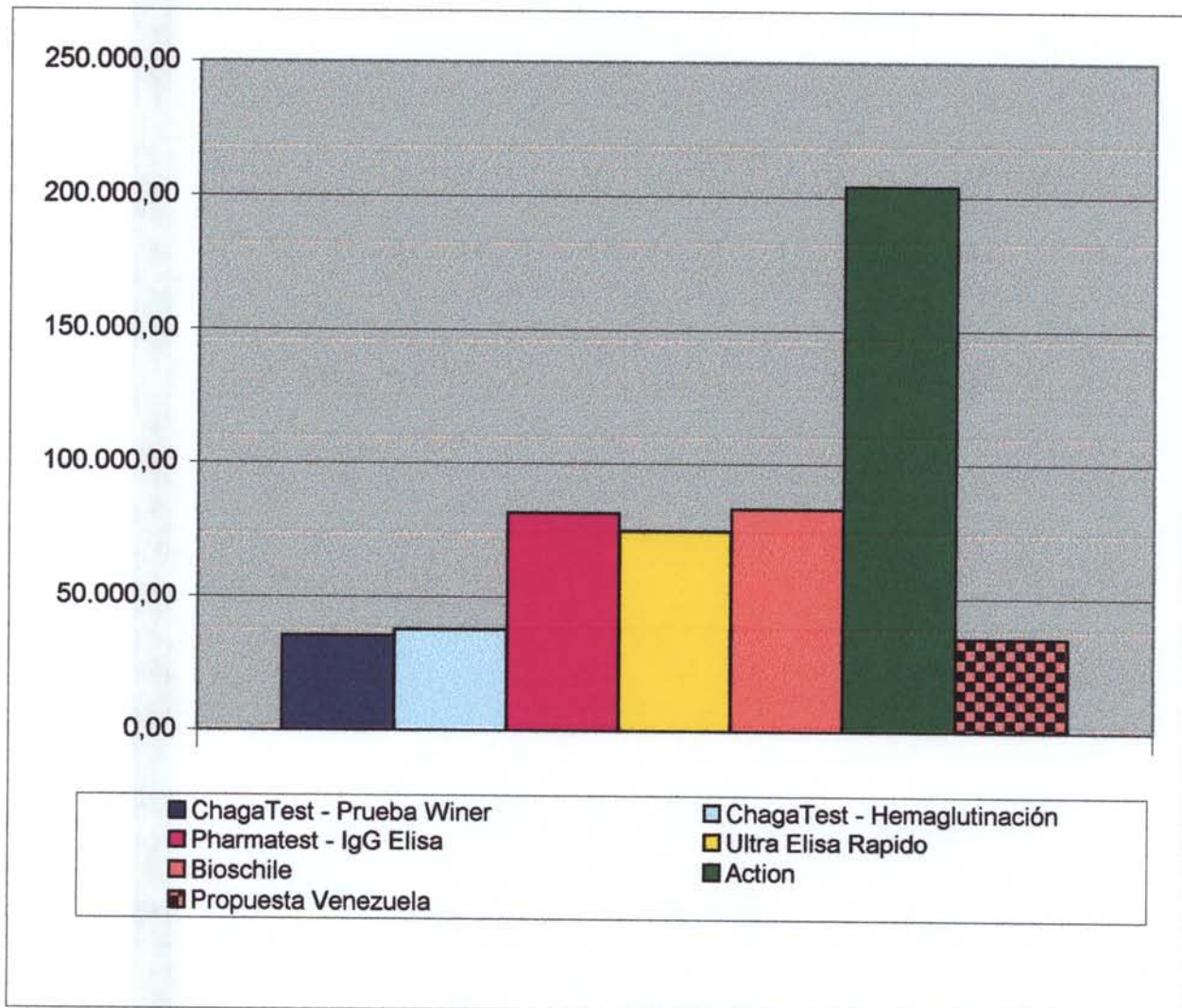
I. Número de Pruebas Permitidas por cada Kit.



## ANALISIS COMPARATIVO KIT DE DIAGNOSTICO MERCADO - PROPUESTA

ChagaTest - Prueba Winer	35.297,00
ChagaTest - Hemaglutinación	37.672,00
Pharmatest - IgG Elisa	81.399,00
Ultra Elisa Rapido	75.000,00
Bioschile	83.170,00
Action	204.000,00
Propuesta Venezuela	35.000,00

II. Costo promedio.



ANEXO 2  
CLIENTES POTENCIALES

**BANCOS DE SANGRE**  
**MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL**  
1999

BANCO DE SANGRE	TIPO	LOCALIDAD
<b>DISTRITO FEDERAL</b>		
1. HOSPITAL JOSÉ GREGORIO HERNÁNDEZ	IV	CARACAS
2. HOSPITAL JOSÉ IGNACIO BALDO	IV	CARACAS
3. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS	IV	CARACAS
4. HOSPITAL MATERNO INFANTIL CARICUAO	III	CARACAS
5. HOSPITAL ONCOLOGICO LUIS RAZETTI	III	CARACAS
6. HOSPITAL MATERNO INF DEL ESTE	II	CARACAS
7. HOSPITAL MATERNO INF ANA T. PONCE	II	MACUTO
<b>ESTADO AMAZONAS</b>		
1. HOSPITAL JOSE GREGORIO HERNANDEZ	II	PTO AYACUCHO
<b>ESTADO ANZOATEGUI</b>		
1. HOSPITAL LUIS RAZETTI	IV	BARCELONA
2. HOSPITAL LUIS ALBERTO ROJAS	II	CANTAURA
3. HOSPITAL LUIS F GUEVARA	II	EL TIGRE
4. HOSPITAL RAFAEL RANGEL	I	A. BARCELONA
<b>ESTADO APURE</b>		
1. HOSPITAL PABLO ACOSTA ORTIZ	III	SAN FERNANDO
2. HOSPITAL FRANCISCO A. RISQUEZ	I	ACHAGUAS
3. HOSPITAL JOSE ANTONIO PAEZ	I	GUASDALITO
<b>ESTADO ARAGUA</b>		
1. HOSPITAL CENTRAL DE MARACAY	IV	MARACAY
2. HOSPITAL JOSE MARIA BENITEZ	II	LA VICTORIA
3. HOSPITAL RAFAEL RANGEL	II	VILL A DE CURA
<b>ESTADO BARINAS</b>		
1. HOSPITAL LUIS RAZETTI	III	BARINAS
2. HOSPITAL RAFAEL RANGEL	I	STA BARBARA
<b>ESTADO BOLIVAR</b>		
1. HOSPITAL RUIZ Y PAEZ	IV	CIUDAD BOLIVAR
2. HOSPITAL GERVAZIO VERA CUSTODIO	II	UPATA
<b>ESTADO CARABOBO</b>		
1. HOSPITAL CENTRAL DE VALENCIA	IV	VALENCIA
2. HOSPITAL ADOLFO PRINCE LARA	III	PTO. CABELLO
3. HOSPITAL MIGUEL PEREZ CARREÑO	II	BARBULA
4. HOSPITAL BEJUMA	II	BEJUMA
<b>ESTADO COJEDES</b>		
1. HOSPITAL SAN CARLOS	II	SAN CARLOS
2. HOSPITAL JOAQUINA DE ROTONDARO	I	TINAQUILLO

<b>ESTADO FALCON</b>		
1. HOSPITAL ALFREDO VAN GRICKEN	IV	CORO
2. HOSPITAL CARLOS DIEZ DEL CIERVO	I	PUNTO FIJO
<b>ESTADO GUARICO</b>		
1. HOSPITAL RAFAEL ZAMORA AREVALO	III	VALLE. PASCUA
2. HOSPITAL ISRAEL RANUAREZ BALZA	II	SAN J. MORROS
3. HOSPITAL JOSE F. URDANETA	II	CALABOZO
4. HOSPITAL JOSE FRANCISCO TROCONIS	I	ZARAZA
5. HOSPITAL JOSE F. TORREALBA	I	A DE ORITUCO
<b>ESTADO LARA</b>		
1. HOSPITAL ANTONIO MARIA PINEDA	IV	BARQUISIMETO
2. HOSPITAL LUIS GOMEZ LOPEZ	III	BARQUISIMETO
3. HOSPITAL PASTOR OROPEZA	II	CARORA
4. HOSPITAL EUGENIO MONTESINOS	I	EL TOCUYO
<b>ESTADO MERIDA</b>		
1. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LOS ANDES	IV	MERIDA
2. HOSPITAL SAN JOSE DE TOVAR	II	TOVAR
3. HOSPITAL EL VIGIA	I	EL VIGIA
<b>ESTADO MIRANDA</b>		
1. HOSPITAL VICTORINO SANTAELLA	IV	LOS TEQUES
2. HOSPITAL SIMON BOLIVAR	II	OCUMARE TUY
3. HOSPITAL EUGENIO D' BELLARD	II	GUATIRE
4. HOSPITAL HERMOGENES R. SALDIVIA	I	CAUCAGUA
<b>ESTADO MONAGAS</b>		
1. HOSPITAL MANUEL NUÑEZ TOVAR	IV	MATURIN
2. HOSPITAL DARIO MARQUEZ	I	CARIPITO
3. HOSPITAL PUNTA DE MATA	I	PUNTA DE MATA
<b>ESTADO PORTUGUESA</b>		
1. HOSPITAL JESUS MARIA CASAL	III	ACARIGUA
2. HOSPITAL MIGUEL ORAA	III	GUANARE
<b>ESTADO SUCRE</b>		
1. HOSPITAL ANTONIO PATRICIO ALCALA	IV	CUMANA
2. HOSPITAL SANTOS DOMINICCI	III	CARUPANO
3. HOSPITAL ANDRES GUTIERREZ SOLIS	I	GUIRIA
<b>ESTADO TACHIRA</b>		
1. HOSPITAL CENTRAL SAN CRISTOBAL	IV	SN CRISTOBAL
2. HOSPITAL SAMUEL MALDONADO	II	SN ANTONIO
3. HOSPITAL NTRA SRA DE LAS MERCEDES	II	COLON
4. HOSPITAL PADRE JUSTO	II	RUBIO
5. HOSPITAL CARLOS ROA ROMERO	II	LA GRITA
<b>ESTADO TRUJILLO</b>		
1. HOSPITAL JOSE GREGORIO HERNANDEZ	III	TRUJILLO
2. HOSPITAL PEDRO E. CARRILLO	III	VALERA
3. HOSPITAL RAFAEL RANGEL	II	BOCONO



