

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD
DE CHAGAS UTILIZANDO MUESTRAS DE
SANGRE EN PAPEL FILTRO

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

VERONICA MARICELA GARCIA ROBLES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979

ADQ M. T. [REDACTED]

135

FECHA _____

PROG. _____



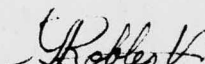
JURADO ASIGNADO PRESIDENTE: Prof. Rafael Santana Mondragón.
ORIGINALMENTE VOCAL: Prof. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta.
SEGUN EL TEMA. SECRETARIO: Prof. Paz Ma. Salazar Schettino.
1er. SUPLENTE: Prof. Salvador Martín Sosa.
2o. SUPLENTE: Prof. Oscar Velasco Castrejón.

SITIO DONDE SE Laboratorios de Inmunoparasitología y
DESARROLLO EL Protozoología del Departamento de
TEMA. Ecología Humana, Facultad de Medicina,
U. N. A. M.

NOMBRE COMPLETO

Y FIRMA DEL


SUSTENTANTE.


Verónica Maricela García Robles.

NOMBRE COMPLETO

Y FIRMA DEL

ASESOR DEL TEMA.


Dra. Paz María Salazar Schettino.


JURADO ASIGNADO PRESIDENTE: Prof. Rafael Santana Mondragón.
ORIGINALMENTE VOCAL: Prof. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta.
SEGUN EL TEMA. SECRETARIO: Prof. Paz Ma. Salazar Schettino.
1er. SUPLENTE: Prof. Salvador Martín Sosa.
2o. SUPLENTE: Prof. Oscar Velasco Castrejón.

SITIO DONDE SE Laboratorios de Inmunoparasitología y
DESARROLLO EL Protozoología del Departamento de
TEMA. Ecología Humana, Facultad de Medicina,
U. N. A. M.

NOMBRE COMPLETO

Y FIRMA DEL

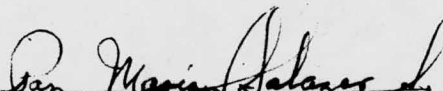
SUSTENTANTE.


Verónica Maricela García Robles.

NOMBRE COMPLETO

Y FIRMA DEL

ASESOR DEL TEMA.


Dra. Paz María Salazar Schettino.

DEDICO LA PRESENTE TESIS:

A MI ABUELA

SRA. ELOISA MACIAS RODRIGUEZ,

Como un homenaje a quien hizo

posible la realización de mis estudios.

A MI MADRE

SRA. SILVIA ROBLES MACIAS,

Con el cariño de siempre.

A MIS HERMANOS

LUIS ANTONIO

Y

JUAN MANUEL

Con afecto.

A
CARLOS
CON AMOR

A MIS TIOS

DR. RAUL ROBLES MACIAS
LIC. LUIS ROBLES MACIAS

Por su apoyo moral.

A TODOS MIS PRIMOS Y TIAS

Con estimación.

AL DR. MANUEL GUTIERREZ QUIROZ

Con agradecimiento por su

valiosa ayuda Técnica y Científica.

A LA DRA. PAZ MARIA SALAZAR SCHETTINO

Por haberme dirigido tan acertadamente durante

la realización del presente trabajo de tesis.

A LA Q. F. B. IRENE DE HARO ARTEAGA

Con gratitud por las numerosas revisiones

que efectuó a mi Tesis.

I N D I C E

		PAGINA
CAPITULO I.	INTRODUCCION	1
	1. 1. La Enfermedad de Chagas.	1
	1. 1. 1. Distribución.	1
	1. 1. 2. Agente Etiológico.	2
	1. 1. 3. Ciclo Biológico de <u>Trypanosoma cruzi.</u>	5
	1. 1. 4. Transmisor.	6
	1. 1. 5. Patogenia y Patología.	7
	1. 1. 6. Diagnóstico.	9
	1. 2. Antecedentes sobre estudios serológicos efectuados con muestras de sangre en papel filtro.	13
	1. 3. La prueba de Hemaglutinación Indirecta.	18
	1. 3. 1. Generalidades.	18
	1. 3. 2. Principio de la Reacción.	20
	1. 3. 3. Esquema de la Reacción.	22
CAPITULO II.	OBJETIVOS.	23
CAPITULO III.	MATERIAL Y METODOS.	24
CAPITULO IV.	RESULTADOS.	44
CAPITULO V.	COMENTARIOS.	58
CAPITULO VI.	CONCLUSIONES.	63
CAPITULO VII.	RESUMEN.	64
CAPITULO VIII.	BIBLIOGRAFIA.	65

CAPITULO I.

INTRODUCCION.

1. 1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

1. 1. 1. DISTRIBUCION.

La Enfermedad de Chagas es un problema que reviste características importantes de Salud Pública, ya que Trypanosoma cruzi está distribuido ampliamente en América, desde Canadá, hasta el sur de Argentina. Se han encontrado casos de Enfermedad de Chagas en Brasil, Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Guayana Francesa, Venezuela, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Estados Unidos y Canadá. En varios países sudamericanos se han - efectuado encuestas en gran escala, con las que se ha podido es- tablecer que la infección ocurre en el hombre con gran frecuen- cia y que la tripanosomiasis americana no sólo produce enfermedad, sino que frecuentemente causa la muerte.

Se ha observado que la Enfermedad de Chagas es relati- vamente frecuente en México ya que se han encontrado casos hu- manos de este padecimiento en Oaxaca, Michoacán, Guerrero, - Yucatán, Tabasco, Morelos, Chiapas, Jalisco, Zacatecas, Nayarit, Sonora, Estado de México y Veracruz, pero es muy poco conocida debido a la falta de encuestas epidemiológicas y al escaso conocimiento de la enfermedad por parte del personal médico --

(22) (32) (34) (39) (50) (51).

Epidemiológicamente la Enfermedad de Chagas es el resultado de la interacción de Trypanosoma cruzi y el huésped susceptible, contenidos ambos en un medio ambiente propicio que los pone en contacto, favorecido éste por la existencia de los múltiples mecanismos de transmisión.