**ESTADO YARACUY**

1. HOSPITAL PLACIDO R. RIVERO	III	SAN FELIPE
2. HOSPITAL TIBURCIO GARRIDO	I	CHIVACOA
3. HOSPITAL RAFAEL RANGEL	I	YARITAGUA
4. HOSPITAL PADRE OLIVERO	I	NIRGUA

**ESTADO ZULIA**

1. INSTITUTO HEMATOLOGICO DE OCCIDENTE	IV	MARACAIBO
2. HOSPITAL UNIVERSITARIO	IV	MARACAIBO
3. HOSPITAL ADOLFO D'EMPAIRE	IV	CABIMAS
4. HOSPITAL GENERAL DEL SUR	IV	MARACAIBO
5. HOSPITAL NTRA SRA CHIQUINQUIRA	III	MARACAIBO
6. HOSPITAL CENTRAL URQUINAONA	III	MARACAIBO
7. HOSPITAL SANTA BARBARA	III	SANTA BARBARA
8. MATERNIDAD CASTILLO PLAZA	III	MARACAIBO
9. HOSPITAL DE NIÑOS	II	MARACAIBO
10. HOSPITAL MAT. INF. RAUL LEONI	II	MARACAIBO
11. HOSPITAL MAT. INF. CUATRICENTENARIO	II	MARACAIBO
12. HOSPITAL MAT. INF. RAFAEL B. CHACIN	II	MARACAIBO
13. HOSPITAL MENE GRANDE	I	MENE GRANDE
14. HOSPITAL CAJA SECA	I	CAJA SECA
15. HOSPITAL MACHIQUES	I	MACHIQUES
16. HOSPITAL HUGO PARRA LEON	I	ALTAGRACIA
17. HOSPITAL SAN RAFAEL DE MARA	I	SN R. DE MARA
18. HOSPITAL VILLA DEL ROSARIO	I	V. DEL ROSARIO

BANCOS DE SANGRE  
INSTITUTO VENZOLANO DE LOS SEGUROS SOCIALES  
1999

BANCO DE SANGRE	LOCALIDAD
<b>DISTRITO FEDERAL</b>	
1. HOSPITAL DOMINGO LUCIANI	CARACAS
2. HOSPITAL MIGUEL PEREZ CARREÑO	CARACAS
3. HOSPITAL JOSE GREGORIO HERNANDEZ	CARACAS
4. HOSPITAL PEDIATRICO ELIAS TORO	CARACAS
5. MATERNIDAD SANTA ANA	CARACAS
6. HOSPITAL JOSE MARIA VARGAS	LA GUAIRA
<b>ESTADO ANZOATEGUI</b>	
1. HOSPITAL DOMINGO GUZMAN LANDER	BARCELONA
2. HOSPITAL CESAR RODRIGUEZ	PUERTO LA CRUZ
<b>ESTADO ARAGUA</b>	
1. HOSPITAL JOSE VARGAS	MARACAY
2. HOSPITAL JOSE CARABAÑO TOSTA	MARACAY
<b>ESTADO BOLIVAR</b>	
1. HOSPITAL HECTOR NOUEL JOUBERT	CIUDAD BOLIVAR
2. HOSPITAL RAUL LEONI	SAN FELIX
3. HOSPITAL UYAPAR	PTO ORDAZ
4. HOSPITAL GERMAN ROSSIO	EL CALLAO
<b>ESTADO CARABOBO</b>	
1. HOSPITAL ANGEL LARRALDE	VALENCIA
2. HOSPITAL FRANCISCO MOLINA SIERRA	PTO. CABELLO
<b>ESTADO FALCON</b>	
1. HOSPITAL CARDON	CORO
2. HOSPITAL CALLE SIERRA	PUNTO FIJO
<b>ESTADO LARA</b>	
1. HOSPITAL PASTOR OROPEZA	BARQUISIMETO
<b>ESTADO MIRANDA</b>	
1. HOSPITAL LUIS SALAZAR DOMINGUEZ	GUARENAS
<b>ESTADO NUEVA ESPARTA</b>	
2. HOSPITAL LUIS ORTEGA	PORLAMAR
<b>ESTADO PORTUGUESA</b>	
HOSPITAL JOSE GREGORIO HERNANDEZ	ACARIGUA
<b>ESTADO TACHIRA</b>	
1. HOSPITAL PATROCINIO PEÑUELA RUIZ	SN CRISTOBAL
<b>ESTADO TRUJILLO</b>	
1. HOSPITAL TRUJILLO	TRUJILLO
2. HOSPITAL MONTEZUMA GINNARI	VALERA
<b>ESTADO ZULIA</b>	
1. HOSPITAL ADOLFO PONS	MARACAIBO
2. HOSPITAL MANUEL NORIEGA TRIGO	MARACAIBO
3. HOSPITAL PEDRO GARCIA CLARA	CIUDAD OJEDA

**BANCOS DE SANGRE  
INSTITUCIONES  
1999**

<b>BANCO DE SANGRE</b>	<b>LOCALIDAD</b>
<b>A. GOBERNACION DEL DISTRITO FEDERAL</b>	
1. BANCO MUNICIPAL DE SANGRE	CARACAS
2. HOSPITAL VARGAS DE CARACAS	CARACAS
3. HOSPITAL RAFAEL BAQUERO GONZALEZ	CARACAS
4. HOSPITAL JESUS YERENA	CARACAS
5. HOSPITAL DE EMERGENCIA L. M. FERREIRA	CARACAS
6. HOSPITAL DE NIÑOS J. M. DE LOS RIOS	CARACAS
7. MATERNIDAD CONCEPCION PALACIOS	CARACAS
8. HOSPITAL DE PARIATA	PARIATA
<b>B. MUNICIPIO PETARE</b>	
1. HOSPITAL PEREZ DE LEON DE PETARE	PETARE
<b>C. POLICIA METROPOLITANA</b>	
1. HOSPITAL DE LA POLICIA METROPOLITANA	CARACAS
<b>D. SANIDAD MILITAR</b>	
1. HOSPITAL CARLOS ARVELO	CARACAS
2. HOSPITAL VICENTE SALIAS	CARACAS
3. POLICLINICA CABISOFA	CARACAS
4. HOSPITAL NAVAL DE CATIA LA MAR	CATIA LA MAR
5. HOSPITAL MILITAR ELBANO PAREDES VIVAS	MARACAY
6. HOSPITAL NAVAL PUERTO CABELLO	PTO CABELLO
7. HOSPITAL MILITAR SAN CRISTOBAL	SAN CRISTOBAL
8. HOSPITAL MILITAR MARACAIBO	MARACAIBO
<b>E. CRUZ ROJA VENEZOLANA</b>	
1. HOSPITAL CRUZ ROJA DE CARACAS	CARACAS
2. HOSPITAL CRUZ ROJA DE VALENCIA	VALENCIA
<b>F. QUMBIOTEC. PPDS</b>	
1. BANCO DE SANGRE DE LA PPDS	LOS TEQUES
2. CENTRO REGIONAL CARABOBO	VALENCIA
3. CENTRO REGIONAL LARA	BARQUISIMETO
<b>G. OTRAS INSTITUCIONES</b>	
1. HOSPITAL ONCOLOGICO PADRE MACHADO	CARACAS
2. HOSPITAL ORTOPEDICO INFANTIL	CARACAS
3. HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS	CARACAS
4. HOSPITAL SAN TOME	SAN TOME
5. HOGAR CLINICA SAN RAFAEL	MARACAIBO
6. HOSPITAL ANTONIO JOSE UZCATEGUI	MERIDA
7. HOSPITAL SOR JUAN INES DE LA CRUZ	MERIDA

**BANCOS DE SANGRE  
CLINICAS PRIVADAS  
1999**

<b>BANCO DE SANGRE</b>	<b>LOCALIDAD</b>
------------------------	------------------

**DISTRITO FEDERAL**

1. INSTITUTO MEDICO LA FLORESTA	<b>CARACAS</b>
2. CLINICA EL AVILA	CARACAS
3. INSTITUTO DIAGNOSTICO	CARACAS
4. POLICLINICA SANTIAGO DE LEON	CARACAS
5. UROLOGICO SAN ROMAN	CARACAS
6. CLINICA SANTA SOFIA	CARACAS
7. CLINICA VISTA ALEGRE	CARACAS
8. CLINICA LUIS RAZETTI	CARACAS
9. POLICLINICA METROPOLITANA	CARACAS
10. CENTRO MEDICO LOIRA	CARACAS
11. CLINICA ATIAS	CARACAS
12. CENTRO MEDICO DE CARACAS	CARACAS
13. CLINICA MENDEZ GIMON	CARACAS
14. CENTRO CLINICO LEOPOLDO AGUERREVERE	CARACAS
15. HOSPITAL DE CLINICAS CARACAS	CARACAS
16. CLINICA SANATRIX	CARACAS
17. POLICLINICA LAS MERCEDES	CARACAS
18. POLICLINICA LA ARBOLEDA	CARACAS
19. INSTITUTO MEDICO LA FLORIDA	CARACAS
20. CENTRO DE ESPECIALIDADES UNIDAS	CARACAS
21. CLINICA SAN PABLO	CARACAS
22. HOSPITAL SAN JOSE	MAIQUETIA