En estudios epidemiológicos se estudian las poblaciones, con el objeto de localizar zonas endémicas; individuos que han estado en contacto con T. cruzi; personas susceptibles de contraer la enfermedad; transmisores infectados y medio ambiente propicio para la infección. El conocimiento de estos ele-mentos es fundamental para evitar la aparición de la enferme-dad en áreas no endémicas, para evitar el riesgo de propaga--ción y para establecer los sistemas de control más convenien-tes. Los estudios en las poblaciones se efectúan por medio de métodos parasitológicos, por las manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y radiológicas del paciente y por estudios serológicos.

1. 1. 2. AGENTE ETIOLOGICO.

El agente etiológico de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es Trypanosoma cruzi, el cual pertenece al:

Reino	Animalia
Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Mastigophora

Clase	Zoomastigophorea
Género	<u>Trypanosoma</u>
Especie	<u>cruzi</u>

Desde el punto de vista morfológico, esta especie de trypanosoma vive en la sangre como tripomastigote (trypanosoma); en cambio en las células del tejido reticuloendotelial y de otros tejidos se le encuentra en forma de amastigote (leishmania), en los medios de cultivo se le encuentra bajo la forma de promastigote (leptomonas) formando generalmente conglomerados en forma de roseta y en el intestino posterior del transmisor se le encuentra en forma de epimastigote (crithidia) y como tripomastigote metacíclico.

En la sangre, T. cruzi es fusiforme, mide alrededor de 20 micras de largo por 3 a 7 micras de ancho; presenta un núcleo situado en el centro del cuerpo y un cinetoplasto voluminoso, el cual consta de un blefaroplasto puntiforme y de un corpúsculo parabasal ovoide y de mayor tamaño. La raíz del flagelo, el axoma, nace en el blefaroplasto y se extiende por el borde de una delgada membrana ondulante que tiene pocos pliegues y sale por el extremo anterior del cuerpo como flagelo libre. Esta forma de tripomastigote no se multiplica en la sangre (Figura 1).

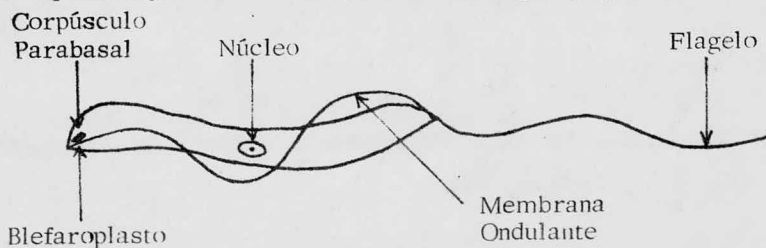


Figura 1. - Tripomastigote.

Las formas de amastigote son redondas u ovoides, con un diámetro de alrededor de 2 a 4 micras, su protoplasma con tiene un núcleo, un cinetoplasto con aspecto de bacilo y un rizoplasto colocado perpendicularmente al cinetoplasto (Fig. 2). Estas formas son parásitos intracelulares de músculo estriado y liso. En músculo (especialmente en corazón) se agrupan en racimos formados por divisiones sucesivas de un espécimen y su progenitor, a estos racimos se les conoce como pseudoquistes o nidos de amastigotes.

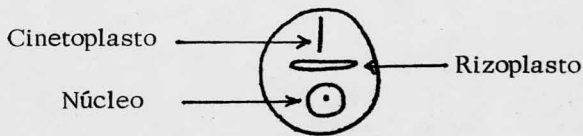


Figura 2. - Forma de amastigote.

Las formas de promastigote miden de 14 a 20 micras de largo, por 1.5 a 4 micras de ancho. Tienen un núcleo central, un blefaroplasto colocado en posición anterior al núcleo, del cual se origina un flagelo libre (Fig. 3).

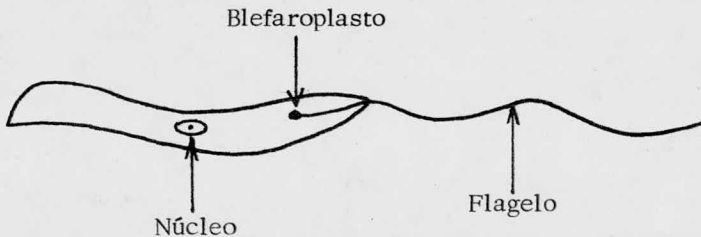


Figura 3. - Forma de promastigote.

Las formas de epimastigote miden alrededor de 20 a 25 micras de largo por 2 a 4 de ancho, constan de un cinetoplasto en el extremo anterior y un núcleo en posición central, su blefaroplasto está situado muy cerca del núcleo. El flagelo forma una pequeña membrana ondulante antes de emerger libremente (Fig. 4) (6) (16) (46) (51).

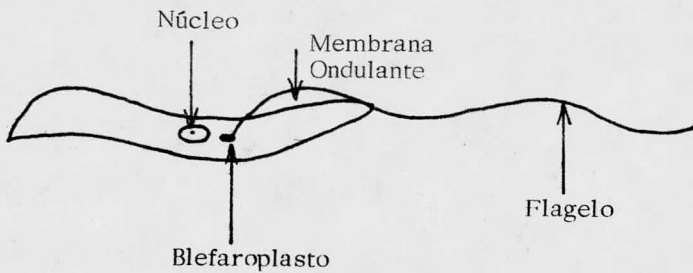


Figura 4. Forma de epimastigote.

1. 1. 3. CICLO BIOLÓGICO DE TRIPANOSOMA CRUZI.

El ciclo de vida de T. cruzi comprende dos fases de desarrollo: una en el hombre o huéspedes mamíferos reservorios y otra en el transmisor (Fig. 5).

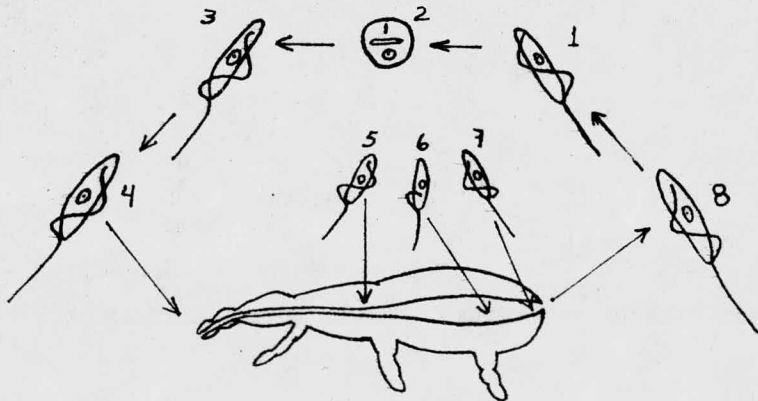


Figura 5. - Ciclo biológico de T. cruzi.

1. Forma de tripomastigote en sangre de mamíferos.
2. Forma de amastigote en histiocitos.
3. Forma de tripomastigote en sangre, derivado de amastigotes intracelulares.
4. Forma de tripomastigote succionado por el transmisor.
5. Forma de tripomastigote en el intestino medio del transmisor
6. Forma de epimastigote en el intestino posterior del transmisor
7. Tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del transmisor.
8. Tripomastigotes metacíclicos excretados con las heces del transmisor, infectante para los mamíferos (6) (16).

1. 1. 4. TRANSMISION.

Se han descrito como transmisores de T. cruzi, a reducidos pertenecientes principalmente a los géneros Triatoma, Rhodnius, Dipetalogaster y Panstrongylus. Algunas especies tienen marcados hábitos intradomiciliarios, habiéndoseles encontrado en grietas, orificios y en techos de paja y palma de las casas o chozas de adobe, principalmente en las localidades suburbanas y rurales.

En áreas endémicas, la transmisión de la enfermedad ocurre fácilmente cuando están presentes el hombre susceptible a la infección, transmisores de hábitos intradomiciliarios y los parásitos viables. Sin embargo, no hay dependencia exclusiva del transmisor para que ocurra la infección ya que existen otros mecanismos de infección como son: la transfusión sanguínea, por vía transplacentaria, -

por lactancia, accidentes por manejo y sacrificio de animales parasitados, ingestión del transmisor infectado por animales o el hombre, etc. (4) (6) (16) (17) (28) (33).

Generalmente el hombre se puede infectar por contaminación de la herida que causa el insecto transmisor con las heces del mismo que contengan tripomastigotes metacíclicos. Esto se realiza fácilmente, ya que los triatomas evacúan obligados por la plenitud abdominal resultante de la voracidad con que comen, y las heces contaminadas, al extenderse, permiten que se introduzca el tripomastigote metacíclico en la herida o bien, el individuo puede facilitar la infección al rascarse. Los tripomastigotes metacíclicos pueden penetrar por vía nasal, oral, conjuntival y dérmica (49).

1. 1. 5. PATOGENIA Y PATOLOGIA.

Al penetrar los tripomastigotes por vía conjuntival, aparere un edema bpalpebral unilateral, poco doloroso, de aspecto violáceo, con inflamación de la glándula lacrimal y parálisis de los músculos de la órbita conocido como Signo de Romaña. El edema unilateral de los párpados es el más común de los signos y casi es patognomónico de la Enfermedad de Chagas. Si la inoculación ha sido por otra vía, aparece un nódulo subcutáneo acompañado de microadenitis regional conocido como Chagoma de Inoculación.

Los organismos que han penetrado invaden las células adiposas del tejido subcutáneo y las fibras musculares, llegan a la sangre y se distribuyen a través de los vasos sanguíneos y linfáti-

cos, penetrando a corazón, pulmones, bazo, hígado, médula ósea, ganglios mesentéricos, cerebro, corteza suprarrenal, tiroides, - órganos sexuales y mucosa del intestino. En estos tejidos los parásitos forman pseudoquistes especialmente en las fibras del músculo cardíaco (42) (46), pierden su flagelo y se redondean, convirtiéndose en amastigotes, los cuáles se reproducen activamente por fisión binaria para salir a la circulación en forma de tripomastigote sanguíneo.

Si un triatoma no infectado, al alimentarse, ingiere estos tripomastigotes sanguíneos, en su tracto digestivo se transforman en epimastigotes, los que al llegar al intestino posterior se convierten en tripomastigotes metacíclicos, reiniciándose el ciclo al picar los transmisores a un individuo sano (6) (16) (46) (51).

Se han descrito tres fases de la Enfermedad de Chagas:

1. - Fase aguda. - Dura de 20 a 30 días; se caracteriza por fiebre elevada, edema bpalpebral unilateral (Signo de Romaña) e hipertrofia de ganglios linfáticos.

2. - Fase Subaguda. El bazo y el hígado se pueden llegar a encontrar aumentados de tamaño, se presenta miocarditis aguda y alteraciones en la actividad cardíaca. Generalmente el paciente - está muy nervioso, con alteraciones de tipo psíquicas y en ocasiones presenta signos de encefalomiелitis o meningoencefalitis. - La muerte sobreviene de dos a cuatro semanas o la enfermedad pasa a la fase crónica.

3. - Fase crónica. Los síntomas de la fase crónica están relacionados probablemente con el daño sufrido durante la fase subaguda. El carácter de los síntomas, por lo tanto, depende de la localización de los parásitos, pueden presentarse miocarditis, megaesófago, megacolon o paroxismos febriles durante los cuáles suelen encontrarse tripomastigotes en sangre. Algunos casos cursan asintomáticos y sólo son descubiertos por hallazgos electrocardiográficos, radiológicos o serológicos (16) (51).

1.1.6. DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se efectúa por medio de métodos parasitológicos, serológicos y por las manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y radiológicas del paciente.

1.1.6.1. METODOS PARASITOLÓGICOS. Permiten identificar la infección mediante la comprobación de la presencia de Trypanosoma cruzi.