**ESTADO ANZOATEGUI**

1. CENTRO MEDICO ANZOATEGUI	BARCELONA
2. CENTRO MEDICO ZAMBRANO	BARCELONA
3. GRUPO MEDICO ORIENTE	ANACO
4. CLINICA IDENCA	ANACO
5. CLINICA DEVORA DE ROMERO	PUERTO LA CRUZ
6. CLINICA SANTA ANA	PUERTO LA CRUZ

**ESTADO ARAGUA**

1. CLINICA LUGO	MARACAY
2. POLICLINICA MARACAY	MARACAY
3. CENTRO MEDICO MARACAY	MARACAY
4. MATERNIDAD LA FLORESTA	MARACAY
5. CLINICA SAN JOSE	MARACAY
6. CLINICA ANDRES BELLO	MARACAY
7. CLINICA EL SAMAN	MARACAY
8. CENTRO MEDICO CAGUA	CAGUA

**ESTADO BARINAS**

1. INSTITUTO DIAGNOSTICO VARYNA
2. CLINICA NTRA SRA DEL PILAR
3. CLINICA UNICAC

BARINAS  
BARINAS  
BARINAS

**ESTADO BOLIVAR**

1. POLICLINICA SANTA ANA
2. CENTRO MEDICO ORINOCO
3. CLINICA PUERTO ORDAZ
4. HOSPITAL CLINICA INFANTIL
5. HOSPITAL CLINICA CARONI
- 6.

CD. BOLIVAR  
CD. BOLIVAR  
PUERTO ORDAZ  
SAN FELIX  
PUERTO ORDAZ

**ESTADO CARABOBO**

1. CENTRO POLICLINICO DE VALENCIA
2. POLICLINICA SEIJAS
3. CLINICA METROPOLITANA
4. CLINICA LA PASTORA
5. MATERNIDAD DEL ESTE
6. CENTRO MEDICO GUERRA MENDEZ
7. CENTRO MEDICO LA ISABELICA
8. INSTITUTO DE ESPECIALIDADES QUIRURGICAS
9. CLINICA SANTA MARIA
10. CENTRO CLINICO GUACARA
11. CENTRO MEDICO GUERRA MAS

VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
VALENCIA  
GUACARA  
PTO. CABELLO

**ESTADO FALCON**

1. POLICLINICA DE ESPECIALIDADES
2. POLICLINICA PARAGUANA
3. POLICLINICA NTRA SRA DE GUADALUPE
4. CENTRO MEDICO CARDON

PUNTO FIJO  
PUNTO FIJO  
CORO  
CARDON

**ESTADO GUARICO**

1. CLINICA SANTA ROSALIA
2. CLINICA GUARICO

SN.J. MORROS  
VALLE PASCUA

**ESTADO LARA**

1. CLINICA LUIS RAZETTI
2. POLICLINICA BARQUISIMETO
3. CLINICA PABLO ACOSTA ORTIZ
4. CLINICA LARA
5. INSTITUTO HEMATOLOGICO DE LARA
6. CLINICA JOSE MARIA VARGAS
7. CLINICA SAN JUAN

BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO  
BARQUISIMETO

**ESTADO MERIDA**

1. CENTRO CLINICO MERIDA
2. CLINICA MERIDA
3. CLINICA PEDIATRICA MERIDA
4. INSTITUTO CLINICO MED QUIRURGICO
5. CLINICA EJIDO
6. CLINICA VARGAS

MERIDA  
MERIDA  
MERIDA  
MERIDA  
EJIDO  
EL VIGIA

**ESTADO MIRANDA**

1. CLINICA SAN MARTIN DE PORRES
2. CLINICA PASO REAL

GUATIRE  
CHARALLAVE

**ESTADO MONAGAS**

1. POLICLINICA MATURIN
2. CENTRO MEDICO M,ATURIN
3. CENTRO DE ESPECIALIDADES MEDICAS

MATURIN  
MATURIN  
MATURIN

**ESTADO NUEVA ESPARTA**

1. CENTRO MEDICO NUEVA ESPARTA
2. CENTRO DIAGNOSTICO PORLAMAR

LA ASUNCION  
PORLAMAR

**ESTADO PORTUGUESA**

1. CLINICA DEL ESTE
2. CENTRO MEDICO PORTUGUESA
3. BANCO DE SANGRE COHAR

GUANARE  
GUANARE  
ACARIGUA

**ESTADO SUCRE**

1. CLINICA JOSEFINA FIGUERAS
2. CLINICA SAN VICENTE DE PAUL
3. CENTRO MEDICO CUMANA
4. CLINICA ORIENTE
5. POLICLINICA CARUPANO

CUMANA  
CUMANA  
CUMANA  
CUMANA  
CARUPANO

**ESTADO TACHIRA**

1. POLICLINICA TACHIRA
2. CENTRO CLINICO SAN CRISTOBAL
3. CENTRO MATERNO INFANTIL
4. CENTRO MED QUIRURGICO SAN SEBASTIAN
5. CLINICA EL SAMAN
6. HOSPITAL MAT. INF. LOS ANDES

SAN CRISTOBAL  
SAN CRISTOBAL  
SAN CRISTOBAL  
SAN CRISTOBAL  
SAN CRISTOBAL  
SAN CRISTOBAL

**ESTADO TRUJILLO**

1. UNIDAD HEMATOLOGICA EDELMIRA ARAUJO
2. INSTITUTO MEDICO VALERA

VALERA  
VALERA

**ESTADO ZULIA**

1. HOSPITAL COROMOTO
2. CLINICA FALCON
3. CENTRO MEDICO DE OCCIDENTE
4. POLICLINICA DE OCCIDENTE
5. CLINICA D' EMPAIRE
6. HOSPITAL CLINICO DE MARACAIBO
7. INST. ZULIANO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGIA
8. CLINICA SAGRADA FAMILIA
9. CLINICA SUCRE
10. POLICLINICA SAN FRANCISCO
11. CLINICA AMADO
12. POLICLINICA MARACAIBO
13. CENTRO MEDICO CIUDAD OJEDA
14. CENTRO MEDICO CABIMAS
15. HOSPITAL PRIVADO EL ROSARIO
16. CENTRO MEDICO LAGUNILLAS
17. MEDICOS ASESORES S.A.

MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
CIUDAD OJEDA  
MARACAIBO  
MARACIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
CIUDAD OJEDA  
CABIMAS  
CABIMAS  
CIUDAD OJEDA  
CIUDAD OJEDA

18. CENTRO MEDICO PARAISO
19. CLINICA ZULIA
20. CENTRO CLINICO LA LIMPIA
21. POLICLINICA SAN ANTONIO
22. CENTRO HEMATOLOGICO OJEDA

MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
MARACAIBO  
CIUDAD OJEDA

BANCOS DE SANGRE Y LABORATORIOS  
MÉXICO

BANCOS DE SANGRE. (México)

110	IMSS
114	SECRETARIA DE SALUD
220	PRIVADOS
60	ISSSTE
40	SERVICIOS MEDICOS ESTATALES
19	PEMEX
17	CRUZ ROJA
9	UNIVERSITARIOS
8	DEFENSA NACIONAL
6	MARINA NACIONAL
4	DIF
6	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN

LABORATORIOS ESTATALES DE SALUD PUBLICA. (México)

17	CAMPECHE, CHIAPAS, GUANAJUATO, GUERRERO, HIDALGO, JALISCO, MICHOACÁN, MORELOS, NAYARIT, NUEVO LEON, OAXACA, PUEBLA, QUINTANA ROO, TABASCO, TLAXCALA, VERACRUZ Y YUCATÁN
----	--



ANEXO 3  
INFORMES – TRABAJO DE CAMPO

INFORMACION SOBRE LOS KITs DE  
DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS  
EN BRASIL

Lic Juana Villarreal Andrade

## **ENCUESTA REALIZADA AL BANCO DE SANGRE HEMOBA EN SALVADOR-BAHIA.**

Directora. Licenciada Marina rivera.

El tipo de kit que usan es Hemobio- Chagas, es un conjunto de reactivos que permite detectar cualitativamente la enfermedad de Chagas en sueros de pacientes, a través del ensayo Inmunoenzimaticos (ELISA) en microplacas. El kit tiene forma de presentación de 192 0 384 pruebas.

### **Características del kit.**

La empresa donde fabrican el kit de diagnóstico es, EMBRABIO – Empresa Brasileña de Biotecnología S.A; C.G.C:53.444.667/0001-40; End. Av. Ermano Marchetti, 826 – Lapa. CEP: 05038-000; Sao Paulo – S.P; Brasil.

Atención al cliente: (011) 861 5901. HBK 401 961008.

### **Materiales suministrados por el KIT.**

**Microplacas (2/4 unidades):** 12 tiras separadas con 8 cavidades en cada tira, totalizando 96 cavidades en cada soporte (placa). Las cavidades están sensibilizadas con antígeno de *Trypanosoma cruzi*

**Diluyente de muestra y conjugado:** (400 ml), solución tampón fosfato (PBS) con estabilizantes proteicos y conservantes.

**Control negativo (o.07/0.15 ml):** Suero humano negativo para HbsAg y sin anticuerpos anti- T. Cruzi, con conservantes.