1. - Frotis sanguíneo y gota gruesa. No son útiles para diagnóstico de rutina porque sólo son positivas durante infecciones tempranas, es decir, durante los períodos febriles de la fase aguda y en las exacerbaciones febriles de la fase crónica. El estudio se efectúa en fresco o por métodos de coloración, buscando tripomastigotes sanguíneos.

2. - Inoculación a animales de laboratorio. Generalmente se recurre a esta técnica cuando se presentan casos sospe

chosos de la Enfermedad de Chagas en los que no se ha podido comprobar la existencia de T. cruzi por los métodos antes descritos. Los animales que se utilizan con mayor frecuencia para realizar esta prueba son el hamster y el ratón blanco.

3. - Hemocultivo. Es también un método sencillo y de alta sensibilidad, se emplea en los mismos casos que los indicados para la inoculación a animales sensibles. Los medios de cultivo que ofrecen mayor eficacia son el medio N.N.N. y medios con solución de Locke y sangre humana.

4. - Xenodiagnóstico. En caso de no encontrarse tripanosomas al efectuar frotis sanguíneo, gota gruesa, inoculación a animales de laboratorio y hemocultivo, se recurrirá al xenodiagnóstico. El xenodiagnóstico se efectúa dejando que triatomas libres de infección y criados en el laboratorio, se alimenten con la sangre del individuo sospechoso de tener Enfermedad de Chagas. Si hay infección en la sangre, los tripanosomas se multiplicarán rápidamente en el intestino de la triatoma, y un exámen de su contenido intestinal mostrará las formas flageladas del parásito.

5. - Cortes histológicos. En estudios post-mortem se pueden apreciar nidos de amastigotes en músculo.

1.1.6.2. METODOS SEROLOGICOS. Detectan en sangre la presencia de sustancias capaces de reaccionar

con el parásito o sus componentes, como los anticuerpos provocados por la infección.

Las pruebas serológicas más utilizadas son:

1. - Fijación del complemento.
2. - Hemaglutinación.
3. - Inmunofluorescencia.

El fácil cultivo de T. cruzi in vitro, representa una fuente apropiada para la elaboración de antígenos, constituidos por los propios organismos parasitarios como en las reacciones de inmunofluorescencia, o por sus extractos solubles útiles en las reacciones de fijación del complemento o hemaglutinación indirecta. Sin embargo, debido a las diferentes formas que adopta T. cruzi, no se ha logrado una uniformidad en la elaboración de los antígenos, lo cual ha conducido a que se obtengan diferentes grados de sensibilidad y especificidad en las pruebas (9).

Las reacciones serológicas son útiles para un mejor conocimiento de la incidencia y frecuencia de la infección, la prevención de la transmisión por transfusiones de sangre, la identificación de casos no sospechados e incluso la confirmación de la Enfermedad de Chagas en enfermos con manifestaciones clínicas que sugieran la presencia de esta infección.

1. 1. 6. 3. MANIFESTACIONES CLINICAS Y ELECTROCARDIOGRAFICAS.

En la fase aguda de la Enfermedad de Chagas las mani

festaciones clínicas más importantes son: el Signo de Romaña, chagoma de inoculación, fiebre elevada y alteraciones en la actividad cardiaca. La fase crónica puede presentarse asintomática o bien puede haber insuficiencia cardiaca y visceromegalias.

Los hallazgos electrocardiográficos más frecuentes son: anormalidades en la onda "P", bloqueo completo auriculoventricular, bloqueo incompleto en la rama derecha del haz de His, alteraciones de la conducción y arritmias.

1.2. ANTECEDENTES SOBRE ESTUDIOS SEROLOGICOS EFECTUADOS CON MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO.

La respuesta inmune que sigue a una infección por T. cruzi, es de gran ayuda para propósitos de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. El parásito, al introducirse en el organismo se multiplica y provoca la formación de anticuerpos (10), que pueden detectarse por medio de pruebas serológicas como fijación del complemento, hemaglutinación directa e indirecta, inmunofluorescencia indirecta y otras.

Aunque muchas pruebas parecen ser apropiadas, existen grandes variaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad (13), que frecuentemente son resultado de una deficiente estandarización, lo cual es debido a varios factores, como las diferencias en la composición de los extractos antigénicos y las diferentes formas evolutivas de T. cruzi con las cuáles se prepara al antígeno (9) (11) (36) (37).

Las reacciones serológicas para la demostración de anticuerpos frente a T. cruzi, son bastante específicas, no se observan regularmente reacciones cruzadas derivadas de otras enfermedades infecciosas, parasitarias o de otra naturaleza, con excepción de los sueros tanto de leishmaniasis como de tripanosomiasis (Trypanosoma gambiense y Trypanosoma rhodesiense) (25) (35) (41).

Los estudios serológicos se han llevado a cabo con sueros -

obtenidos de sangre extraída por punción venosa. Según la bi
bliografía consultada, desde 1932 se han publicado trabajos -
donde la recolección de sangre para el diagnóstico de algunas
enfermedades parasitarias, se efectúa en papeles absorbentes,
con el objeto de evitar la punción venosa y la facilidad de la -
conservación del material a analizar.

Las primeras pruebas serológicas efectuadas con peque
ñas cantidades de sangre, han sido descritas para sífilis (Che-
diak, 1932; Zimmermann, 1939; Cannefax, 1952; Olansky, 1952;
Harris, 1952), leishmaniasis (Pellegrino Brener, 1958), esquis-
tosomiasis (Sadun-Anderson-Williams, 1961) y para tripanoso-
miasis (Maekelt, 1960; Sadun, 1963; Souza Camargo, 1966; Neal-
Miles, 1970; Alvarez, 1971; Franco-Chamma, 1973; Goldsmith-
Kagan, 1974).

En 1960, Maekelt ensaya distintos tipos de papel para el
envío de muestras de suero en las que efectúa la reacción de fi-
jación del complemento para el diagnóstico de la Enfermedad de
Chagas, obteniendo una concordancia del 86% con relación a la
reacción practicada en suero (31).

En 1961, Sadun-Anderson-Williams, describen un método
simplificado para la colección, conservación, envío y exámen de
pequeñas cantidades de sangre para el diagnóstico de esquistoso-
miasis. Una gota de sangre obtenida por punción digital y colec-
cionada en papel filtro, se prueba por la técnica de anticuerpos -
fluorescentes. Las muestras de sangre en papel filtro fueron -

conservadas a temperatura ambiente durante 90 días sin cambios detectables en la respuesta de anticuerpos (3). En un estudio posterior, demuestran que es posible determinar el título de anticuerpos; cuando la muestra seca, se almacena durante dos semanas en condiciones variables de humedad y temperatura. Evalúan también la sensibilidad y especificidad del método y sugieren que puede ser útil en investigaciones epidemiológicas (9).

En 1963, Sadun recomienda el uso de muestras de sangre en papel filtro, como un método simple y digno de confianza para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Comparando tanto las muestras obtenidas en papel filtro como las obtenidas mediante punción venosa, observan resultados semejantes al procesarlas con la técnica de anticuerpos fluorescentes (41).

En 1966, Souza-Camargo, estudiando la serología de la Enfermedad de Chagas, reportan que no se afecta la reactividad de las muestras de sangre absorbida en papel filtro cuando son mantenidas a temperatura ambiente durante 30 días. Además comparan las pruebas de fijación del complemento y la inmunofluorescencia, obteniendo concordancia en el título de anticuerpos con ambas pruebas cuando se utiliza suero. Por último, recomiendan el método de inmunofluorescencia efectuado con muestras de sangre en papel para el estudio serológico en poblaciones (44).

En 1970, Neal y Miles adaptan la técnica de hemaglutinación indirecta para su uso en eluïdos de muestras de sangre co-

leccionada en papel filtro, en el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas y encuentran reacciones cruzadas con sueros de pacientes con leishmaniasis (35).

En 1971, Alvarez y cols. analizan comparativamente los resultados de la prueba de inmunofluorescencia practicado simultáneamente con sueros frescos y en sangre recogida en diferentes tipos de papel, observan una buena conservación de las muestras mantenidas a temperatura ambiente hasta un lapso máximo de observación de 80 días (1).

En 1973, Franco y Chamma describen la técnica de inmunofluorescencia indirecta; utilizando muestras de sangre absorbida en papel filtro y sueros, obtienen en ambas pruebas resultados similares. Proponen el método del papel filtro como una prueba rápida de selección cuando se trabaja con gran número de muestras (18).

En 1974, Goldsmith y Kagan evalúan tres pruebas utilizadas en estudios seroepidemiológicos de la Enfermedad de Chagas. La hemaglutinación indirecta mostró un 81% de concordancia en relación a la fijación del complemento y un 98% en relación a la hemaglutinación directa. Obtienen un 11% de reacciones cruzadas con Leishmania mexicana. Comparan muestras de sangre obtenida en papel filtro con sueros, utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta, encontrando un 93% de concordancia (25). En un estudio posterior, los mismos autores utilizan muestras de sangre absorbida y seca en papel filtro, para efectuar estudios seroepidemioló

gicos de la Enfermedad de Chagas en Oaxaca, México, encontrando en una región del estado una incidencia del 29% de reactivos - positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi (22).

1. 3. LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

1. 3. 1. GENERALIDADES.

Desde la publicación en 1913 por Guerreiro y Machado de la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas, han sido propuestos numerosos métodos serológicos, entre los cuales se encuentran las pruebas de inmunofluorescencia, floculación y hemaglutinación.

La prueba de hemaglutinación fue introducida por Boyden en 1951 (5) y modificada por Stavitsky en 1954 (44) ha sido aplicada con buenos resultados en el diagnóstico serológico de diversas enfermedades parasitarias. Este método fue empleado por primera vez para el estudio de la Enfermedad de Chagas por Cerisola, Fatała Chaben y Lazzari en 1962 (14).

La prueba de hemaglutinación indirecta ha sido reconocida como un procedimiento específico y sensible para el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas (2) (12) (14) (26) (27) (35), es de fácil realización además de que se obtienen resultados en aproximadamente tres horas.

La prueba se ejecuta con sueros o eluidos de muestras de sangre coleccionada en papel filtro; sin embargo, - las marcas de papel filtro deben ser cuidadosamente seleccionadas, ya que se ha observado intensa hemaglutinación -

con lavados salinos de algunos tipos de papel filtro, lo cual puede conducirnos a la obtención de resultados falsos positivos (1) (9).

Cuando se desea conocer el título de anticuerpos se efectúan diluciones utilizando el micrométodo en placas plásticas propuesto por Knierim y Saavedra (27), este procedimiento cuantitativo ha resultado ser superior al método de las diluciones en tubo, ya que nos conduce a un ahorro de material, especialmente de antígeno y suero y las lecturas se efectúan con más rapidez y facilidad (27).

Un estudio efectuado por Cerisola en 24 pacientes con cuadro agudo de la Enfermedad de Chagas, nos muestra que la reacción de hemaglutinación presenta una positividad inicial del 9.5%; la prueba de anticuerpos fluorescentes 76.2% y la prueba de fijación del complemento 17.7%, por lo tanto, en el estadio agudo precoz de la Enfermedad de Chagas, no es recomendable utilizar la prueba de hemaglutinación. Después del quinto mes del inicio de la enfermedad, la prueba de hemaglutinación detecta el 100% de los casos, aunque puede dar un pequeño porcentaje de reacciones falsas positivas (1) (13) (22).

Las pruebas serológicas positivas sólo indican la respuesta del organismo humano al estímulo antigénico derivado de algún contacto previo o a la presencia de T. cruzi, pero sólo son significativos a títulos elevados o bien, cuando obser

vamos un aumento progresivo en pruebas sucesivas en el título de anticuerpos. En estudios clínicos y serológicos realizados en regiones afectadas por la Enfermedad de Chagas, se ha demostrado que sólo un número reducido de personas seropositivas tienen síntomas o signos clínicos atribuibles a la infección chagásica (8); por lo tanto, los estudios serológicos deberán ser confirmados por otros métodos como frotis sanguíneos, gota gruesa, xenodiagnóstico, inoculación a animales sensibles, hemocultivo, cortes histológicos o por las manifestaciones clínicas o electrocardiográficas del paciente.