**Control positivo (o.07/0.15 ml):** Suero humano negativo para HbsAg, sin anticuerpos anti HIV1 y anti – HTLV I/II, con anticuerpos anti- T. Cruzi, con conservantes.

**Solución de lavado (70/140 ml):** Solución tampón fosfato (PBS) con tween 20, 25 veces concentrada

**Conjugado Concentrado (0.70/1.40 ml):** Anticuerpos anti –IgG humano (producido en conejo) conjugado con peroxidasa, con conservantes, 40 veces concentrado.

**Diluyente del sustrato (25/50 ml):** Solución peróxido de hidrogeno y ácido cítrico en tampón fosfato.

**Sustrato TMB (0.70/1,40 ml ):** Solución cromógena de tetrametilbenzidina (TMB) y demetilsulfoxido (DMSO), 40 veces concentrado.

Solución bloqueadora (25/50 ml): solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N

**Sellador para placa (6/12 unidades):** sellador para sellar las microplacas durante las incubaciones.

Mayor información aparece en el folleto del kit. (Principio de la prueba, precauciones, composición, preparación y estabilidad del material, procedimiento, observaciones, cálculos de los resultados, control de calidad, valor del cuttof, interpretación de los resultados).

#### **Para el caso del kit de hemaglutinación.**

El tipo de kit es CHAGAS HEMAGEN (catalogo N° 6419-384 pruebas) fue elaborado para detectar y semicuantificar anticuerpos circulantes de *Trypanosoma cruzi*. El conjunto incluye todos los reactivos necesarios, controles y microplacas en forma de V (mayor información en el folleto de Hemagen).

### **Empresa donde fabrican el kit de hemaglutinación**

Hemagen diagnósticos comercio, importación Ltda. Ruta tavares Cabral, 185 – Pinheiros – Cep: 05423 – 030 – S. Paulo – SP. Tel: (011) 816 – 3246 / Fax: (011) 816 – 7623. Televentas: (011) 816 – 0576.

### **Información Adicional.**

El número de personas que donan sangre al servicio de hematología del banco de sangre al año es aproximadamente 50.000, se realizan pruebas de rutinas para la detección de la enfermedad de Chagas, aproximadamente 4.000 pruebas por mes para esta enfermedad. En todos los bancos de sangre de Brasil se usan dos o tres pruebas serológicas para descartar la enfermedad de Chagas, también se emplea la inmunofluorescencia como ensayo serológico.

El tipo de antígenos que utilizan son extractos de la forma epimastigote del parásito y eritrocitos de carnero sensibilizados con extractos crudos de *Trypanosoma cruzi*.

Si el paciente resulto positivo para la enfermedad de Chagas con las tres pruebas mencionadas anteriormente, se le envía una notificación para que asista a una consulta donde el paciente se entrevista y posteriormente es referido a un cardiólogo, el cual le suministra el tratamiento para tratar la enfermedad de Chagas.

El costo de la prueba serológica es gratis en los bancos de sangre, así como también es gratis en los programas epidemiológicos de los MSAS de Brasil.

Las empresas que fabrican los kits de diagnóstico, tienen distribuidores que se encargan de entregar el material a la población, en este caso bancos de sangre, hospitales, ministerio de salud y laboratorios clínicos. O en otros casos hay compañías que compran el producto a la empresa donde fabrican los kits y ellos mismos distribuyen el producto a diferentes sectores de la población de Brasil.

La administración es la encargada de tomar las decisiones de la compra del producto.

**En cuanto a los proveedores.**

Siempre existe la seguridad de recepción de los kits de diagnóstico y el tiempo de entrega es cada mes dependiendo del número de personas que vayan a donar sangre. Se compran aproximadamente 40 kits, es decir 20 Kits de ELISA y 20 KIT de hemaglutinación usando dos antígenos diferentes para garantizar el resultado de la prueba que se le realiza a la persona que dono la sangre.

El costo de los dos kits es de aproximadamente 45 dólares cada uno.

**Fundacion de hematologia y hemoterapia de Bahia – Hemoba.**  
**Tel. 0X 71357 – 0900 – Fax. 0xx 71 357 – 2718.**  
**E-mail. Hemoba@hemoba.ba.gov.br**  
**Av. Vasco de Gama, S/N° CEP 40-240-090. Salvador – Bahia.**

## **Encuesta realizada al Doctor Luquetti.**

**luquetti@hc.ufg.br . Rio de Janeiro. Servicio de atención al chagásico.**

Usan el kit de hemaglutinación de POLICHACO, Buenos Aires, pero hay otros disponibles. Para mayores detalles consultar la revista de Patología Tropical, editada en Brasil, disponible en LILACS, 26:343 – 374, 1997, Saez Alquezar et al.

En cuanto al tipo de antígeno que usan, siempre prefieren antígenos brutos y no de recombinantes, en el caso de usar estos, siempre usan una prueba con antígeno total. Para mayores detalles consultar el capítulo de diagnóstico laboratorial en el libro recién publicado de la enfermedad de Chagas de *Trypanosoma cruzi*, de Brener Andrade, 2da edición.

El costo de cada prueba por paciente es alrededor de 1 dólar, pero como siempre se hacen dos pruebas de principios diferentes, el costo es 2 dólares por paciente. La prevalencia de la enfermedad depende de la región y tipo de servicio, es decir para ellos que reciben muestras de posibles chagásicos, llegan a más del 50% confirmados.

Precio del kit, para 5 placas de HAI, aproximadamente 50 dólares. Algunas áreas endémicas de Brasil son:

Ciudad de Goiania en el centro de Brasil.

Montalvania en el estado de Minas Gerais.

Oitis (comunidad en el estado de Piauí).

## Información de empresas donde venden kit de diagnostico

Siqueira Consultoria Empresarial

End. Rua Ipanema- RJ

CEP: 22631 – 390

Tel: (219 325 – 6582 / Fax: (21) 325 - 9996

E-mail: [sce@ax.apc.org](mailto:sce@ax.apc.org)

URL: <http://www.sceconsultoria.com.br>

Consultoría y entrenamiento en el desarrollo de organizaciones, gestiones de calidad total, productividad y costos, diagnóstico artículos sobre calidad, liderazgo y creatividad.

TMD – trade medical diagnósticos Ltda.

END: Rua da Quitanda, 199 sala 1201 – centro

Rio de Janeiro – RJ

CEP: 20091-000

Tel: (21) 283 – 2748 / Fax: (21)263 – 3284

Industria Farmacéutica: Distribuidores

BioLab Merieux S7A Locations

Estrada mapua, 491 Jacarepagua, Rio de Janeiro – RJ, 22710 – 261, Brasil.

Telefono: 55 (21) 4455454

Fax. 55 (21) 4456099

}Laboratorio Gross S/A

End: Rua Padre Idefonso Peñalba, 389

Rio de Janeiro – RJ

CEP: 20775-020

Tel: (21) 597 – 3112 / Fax: (21) 597 – 3112

E – mail: [gross-gd@infolink.com.br](mailto:gross-gd@infolink.com.br)

URL: <http://www.gross.com.br>

Empresa de capital nacional que se dedica en el mercado de productos farmacéuticos.  
Productos de calidad.



## **KIT DE DIAGNOSTICO DISPONIBLES EN EL MERCADO.**

El Kit BIOELISACRUZI ( Biolab-Merieux, Rio de Janeiro, Brasil),

Kit Biozima Chagas (Polychaco S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina).

El inmunoensayo Abbott Chagas ( Abbot Laboratorios do Brasil, Sao Paulo)

Estos tres kits de diagnóstico se utilizan en bancos de sangre de Rio Janeiro, Brasil para diagnosticar la enfermedad de Chagas, usan como prueba serologica Elisas, estos kit comerciales emplean como antígenos extractos del parásito de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, los cuales tienen una especificidad de 93.3% y la sensibilidad es de 97.7%.

ininwal@microbio.ufrj.br Dr Teixeira MD

El Kit IHAT , trata de la hemaglutinación indirecta, utiliza como antígeno un liofilizado de globulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos de *Trypanosoma cruzi*. Este kit consta de cuatro placas y cada una de ellas contiene 96 pozos, es fabricado en el Instituto Adolfo Lutz en Sao Paulo/Brasil. Facultad de Ciencias farmacéuticas

La sensibilidad es 1.00, y la especificidad de 0.98, el valor predictivo positivo de 0.96 y el valor predictivo negativo de 1.00

Otro kit de diagnóstico utilizado en los bancos de sangre de Brasil es The Dia Kit Bio-Chagas assay (Gador S. A). Utilizan tiras horizontales de membranas de nitrocelulosa usando antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Este kit muestra una sensibilidad de 99.1% y una especificidad de 99.6%. Las otras pruebas serológicas empleadas son inmunofluorescencia y hemaglutinación.

Otro Kit es FAST, el ELISA fue estandarizado con el sistema Falcon assay screening tests (FAST), usando fracciones purificadas de epimastigotes de *trypanosoma cruzi*, obtenida por la técnica de cromatografía de intercambio iónico. El ELISA, presentó 96.5% de sensibilidad y 98.7% de especificidad y es usada en bancos de sangre de Brasil.

## **Instituto Oswaldo Cruz comercializa una prueba para el mal de Chagas.**

RIO- Una Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz), va a comenzar a comercializar a partir de Julio un avanzado kit para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya producido en Brasil. El kit desarrollado por la propia Institución, fue aprobado por la organización mundial de la salud (OMS) y laboratorios de varios países, como Estados Unidos, Argentina, Venezuela, Chile y Colombia. Que constara de 100% de eficacia del producto.