1. 3. 2. PRINCIPIO DE LA REACCION.

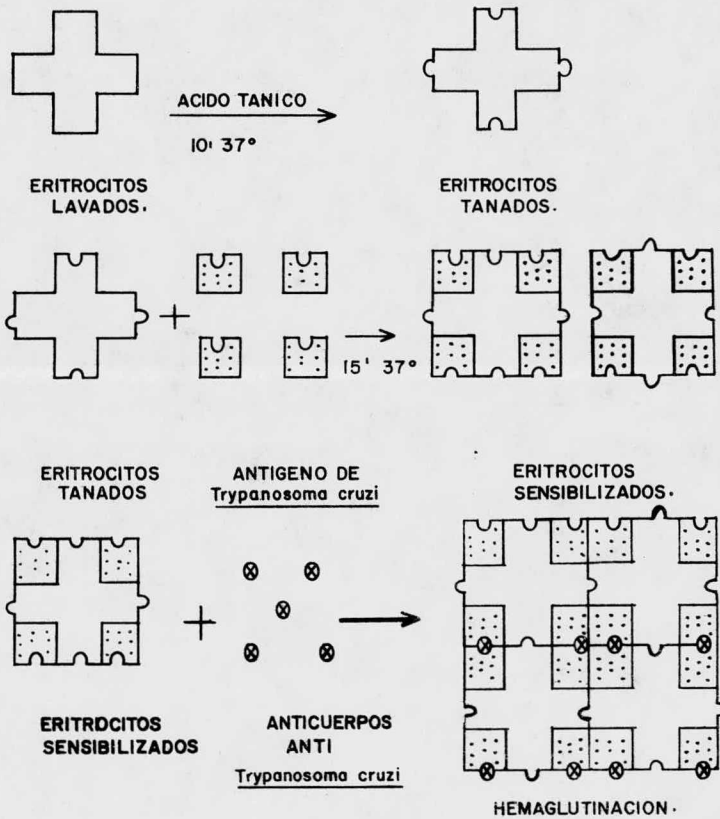
El antígeno en solución de T. cruzi, se adhiere a la superficie de los eritrocitos tratados con ácido tánico mediante adsorción inespecífica. En la reacción siguiente que utiliza anticuerpos dirigidos contra estos antígenos, la reacción antígeno-anticuerpo, provoca una aglutinación de los eritrocitos portadores.

Generalmente, se supone que el ácido tánico actúa sobre los eritrocitos de tal modo que provoca una mayor adsorción de los antígenos, pero se ha demostrado que las células rojas adsorben tales antígenos y llegan a ser aglutinables sin la adición del ácido tánico, pero su sensibilidad es baja (24). En estudios posteriores a los trabajos de Boyden (5), se ha establecido que la función del ácido tánico es aumentar la aglutinabilidad

de las células rojas; para balancear este efecto aglutinante se utiliza como estabilizador, suero normal de conejo (24).

La sensibilización se lleva a cabo por simple adsorción del antígeno por los eritrocitos, al incubar el antígeno con los eritrocitos tanados. Las células así preparadas son capaces de aglutinar en presencia de pequeñas cantidades de su respectivo anticuerpo.

I.3.3. ESQUEMA DE LA REACCION DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA
PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



CAPITULO II.

OBJETIVOS.

- I. - Detectar en suero, la existencia de inmunoglobulinas capaces de reaccionar con componentes de Trypanosoma cruzi, con el objeto de ampliar la información sobre la incidencia de anticuerpos en el estado de Oaxaca, México.

- II. - Determinar si es útil la prueba de hemaglutinación indirecta efectuada con muestras de sangre absorbida en papel filtro para estudios serológicos y encuestas epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas.

- III. - Determinar las variaciones en los títulos de anticuerpos anti Trypanosoma cruzi al mantener las muestras coleccionadas en papel filtro a temperatura ambiente durante 100 días.

CAPITULO III.

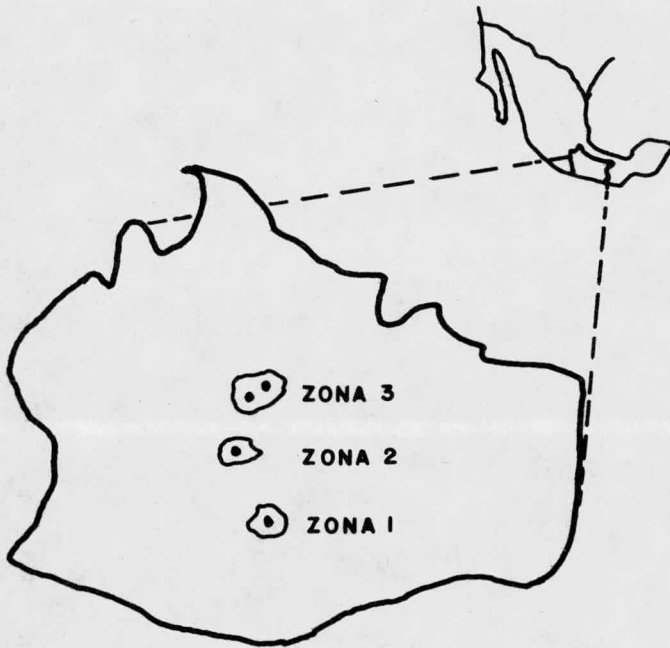
MATERIAL Y METODOS.

1. - LUGAR DE ESTUDIO.