Los análisis en el laboratorio de las pruebas fueron hechos con aproximadamente 10 mil muestras de sangre. Los primeros lotes de productos serán destinados a los bancos de sangre. De acuerdo con la OMS, actualmente existen cerca de 17 millones de portadores de mal de Chagas en el mundo, en Brasil hay cerca de 6 millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

## **Información Donada por el Presidente del Instituto Oswaldo Cruz .**

**Carlos Medices Morel.**

En 1987, a partir de una experiencia de levantamiento de actividades realizadas por la FUNDACION OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ, fue publicado un “potencial Tecnológico de FIOCRUZ- catálogos de productos y procesos”.

Desde entonces, en FIOCRUZ tienen diversificado a profundidad su campo de atención en las líneas de investigación en Biotecnología – **Vacunas, kit de diagnóstico, métodos y reactivos para diagnóstico, control de calidad,** insumos, control

biológico de vectores, química fina. Además de aspectos relacionados en otras áreas de conocimiento, en ecología y medio ambiente y desarrollo de equipamientos médico hospitalario.

Estos avances son posibles por la alta y reconocida calidad de profesionales de FIOCRUZ, hacen que las vísperas de completar un siglo de servicios prestados al país, contribuya a que la fundación alcance un reconocimiento nacional e internacional por su capacidad científica y tecnológica, dirigida para una solución de problemas de salud que afectan a la población brasileña.

El trabajo de la institución ha contribuido a obtener rápidas transformaciones que están aconteciendo tanto en el mundo como en nuestro país. Transformaciones que se procesan bajo la denominación de tercera revolución industrial, aunque no se limitan a ella, ya que suman una mudanza de paradigmas políticos, económicos, científicos y tecnológicos y una búsqueda de nuevas condiciones que involucran a los países en desarrollo en el mercado mundial.

El instituto FIOCRUZ presenta una sociedad de publicación "capacitación tecnológica de fundación oswaldo cruz- catalogo de productos y procesos" ofrece productos de tecnología y procesos relacionados en el área de salud.

De esta manera, esperamos que la publicación que estamos presentando se transforme en un instrumento eficaz de generación de nuevas oportunidades y proyectos cooperativos, para que mejor podamos servir al país.

# INFORME

## 1.- BARQUISIMETO, ACARIGUA, SAN FELIPE

En el mercado se han detectado 7 kits para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, de las cuales 3 corresponden a pruebas tipo ELISA, 2 a pruebas RAPIDAS tipo prueba de embarazo, 1 de hemaglutinación indirecta (HAI) y 1 por aglutinación con látex. Los precios oscilan entre 35.000,00 y 376.000,00 además de venir en varias presentaciones (número de pruebas por Kit).

**TABLA A**  
**PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**  
**QUE CIRCULAN ACTUALMENTE EN EL PAÍS.**

PRODUCTO	PRINCIPIO	LABORATORIO	PAIS	No DE PRUEBAS	PRECIO
CHAGATEST LATEX	AGLUTINACION CON LATEX	WIENER LAB	ARGENTINA	100	35.297,00
CHAGATEST HAI	HEMAGLUTINACION INDIRECTA	WIENER LAB	ARGENTINA	96	37.672,00
CHAGATEST ELISA	ELISA	WIENER LAB	ARGENTINA	96	75.000,00
CHAGAS-ACTION	PRUEBA RAPIDA		USA	25x4=100	204.000,00
	PRUEBA RAPIDA		USA	20x5=100	376.720,00
CHAGAS IgG ELISA	ELISA	LABORATORIOS PHARMATEST,C.A.	VENEZUELA	96	75.000,00
TEST ELISA PARA CHAGAS	ELISA	BIOSCHILE Ingeniería Genética S.A.	CHILE	96	83.170,00

Los bancos de sangre de los Hospitales utilizan el *CHAGAS IgG ELISA* de LABORATORIOS PHARMATEST,C.A. debido a que es asignado directamente por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) de Caracas, el resto de los laboratorios y clínicas que realizan pruebas para la detección de la enfermedad de Chagas utilizan diversos kits (ver tabla A).

Las clínicas y laboratorios indicados anteriormente representan menos del 20% de los pacientes a los que se les realizan estas pruebas en las diferentes ciudades (tabla B).

**TABLA B**

**RELACIÓN DE PACIENTES ATENDIDOS AL AÑO EN BANCOS DE SANGRE Y CLÍNICAS/LABORATORIOS PRIVADOS**

CIUDAD	BANCO DE SANGRE HOSPITAL		CLÍNICAS Y LABORATORIOS		TOTAL
	Nº pacientes/año	%	Nº pacientes/año	%	
EL VIGIA	1.387	98,57	20	1,42	1.407
BARQUISIMETO	6.200*	86	864	14	7.064
SAN FELIPE	4.200	94	265	6	4.465
ACARIGUA	300	81	72	19	372
MARACAY	7.000	95,99	292	4	7.292
VALENCIA	17.519	90,76	1.783	9,2	19.302
SAN CARLOS/ TINAQUILLOS	3.156	100	---	---	3.156
<b>TOTAL</b>	<b>39.762</b>	<b>92,34</b>	<b>3.296</b>	<b>7,6</b>	<b>43.058</b>

Nº Laboratorios y clínicas en las que se realiza despistaje de la enfermedad de Chagas: **Barquisimeto**: De 23 solo 6. **Acarigua**: De 9 solo 4. **San Felipe**: De 10 solo 2. **Maracay**: De 35 solo 6. **Valencia**: De 52 solo 8.

\* :Se incluye el HOSPITAL ASCARDIO, un hospital privado que realiza la prueba a 1.200 pacientes al año (17,6%).

Existen diversos criterios en cuanto a la efectividad de los kits, siendo los más cuestionados: *CHAGATEST Látex* y *CHAGATEST HAI* de Laboratorios WIENER (Argentina). Los Bioanalistas de dichos laboratorios y clínicas confían más en los kits cuyo principio es ELISA, aunque ninguno de ellos los han puesto a pruebas frente a otras técnicas como Inmunofluorescencia indirecta o Western blot, (pruebas indicadas por la OMS como necesarias) debido a que carecen de dichos medios.

Algunos laboratorios que intentan ser más serios, utilizan *CHAGATEST HAI* (Hemaglutinación indirecta) o *CHAGATEST Látex* como prueba preliminar (más barato que ELISA) y los positivos son chequeados por *CHAGATEST ELISA* de Laboratorios WIENER o *CHAGAS IgG ELISA* de Laboratorios PHARMATEST, dejando por fuera aquellos posibles pacientes chagásicos que no den reacción con la primera prueba. El Hospital ASCARDIO de Barquisimeto, al parecer esta más consciente de las fallas que presentan los diversos kit, concretamente la Lic. Marielba Jiménez ha probado con sueros de pacientes con hepatitis B el kit *CHAGAS IgG ELISA* de Laboratorios PHARMATEST y ha obtenido positividad, actualmente utiliza un test de BIOSCHILE Ingeniería Genética S.A. con el cual no ha tenido estos inconvenientes, lo interesante de este último laboratorio es que para poder penetrar en el mercado incluyen un lector de ELISA y una micropipeta, mientras la clínica continúe comprando su kit.

La lic. Marielba Jiménez cree que el MSAS basa la elección del kit para detección de la enfermedad de Chagas en el costo más que en la efectividad del mismo. Por otro lado, informó que en el mes de Abril se reunirían en el estado Lara los diferentes grupos de cardiología, y bancos de sangre de los hospitales de todo el país y entre otras cosas se

trataría el tema de los kits para la detección de la enfermedad de Chagas e intentan fijar un criterio común para el uso del que ellos consideren es el más adecuado.

## **2.- MARACAY, VALENCIA, SAN CARLOS.**

Los bancos de sangre de los Hospitales utilizan el *CHAGAS IgG ELISA* de LABORATORIOS PHARMATEST,C.A. asignado directamente por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) de Caracas. Los laboratorios de las Clínicas privadas por su parte utilizan CHATEST de Laboratorios Wiener en sus tres presentaciones (Látex, hemaglutinación Indirecta y ELISA), además de CHAGAS IgG ELISA de Laboratorios Pharmatest,C.A. Otro que es empleado es TEST ELISA para CHAGAS de BIOSCHILE Ingeniería Genética, S.A. No fue detectado otro tipo de kit ni en Maracay ni en Valencia aunque una clínica en Maracay realizaba pruebas serológicas las cuales son las indicadas por la OMS y dijeron desconfiar de los kits del mercado debido a su alta reactividad cruzada con otras enfermedades, una segunda clínica en Valencia empleaba el kit de Pharmatest a pesar de haber obtenido en reiteradas oportunidades reacción cruzada con pacientes positivos para venéreas. Otro ejemplo totalmente distinto lo constituyó una policlínica en Valencia la cual tenía nueve años utilizando el método de *gota gruesa*.

Algo en lo que coinciden muchos laboratorios es que no existen en el mercado diversos kits de donde poder escoger.

En los bancos de sangre de los estados de la zona central, si bien realizan pruebas para detección de la enfermedad de Chagas a un número mayor de personas, el número de laboratorios privados que realizan dicha prueba es considerablemente menor en comparación con los anteriores estados, esto como lo referían los médicos y bioanalistas de Maracay y Valencia es debido a que no son territorios endémicos para esta enfermedad, por lo cual es poco rentable ofrecer esta prueba al público. En Maracay por ejemplo, solo los meses de enero, febrero, marzo y abril es solicitada esta prueba por particulares debido a que es exigida para poder ingresar a la Escuela Militar, sin embargo en el hospital es gratuita por lo que se hace pocos rentable para los laboratorios.