Estado de Oaxaca, México. El estado de Oaxaca se encuentra entre los 15° 39' y 18° 42' de latitud norte y los 93° 52' y 98° 32' de longitud oeste. El estado limita con tres llanuras tropicales: al sur, y limitando con el Océano Pacífico se encuentra una pequeña faja costera de bosques tropicales; al este limitando con Chiapas se encuentra otra llanura que forma parte del Istmo de Tehuantepec; al norte, limitando con Puebla y Veracruz se encuentra una tercera llanura con fuerte precipitación pluvial y una densa vegetación tropical; al oeste limita con Guerrero.

El estado se caracteriza por tener un relieve sumamente accidentado, intensa sismicidad y grandes regiones de suelo erosionado. Influida por la conformación orográfica del estado, el clima varía bruscamente de una región a otra, sin embargo predominan el semitropical y tropical. Siendo semitropical y a menudo fresco en el altiplano y tropical en las llanuras.

La precipitación pluvial varía de 600 a 1000 mm³ al año, la precipitación máxima se registra durante los meses de mayo a octubre, y el período de sequía se extiende de noviembre a marzo. La superficie del estado es de 95,364 Km² y tiene una población aproximada de 2,171,733 habitantes.

ZONAS ESTUDIADAS: ESTADO DE OAXACA, MEXICO.

ZONA 1. MUNICIPIO: MIAHUATLAN.

ZONA 2. MUNICIPIO: SAN JUAN CHILATECA.

**ZONA 3. MUNICIPIOS: TLAOCOCHAHUAYA DE
MORELOS Y SANTO DOMINGO TOMALTEPEC.**

Se seleccionaron cuatro municipios del estado para la obtención de las muestras, estos fueron: Miahuatlán, San Juan Chilateca, Tlacoahuaya de Morelos y Santo Domingo Tomaltepec. Poblaciones con clima tropical, precipitación pluvial - de 1,016 mm³ al año y de temperatura media diaria de 28 a 29 grados centígrados.

2. - PAPEL FILTRO.

Se utilizó papel filtro marca "Ederol" tipo 310 G, el cual se cortó en fracciones de 2.54 por 7.62 cm, imprimiéndosele dos círculos de 12 mm de diámetro, cantidad que capta el volumen de sangre previamente estandarizado para la técnica empleada. La parte final de cada fracción se aprovechó para anotar datos de identificación.

3. - METODO DE MUESTREO.

Las muestras se obtuvieron de niños en edad escolar pertenecientes a diferentes escuelas ubicadas en los municipios de Miahuatlán, San Juan Chilateca. Tlacoahuaya de Morelos y Santo Domingo Tomaltepec, estado de Oaxaca. A la comunidad y a los maestros de los planteles educativos se les informó sobre la Enfermedad de Chagas y se les comunicó la importancia del estudio, debido a que en el estado habían sido detectadas personas con este padecimiento. Durante los meses de septiembre de 1977, febrero y agosto de 1978, se procedió a la toma de las muestras.

Los estudios serológicos de la Enfermedad de Chagas se llevan a cabo comúnmente en sueros obtenidos de sangre extraída por punción venosa, este método resultó inadecuado por su difícil empleo en niños y además de que requiere equipo y condiciones estériles que difícilmente se pueden obtener en trabajos de campo. Para evitar estas dificultades efectuamos la recolección de sangre por punción digital y absorbida en papel filtro, lo que nos permitió obtener un gran número de muestras en poco tiempo y con un mínimo de traumatismo para los niños. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción del pulpejo del dedo pulgar de los donadores, con lanceta estéril desechable, permitiendo que el fluido quedara dentro de los círculos impresos en el papel filtro. Fue importante llenar completamente los dos círculos ya que, para efectuar la prueba de hemaglutinación indirecta es necesario tener un volumen conocido de suero. Las muestras así obtenidas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en pequeñas bolsas de polietileno. En esta forma se colectaron un total de 895 muestras, la mayoría pertenecientes a niños y adolescentes menores de 19 años.

4. - ANTIGENO DE TRYPANOSOMA CRUZI.

El antígeno crudo obtenido de promastigotes liofilizados de Trypanosoma cruzi, fue amablemente proporcionado para la elaboración del presente trabajo, por el Dr. Manuel Gutiérrez

Quiroz, Jefe del Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina UNAM.

4. 1. - CULTIVO DEL TRYPANOSOMA CRUZI.

Los promastigotes de Trypanosoma cruzi se inocularon en un matraz erlenmeyer de 125 ml que contenía un medio difásico. La fase sólida consistió en:

Infusión de agar cerebro-corazón.....	37 g.
Dextrosa.....	10 g.
Agar	20 g.
Agua destilada cbp.....	1000 ml.

Después de disolver los ingredientes, el medio fue distribuido en cantidades de 25 ml y se esterilizó en autoclave. A continuación el medio fue calentado a 46°C aproximadamente y se agregaron 2 ml de sangre fresca y desfibrinada de conejo, - se mezcló bien con la base de agar y se dejó solidificar.

Se adicionaron 5 ml de solución salina estéril al 0.095% y el medio fue probado para esterilidad incubando a 37°C durante 18 horas.

Los medios inoculados se incubaron a 25°C hasta que se alcanzó un máximo de crecimiento (usualmente es de 7 a 10 días).

El sobrenadante de 4 medios de cultivo inoculados se une y se diluye a 100 ml con solución salina estéril al 0.095 %. Esta cantidad fue suficiente para inocular 20 medios de cultivo para la producción del antígeno crudo.

4. 2. - ELABORACION DEL ANTIGENO CRUDO.

Para la producción del antígeno se utilizó el mismo medio de cultivo descrito anteriormente pero sin sangre.

- Se adicionaron a cada uno de los 20 medios de cultivo, 5 ml de un inóculo conteniendo 3,000,000 promastigotes por mililitro.
- Se incubó a 25°C hasta que se alcanzó un máximo de crecimiento.
- El sobrenadante de todos los medios de cultivo se filtró, centrifugó, secó a vacío y liofilizó.

5. - PREPARACION DEL ANTIGENO EN SOLUCION.