## **INFORME 2:**

### **(MARACAIBO, CARACAS, TRUJILLO, MERIDA 2 Y TACHIRA 1)**

#### **1.-MARACAIBO**

De las 58 clínicas y 11 laboratorios solo 2 de ellos, Laboratorio Clínico Bacteriológico Lerzu C.A. y Laboratorio Soré-Gutiérrez realizan exámenes de despistaje para la enfermedad de Chagas, las demás clínicas y laboratorios que dicen realizar los exámenes en realidad los remiten a estos dos centros, lo cual constituye solo un 4% del total de pacientes atendidos en la región. Un hecho curioso es que existen laboratorios donde los bioanalistas nunca habían escuchado de la enfermedad y otros decían que no hacían el examen pues dicha enfermedad ya estaba erradicada en Venezuela, otros laboratorios dijeron que los reactivos eran muy caros para el poco uso (poca demanda) que se le daría. El resto de las pruebas 96% (24.000 pacientes/año) son realizadas en su mayoría en el **Centro de Hematología de Occidente**, en los 11 hospitales de Maracaibo (3 hospitales tipo IV, 4 tipo III, 4 tipo II y 13 hospitales-centros clínicos que atienden un número muy reducido de donantes) y el resto de la región, que en total suman 16, los exámenes realizados a las muestras de sangre son las rutinarias (hematología) y el resto de exámenes (HIV, Chagas, etc.) eran realizados en el centro antes indicado, la licenciada indicó que inclusive son remitidas muestras sanguíneas de pacientes provenientes de Valera, Estado Trujillo pero que ingresaban en los registros como provenientes del Hospital Universitario. Solo un hospital, el del Seguro Social lo realiza aparte pero este solo representa el 12% (3600 pacientes/año). Sin embargo, en ambos casos tanto el del Seguro Social como el del Centro de hematología de Occidente trabajan con el kit asignado por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (Chagas IgG ELISA de Laboratorios Pharmatest C.A.), los laboratorios indicados al principio utilizaban por el contrario Chagatest HAI y Chagatest ELISA de laboratorios Wiener.

#### **2.-CARACAS**

Caracas cuenta con innumerables centros de recolección de sangre, estos se encuentran distribuidos en los centros que pertenecen al Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) la cual la constituyen los Hospitales que atienden al grueso de la población (tipo IV, III, II), después se encuentran los Hospitales e instituciones adscritas al Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS), en tercer término los Institutos autónomos y en cuarto lugar las clínicas. Tanto los hospitales adscritos al MSAS como los adscritos al IVSS están bajo la supervisión del Doctor Mauricio Salazar Jefe de Hematología perteneciente a la Dirección Nacional de Bancos de Sangre del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS), el cual se encarga de proveer a dichos centros en todo el país del kit ganador de la licitación para dicho periodo, en este caso de CHAGAS IgG ELISA de laboratorios Pharmatest, C.A. En entrevista con el Dr. Salazar, este informó que la licitación de los últimos años habían sido ganadas por laboratorios Pharmates, C.A. debido a una **mejor oferta** presentada por esta empresa, además dio algunas cifras con respecto al número de donantes registrados por el MSDS en Venezuela para el año 1999, además del porcentaje de positividad para la enfermedad de Chagas detectada por este Ministerio (Ver tablas I y II).



**TABLA I**

<b>DONANTES DE SANGRE. MSDS. VENEZUELA. 1999</b>		
<b>DONANTES</b>	<b>NÚMERO</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
ATENDIDOS	410.729	100
ACEPTADOS	302.100	73,55
DIFERIDOS	45.495	11,07
DESCARTADOS	11.342	2,76

**TABLA II**

<b>SEROPREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. DONANTES DE SANGRE. MSDS. VENEZUELA. 1999</b>				
<b>MARCADOR SEROLOGICO</b>	<b>PRUEBAS REALIZADAS</b>	<b>SEROLOGIA POSITIVA</b>		<b>COBERTURA %</b>
		<b>N</b>	<b>%</b>	
CHAGAS	302.100	1833	0,60	100

De estos datos se desprenden dos puntos que deben ser considerados, por un lado existen de acuerdo a lo expresado por muchos bioanalistas una población que esta siendo reportada como positivos para la enfermedad de Chagas debido a la reacción cruzada que los kit de Pharmatest y sobretodo Wiener, dan para otras enfermedades, y por otra parte que en este reporte solo esta expresada aquella población de crónicos que actúan como donantes voluntarios y a los cuales se puede detectar por los métodos que actualmente circulan en el mercado y sobre todo aquellos que lo dominan (Pharmatest y Wiener ) no incluyéndose poblaciones rurales enteras que al no actuar como donantes no entran en la estadística oficial.

En Caracas se detectaron solo 3 Kit, que correspondían a pruebas tipo ELISA, de los Laboratorios Pharmatest, C.A. (Venezuela), Laboratorios Wiener (Argentina) y BiosChile, S.A. (Chile). El primero atendiendo a un número aproximado de 50.499 pacientes (543 kit), el segundo a 30.690 pacientes (330 kit) y el tercero a 15.810 pacientes (170 kit) para un total de aproximadamente 96.999 pacientes al año (1043 kit). Por su parte el porcentaje de pacientes detectado en esta ciudad para la enfermedad de Chagas fue muy bajo, encontrándose entre un 0,7-0,9%.

**CHAGAS IgG ELISA** de laboratorios Pharmatest, C.A. es una prueba ELISA que utiliza como antígeno un extracto de parásitos.

**CHAGATEST IgG ELISA** de laboratorios Wiener viene en tres presentaciones: Aglutinación por látex, Hemaglutinación indirecta (HAI) que emplea como antígeno un liofilizado de glóbulos rojos de carnero y ELISA.

**TEST ELISA PARA CHAGAS** de BiosChile S.A. es una prueba ELISA que utiliza como antígeno un extracto de dos cepas de *T. cruzi*.

### 3.- TRUJILLO

Por su parte en el estado Trujillo se detectó solo la utilización de CHAGAS IgG ELISA de laboratorios Pharmatest, C.A., sin embargo la población que es atendida en los tres centros principales: Hospital "José Gregorio Hernández"(Tipo III), Hospital "Pedro Emilio Carrillo"(III) y el Hospital "Rafael Rangel"(II) es de 2880 donantes/pacientes al año. No se realizó averiguaciones en Clínicas y Laboratorios de la zona, pero el bajo número de

donantes/pacientes hace suponer una poca demanda en esta región, a pesar de presentar un 10% de casos positivos para la enfermedad e Chagas.

#### **4.- MERIDA 2:**

Los datos presentados corresponden al Hospital Universitario de Los Andes en la ciudad de Mérida, en esta se presenta una población de aproximadamente 6000 donantes al año y la utilización de CHAGAS IgG ELISA de laboratorios Pharmatest, C.A. Los datos del resto de la ciudad, así como de El Vigía así como del Hospital San José de Tovar fueron entregados en el informe anterior.

#### **5.- TÁCHIRA 1:**

Esta única información obtenida corresponde solo al muestreo en una sola institución hospitalaria como lo es el Hospital Central de San Cristóbal (único hospital tipo IV de la región). En ella como era de esperar se utiliza también CHAGAS IgG ELISA de laboratorios Pharmatest, C.A para un total de 4000 donantes al año.

**ANEXO 4**  
**ESTUDIO DE PRE-FACTIBILIDAD TÉCNICA**

## MATERIALES Y METODOS

**Muestras de sueros.** Las muestras de suero humanas infectadas con *T. cruzi* y Leishmania cutánea y visceral obtenidas del Hospital Universitario (HULA) de Mérida, Banco de Sangre de Barinas Venezuela y de Bancos de Sangre Bahía Brasil. Los sueros de otras enfermedades fueron donados por el Instituto de Inmunología Luis Pasteur (HULA) Mérida-Venezuela. Los sueros humanos normales fueron obtenidos de voluntarios de la Universidad de Los Andes.

**Obtención de proteínas de la membrana del glicosoma (PGM).** Epimastigotes obtenidos de fase exponencial en medio LIT ( $4-7 \times 10^9$  células) fueron homogeneizadas y fraccionados; las células fueron colectadas a  $300 \times g$  por 10 min y lavadas dos veces en buffer A (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA 250 mM sacarosa) y rotas por abrasión en una mezcla 1:1 (wt:wt) de células con carburo de silicon (200 mesh) en un mortero frío para producir un homogenato que fue diluido en 100 ml de buffer B (10 mM Hepes pH 7.2, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM de ditioneitol) en la presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas. El homogenato fue centrifugado a  $1000g$  por 10 min para remover células no rotas y núcleos y entonces se centrifugo  $5000g$  por 10 min, el cual produce una fraccion granular gruesa; un pellet granular pequeño fue obtenido a  $33,000g$  por 15 min, lavado dos veces en buffer B , y aplicado a un gradiente lineal de sacarosa (0.3-2.5 M) el cual fue centrifugado a  $170,000g$  por 2 horas en un rotor vertical. La banda rica en glicosomas ( $1.21-1.25 \text{ g cm}^{-3}$ ) fue obtenida pinchando lateralmente el tubo del gradiente para obtener los glicosomas purificados. El exceso de sacarosa fue eliminados al diluir los glicosomas obtenidos del gradiente tres veces con buffer B y centrifugando a  $33,000g$  por 15 min, el sedimento (glicosomas) fue resuspendido en un volumen mínimo de buffer B en presencia del cocktail de inhibidores, seguidamente se determino la latencia del glicosoma midiendo actividad HK en presencia de 0.1% de Tritón X-100 y 150 mM de NaCl y en ausencia del detergente; de esta forma determinamos la integridad de la organela. Cuando los glicosomas tuvieron una latencia mayor del

90%, ellos fueron tratados con 2% del detergente no ionico Tritón X-114, para hacer una separación de fases a temperatura fisiológica de 28°C por 10 min, después las muestras fueron centrifugadas a 300g por 5 min y la fraccion soluble se descarto y la rica en detergente se trato con acetona fría y se centrifugo a 10,000g por 10 min para eliminar el Tritón X-114 y los lípidos. La muestra de proteínas se dializo toda la noche a 5°C con buffer C (Tris-HCl, pH 7.5, y 150 mM de NaCl). Las proteínas dializadas a partir de la fraccion rica en detergente fueron denominadas PMG.

**Obtención de clones de cDNA.** Los siguientes anticuerpos fueron específicos contra las proteínas de la membrana del glicosoma (PMG): (I) Anticuerpos anti-PMG obtenidos de un conejo iperimmunizado se diluyo 1/10000, a esta dilución únicamente reconoce proteínas de la membrana del glicosoma específicamente, (II) anticuerpos purificados por afinidad desde sueros de pacientes chagasicos crónicos específicos para la PMG entre 10 y 40 kDa. Este ultimo fue preparado incubando el suero diluido 1/1000 en Blotto (5% de leche descremada en Buffer Tris-Salino, con una región del inmunoblot conteniendo antígenos de las PMG entre 10 y 40 kDa, se realizaron extensivos lavados de el blot con buffer Tris-Salino, la elución de los anticuerpos enlazados específicamente, se hizo con 0.2 M de glicina (pH 4.8), y los anticuerpos eluidos fueron neutralizados con un volumen igual de 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.5). Los dos anticuerpos obtenidos fueron usados para un scrining en paralelo con una librería de expresión de cDNA de epimastigotes de la cepa EP de *T. cruzi* en  $\lambda$ UNIZAP (Stratagene, La Jolla, Calif). Los clones que reaccionaron con ambas preparaciones de anticuerpos fueron plaqueados y purificados después de tres o cuatro rondas de inmunoescrining con los sueros diluidos, y el plasmido fue obtenido desde el fago usando el protocolo de excisión *in vivo* provisto por la casa manufacturera. Los insertos de 11 clones obtenidos fueron pasados a pUC para ser secuenciados por el método de Sanger en un secuenciador automático.

**Ingeniería y producción de las proteínas de fusión.** A causa de que los cDNA en  $\lambda$ UNIZAP son clonados unidireccionalmente y que están flanqueados por sitios de restricción 5' EcoRI y 3' XhoI, los vectores de expresión pGEX-2T GST y pHis fueron modificados para permitir un subclonaje fácil de los insertos de cDNA desde  $\lambda$ UNIZAP, reemplazando una porción del sitio de multiclonaje del vector con un oligonucleótido doble-banda conteniendo los sitios de corte de EcoRI y XhoI en la orientación apropiada y en el marco de lectura correcto. Los insertos de cDNA fueron subclonados dentro de estos nuevos vectores, pGEX-2TL y pHis y la producción y purificación de las proteínas recombinantes fue hecha por cromatografía de afinidad glutatión y níquel de acuerdo a las recomendaciones de las casas comerciales. Las proteínas recombinantes purificadas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliadrilamida (SDS-PAGE) y teñidas con azul de Comassie y cuando se determinó que estaban más del 95% puras se usaron para los análisis de inmunoblot y ELISAs. La concentración de proteínas fue determinada por Lowry, y las proteínas purificadas fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

**Preparación de proteínas.** Epimastigotes de *T. cruzi* fueron cosechados por centrifugación a 3.000 x g por 10 min y los lisados fueron obtenidos por ebullición por 8 min en 2x de Laemmli sampler buffer. Los lisados de *Escherichia coli* fueron hechos de la misma forma.

**Análisis por Inmunoblot.** SDS-PAGE uni-dimencional fue realizado y transferido a nitrocelulosa. Para el análisis de inmunoblot, los sueros humanos fueron usados a una dilución de 1/1000 en el Blotto y el anti-clon 1 y 2 fue usado a una dilución de 1/5000. La incubación con los anticuerpos secundarios fue realizado con un anti Fc de conejo y humano producidos en chivo y conjugado a la peroxidasa, diluido 1/5000 y 1/6000 respectivamente, en el blotto. Los inmunoblotin fueron revelados con diaminobenzidina más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS pH 7.5, la reacción fue detenida lavando varias veces con agua destilada.

**Análisis por Slot blot.** Los antígenos recombinantes 1 y 2 fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa por filtración con un equipo de Slot blot (Hoefer). Del clon 1 se transfirieron 0.5  $\mu\text{g}$  de proteínas y 0.7  $\mu\text{g}$  de proteínas del clon 2 (previamente se había estandarizado las concentraciones de proteínas necesarias para ambos clones de tal forma de obtener la misma intensidad de bandas al ser revelados usando sueros de pacientes chagasicos), la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada, lavada y las mismas diluciones de los sueros primarios y secundarios de igual forma a como se hizo para el inmunoblot.

**ELISA proteínas recombinantes.** 100  $\mu\text{l}$  con 0.5  $\mu\text{g}$  del clon 1 y 100  $\mu\text{l}$  con 0.7  $\mu\text{g}$  del clon 2 en buffer-fosfato salino (PBS: 137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.9 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [pH 7.5]) fueron añadidos a cada pozo de la placa de ELISA (placas de 96 pozos), y la placa fue incubada toda la noche a 4  $^\circ\text{C}$ , para permitir fijar a los antígenos en todos los pozos. La placa fue lavada cuatro veces con PBS conteniendo 0.05% de Tween 20 (PBST). La mezcla de bloqueo fue añadida a los pozos, y la placa fue incubada a 37 $^\circ\text{C}$  por 1 hora, después fue lavada nuevamente con PBST. Las muestras de los sueros humanos (100  $\mu\text{l}$  a una dilución de 1/400) fue añadido a la placa, y fue incubado por una horas a 37  $^\circ\text{C}$ , seguidamente los pozos fueron lavados con PBST. Un conjugado peroxidasa-anti IgG humano producido en chivo ( 50  $\mu\text{l}$  a una dilución 1/10000 en mezcla de bloqueo) fue añadido a la placa, y esta fue incubada por dos horas a 37  $^\circ\text{C}$ . Después la placa fue lavada con mas PBST, la placa fue desarrollada añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de una solución conteniendo 5 mg de OPD (Sigma) en 100 ml de PBS y 100  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrogeno. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad la reacción fue detenida con 0.1 N de ácido sulfúrico y la placa fue leída a 410 nm en un lector de microplacas de ELISA.

## RESULTADOS

Seis clones recombinantes fueron obtenidos desde una librería de cDNA de epimastigotes en  $\lambda$ UNIZAP (1, 2, 3, 4, 5 y 6), secuenciados y subclonados en los vectores de sobreexpresión pHis y pGEX. Los antígenos recombinantes de *T. cruzi* fueron expresados como una proteína de fusión poli-His. Estos clones en las bacterias fueron identificados usando anticuerpos anti-proteínas de la membrana del glicosoma (PGM). La expresión y purificación de los antígenos recombinantes tanto en condiciones nativas como desnaturizantes se realizó por una columna de afinidad a metales ( $\text{Ni}^{++}$ ) como se describe en Materiales y Métodos. A pesar de que el vector de expresión pGEX también se lograron sobreexpresar algunos clones, ninguno de ellos se logró purificar por la columna de afinidad Glutathione (GTS), además estos clones en los pGEX se expresaron de forma insoluble formando cuerpos de inclusión.

Se intentó la sobreexpresión de los seis antígenos, a partir de los 6 clones previamente obtenidos, a fin de poder purificar con facilidad las proteínas correspondientes. Para este fin se subclonaron los genes y se probaron diferentes estrategias de sobreexpresión. Hasta la fecha solo los clones 1 y 2 se lograron sobreexpresar y purificar a homogeneidad, tanto en condiciones nativas como desnaturizantes. La producción de las proteínas de fusión fue entre 50 y 70 mg/L de cultivo. La masa molecular relativa de los antígenos de fusión pHis-*T. cruzi* purificados 1 y 2 (fue calculado en SDS-PAGE 12%) fueron los esperados de las regiones codificantes del inserto correspondiente más 5 kDa para el pHis (Fig. 1), o sea 24 y 30 kDa respectivamente. Ambas proteínas de fusión reaccionan por análisis de Western Blot con antisueros anti-PGM (Fig. 2).

Con los clones 3, 4, 5 y 6 le estamos eliminando regiones del amino terminal para tratar de sobreexpresarlos y purificarlos para usarlos como antígenos



recombinantes, de hecho para los momentos actuales ya tenemos algunos adelantos (resultados no mostrados).

Membranas de nitrocelulosa con líneas individuales de antígenos de *T. cruzi* 1 y 2 como proteínas de fusión pHis y una línea de IgG humana mas pHis-Cat fue incubado como se dice en Materiales y Métodos, con 40 sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* en fase crónica (miocarditis chagastica), 10 sueros de pacientes con Leishmaniasis cutánea, 12 sueros de pacientes con Tuberculosis, 10 sueros de pacientes con Malaria y 15 sueros controles de personas sanas Fig. 3. Los porcentajes de los sueros de los pacientes chagasicos y de las otras enfermedades fueron discriminados como positivos para cada uno de los antígenos recombinantes como es presentado en la Fig. 4. Todos los sueros positivos a la enfermedad de Chagas reaccionaron con ambas proteínas de fusión pHis recombinante, mientras que ningún suero de las otras enfermedades reaccionaron con ellas y la pHis-Cat tampoco fue reconocida por ninguno de los sueros.

### **Control de absorción de las proteínas recombinantes en los Test Strip de nitrocelulosa**

El proceso usado para obtener las test strip con resultados reproducibles fue elaborado aplicando 0.5  $\mu\text{g}$  del antígeno recombinante uno y 0.7  $\mu\text{g}$  del antígeno recombinante dos, en buffer PBS por separado, a una distancia de 5 mm con un Slot-blot sobre laminas de nitro celulosa. Con estas cantidades de antígeno se logro que las intensidades de las bandas fueran similares para todos los sueros chagasicos ensayados. Esto significa que la absorción de estos antígenos bajo estas condiciones de transferencia sobre la nitrocelulosa fueron similares e independiente de los tiempos de incubación en PBS de 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas de incubación, es decir los resultados fueron similares sin diferencias significativas. En los momentos actuales estamos haciendo pruebas de estabilidad

de estos antígenos recombinantes en el tiempo (un año) y a diferentes temperaturas (- 20°C, 5°C y temperatura ambiente).

### **Determinación de Sensibilidad y Especificidad con los Test Strip**

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos con las proteínas de fusión 1 y 2 por el método de Test Strip y los resultados combinados de IFA y ELISA, estos dos últimos fueron tratados de igual forma para las lecturas positivas y negativas. Todos los 40 sueros de pacientes chagasicos y comprobados clínicamente dieron positivos para las dos proteínas recombinantes y ninguna reacción cruzada fue observada para los sueros de las otras enfermedades. Sin embargo, cuando los sueros de las otras enfermedades fueron evaluados por ELISA e IFA se encontró reacción cruzada, es decir falsos positivos.

Estos resultados muestran una especificidad y sensibilidad del 100% con este método usando las proteínas recombinantes 1 y 2, a diferencia de los antígenos (extractos del parásito) o parásitos enteros comúnmente usados como antígenos para los ensayos de diagnóstico por ELISA e IFA. Los cuales dan como resultado una baja especificidad y sensibilidad, debido a la obtención de falsos positivos y negativos.

### **Desarrollo de serodiagnóstico por ELISA basado en los antígenos recombinantes 1 y 2.**

Para evaluar la capacidad individual de las proteínas recombinantes-pHis para distinguir entre un gran número de sueros de pacientes infectados-*T-cruzi* y no infectados, se desarrollaron ELISA con las proteínas de fusión-pHis 1 y 2 individualmente (ver Materiales y Métodos). Se evaluaron 40 sueros de pacientes chagasicos crónicos provenientes de Bahía Brasil, 30 sueros chagasicos crónicos donados por el HULA Mérida Venezuela, 12 sueros de pacientes con Leishmaniasis cutánea y 5 con Leishmaniasis visceral, 10 sueros de pacientes

con Sífilis, 12 sueros de pacientes con Tuberculosis, 5 sueros de pacientes con Lupus Eritimatoso, 12 sueros de pacientes con Malaria, 11 sueros de pacientes con Lepra y 10 sueros con Toxoplasmosis. Setenta de los 70 sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* dieron reactividades mayores de 0.160 de densidad óptica a 410 nm ( $DO_{410}$ ) unidades, independientemente de cepas y áreas geográficas (Venezuela y Brasil), mientras que ninguno de los sueros humanos no infectados da reactividades mayores de 0.075 unidades de  $DO_{410}$  Fig 5. Un análisis no paramétrico muestra que la diferencia entre los datos de reactividad para las proteínas de fusión 1 y 2 con sueros chagasicos y sueros control son altamente significativas (chagasicos versus sueros no infectados,  $P = 0.0002$ ; chagasicos versus Leishmaniasis,  $P = 0.008$ ). Cuando se usa un valor de cutoff de 0.1 ( $\odot \pm 4$  DS) unidades de  $DO_{410}$ , el ELISA es 100% sensible y específico con las dos proteínas recombinantes para distinguir entre sueros chagasicos y no chagasicos. Así que estos dos antígenos recombinantes pueden ser usados en pruebas de ELISA, ya que son altamente específicos y sensibles para el serodiagnostico de infecciones por *T. cruzi*.

Con los dos antígenos recombinantes 1 y 2 hemos ensayados por ELISA 120 sueros de donantes de sangre (Banco de Sangre de Barinas-Venezuela), los cuales fueron diagnosticados como positivos usando un Kit por ELISA (Farmatec disponible en el mercado venezolano). Con los dos antígenos recombinantes se encontró que únicamente 65 de ellos dieron positivos a infecciones con *T. cruzi* y 55 negativos. Estos resultados fueron corroborados posteriormente por estudios clínicos (cardiología), inmunofluorescencia (IFA), Fijación de Complemento (FC) y Hemoaglutinación (HAG). Estos resultados fueron muy satisfactorios, ya que con una sola prueba (ELISA) usando los antígenos recombinantes se pueden descartar pacientes chagasicos de no chagasicos con sensibilidad y especificidad del 100%

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La serología de infecciones por *T. cruzi* que normalmente se usan para el diagnóstico resultan poco confiables, ya que producen muchos falsos positivos y falsos negativos y por lo cual es necesario usar diferentes ensayos de diagnóstico (ELISA, IFA, FC, HAG, Xenodiagnóstico y Cardiología) para confirmar o descartar infecciones por *T. cruzi*. Hacer todas estas pruebas es muy costoso, además se necesita de un personal especializado y equipos de laboratorios costosos y por otra parte se someten a los pacientes a un estrés psicológico durante las pruebas, es más en muchos casos se someten a los pacientes (falsos positivos) a quimioterapia con efectos secundarios muy nocivos. A esto también se puede añadir que al tratar a los verdaderos positivos con quimioterapia es difícil saber cuando se interrumpe la quimioterapia, por que no se sabe si habido cura parasitológica por los métodos serológicos usando los antígenos disponibles en el mercado actual.

Estos antígenos de *T. cruzi* expresados como una proteína de fusión en los vectores pHis muestran que (a) la fracción pHis-Cat del péptido de fusión no reacciona con ninguno de los sueros chagásicos; (b) el uso de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* no dieron reactividad con los sueros normales, ni con otras enfermedades indicando una purificación efectiva, proceso que evita la detección de anticuerpos humanos anti *E. coli*; y (c) la producción de antígenos de fusión recombinantes pHis-*T. cruzi* purificados fue entre 60-70 mg/L de cultivo de una forma simple, rápida, económica y un procedimiento de purificación efectivo.

Estos antígenos recombinantes 1 y 2 son antígenos de *T. cruzi* altamente inmunogénicos, por la alta sensibilidad y especificidad mostrados por ELISA y por Dot-Spot para el diagnóstico de infecciones de *T. cruzi*, ya que hubo una alta producción de títulos de anticuerpos específicos para estos antígenos, condición necesaria para hacer estudios serológicos. Es importante señalar que estos

antígenos no presentaron ninguna variabilidad con los sueros de pacientes chagasicos, lo que significa que ellos están presentes en todos los aislados (sueros de pacientes chagasicos) e independientes de la procedencia del área geográfica (Brasil y Venezuela). Por otra parte las proteínas 1 y 2 no dieron ningún tipo de reacción cruzada con sueros de pacientes con Leishmaniasis cutánea y visceral, enfermedad que normalmente esta solapada con las áreas endémicas de *T. cruzi*.

Estas proteínas de fusión recombinantes pudieran ser **antígenos ideales** para el serodianoóstico de la enfermedad de Chagas: (a) cien por ciento de sensibilidad y especificidad; (b) están presentes en todos los estadios morfológicos del parásito (amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes); (c) están presentes en todos los aislados de *Trypanosoma cruzi*; (d) hay elevados títulos de anticuerpos en todos los sueros chagasicos analizados independientemente de su procedencia (área geográfica) y (e) no dan falsos positivos y negativos con sueros sanos y otras enfermedades.

En principio estos dos antígenos recombinantes y otros en vía de sobreexpresión se van a ensayar en un **kit ( test-strip) para el diagnostico de la enfermedad de Chagas**, por ser altamente específicos y sensibles y que se pueda utilizar directamente, sin la necesidad de equipos en áreas rurales, para poder atender a la población en forma directa. Para el despistaje en los bancos de sangre se desarrollara microplacas de ELISA sensibilizadas con los antígenos recombinantes.

La innovación fundamental de nuestra propuesta del kit es el origen de los antígenos. Mientras los antígenos comúnmente usados para el diagnostico de la enfermedad de Chagas provienen de extractos de epimastigotes, los antígenos recombinantes 1 y 2 provienen de la membrana del glicosoma: (a) La especificidad de estos antígenos, ya que el glicosoma es una organela única encontrada en los kinetoplastidae; (b) Estos antígenos recombinantes son universales para el

comercio por detectar infecciones por *T. cruzi*, independientemente del aislado o área geográfica; y (c) Alta sensibilidad, ya que los sueros de pacientes Chagasicos presentan altos títulos de anticuerpos para estos dos antígenos recombinantes, detectando únicamente a los pacientes Chagasicos.

Las expectativas de mercado para este kit en desarrollo son muy buenas (ver informe de mercado). Este kit se puede usar en : (a) Epidemiología en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en toda Latino América y despistajes sistemáticos en hospitales; (b) Seguimiento de aquellas personas que están recibiendo o han recibido tratamiento quimioterapéutico; (c) Vigilancia en bancos de sangre, no solo en Latino América, sino también de países del Norte (USA), mercado aun en fase emergente.