Se utilizó como antígeno, un extracto salino de promastigotes de Trypanosoma cruzi, deslipidizados con benceno.

5. 1. - MATERIAL.

- Balanza analítica.
- Homogeneizador de 50 ml.
- Centrífuga.
- Bomba de vacío.
- Equipo de liofilización.
- Pipetas serológicas de 1 ml.

5. 2. - REACTIVOS.

- Benceno.
- Cloruro de sodio al 1.7%.
- Merthiolate.

5. 3. - METODO.

- Se pasaron 50 mg del parásito liofilizado.

- Se colocó el polvo en un homogeneizador de 50 ml -
- Se agregaron poco a poco 25 ml de benceno y se rom
pieron los parásitos.
- Se dejó reposar por 5 minutos en dos tubos de centríf
fuga.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos.
- Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó
a vacío.
- Se colocó el polvo en un homogeneizador y se agrega-
ron 5 ml de agua destilada.
- Se homogeneizó durante 10 minutos.
- Se agregaron 5 ml de cloruro de sodio al 1.7% conten
niendo merthiolate 1:5000.
- Se homogeneizó durante 10 minutos.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Se separó el sobrenadante y se tiró el precipitado.
- Se separó en alícuotas de 1 ml.
- Se liofilizó el antígeno.

6. - DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS DEL ANTIGENO.

6. 1. - MATERIAL.

- Pipetas serológicas de 1 ml.
- Pipetas serológicas de 10 ml.
- Tubos de ensaye de 10 ml.

- Gradilla.
- Espectrofotómetro.

6. 2. - REACTIVOS.

- Solución de sulfato de cobre al 1‰.
- Solución de tartrato de sodio y potasio al 2‰.
- Solución de carbonato de sodio al 2‰ en solución de hidróxido de sodio 0.1 normal.
- Reactivo de Folin 1 normal.
- Solución de albúmina sérica de 100 microgramos.
- Agua destilada.

6. 3. - METODO. (Lowry y cols. , 1951).

- Solución "1". Se preparó mezclando 0.1 ml de la solución de sulfato de cobre al 1‰ y 0.1 ml de la solución de tartrato de sodio y potasio, al 2‰, en 10 ml de una solución de carbonato de sodio al 2‰ en hidróxido de sodio 0.1 normal.
- Se colocaron en 5 tubos de ensaye de 10 ml: 1 ml de un patrón de proteínas, hecho con albúmina sérica bovina, haciendo diluciones de manera que quedaran en cada tubo concentraciones de 50, 25 y 12.5 microgramos por ml, en otro tubo se colocó 0.1 ml de la muestra y en otro 1 ml de agua destilada.
- Se aforó a un ml con agua destilada.
- Se añadieron 3 ml de la solución "1".

- Se agitó y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- A cada tubo se les añadió 0.3 ml del reactivo de Folin 1 normal.
- Se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se efectuó la lectura en espectrofotómetro a 500 nanómetros.
- Se graficó concentración-densidad óptica.
- Por interpolación de los valores de densidad óptica, en la curva patrón, se obtuvo la concentración de proteínas del antígeno.

7. - DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DEL ANTIGENO.

7.1. - MATERIAL.

- Pipetas serológicas de un mililitro.
- Pipetas serológicas de 5 ml.
- Tubos de ensaye de 10 ml.
- Gradilla.
- Baño María.
- Espectrofotómetro.

7.2. - REACTIVOS.

- Antrona recristalizada al 0.2% en ácido sulfúrico al 95% (recién preparada).
- Solución de Glucosa de 50 microgramos.

- Agua destinada.

7.3. - METODO DE LA ANTRONA.

- Se colocaron 2 ml de antrona recristalizada al 2% en ácido sulfúrico al 95%, en cada uno de 5 tubos de ensayo y en baño frío (10-15°C).
- Se añadió 1 ml de la muestra al tubo 1, cuidando de que quedara en capas superpuestas.
- Se añadió 1 ml de agua destilada al tubo número 2, cuidando de que quedara en capas superpuestas.
- Se prepararon diluciones de glucosa de 50, 25 y 12.5 microgramos por ml.
- Se añadió 1 ml de la dilución de 50 microgramos al tubo tres, de 25 microgramos al tubo cuatro y de 12.5 microgramos al tubo cinco.
- Los tubos se agitaron vigorosamente para homogeneizar perfectamente.
- Los tubos se colocaron en baño maría a ebullición durante 15 minutos.
- Se pasaron a agua fría.
- Se efectuó la lectura a 625 nanómetros.
- Se graficó concentración-densidad óptica
- Por interpolación de los valores de densidad óptica, en la curva patrón, se obtuvo la concentración de carbohidratos del antígeno.

8. - ELUCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE PARA
LAS PRUEBAS SEROLOGICAS.

8. 1. - MATERIAL.

- Tubos de ensaye.
- Varilla metálica.

8. 2. - REACTIVOS.

- Muestras de sangre absorbida en papel filtro.
- Solución amortiguadora de fosfatos con pH 7. 2 (PBS 7. 2).

8. 3. - METODO.

- Se recortó cuidadosamente el disco de papel filtro cont
niendo la muestra de sangre, y se colocó en un tubo de -
ensaye.
- Se añadieron 0. 4 ml de PBS 7. 2.
- Se comprimió el disco con una varilla metálica.
- Se dejó eluir por un mínimo de 90 minutos a temperatura
ambiente (el período de elución puede ser durante toda la
noche).
- Se retiró el disco con la varilla metálica y se presionó con
tra las paredes del tubo de ensaye, para extraer el eluído
residual.
- El eluído quedó diluído 1:16, ya que el papel filtro de 12 mm
de diámetro, absorbió 0.06 ml de sangre y, considerando
un hematocrito de 45% se obtienen 0.027 ml de suero.

9. - PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

La prueba de hemaglutinación indirecta se amoldó a la técnica de Boyden (16), utilizando eritrocitos tratados con ácido tánico y sensibilizados con antígeno en solución de Trypano soma cruzi.

9. 1. - MATERIAL.

- Tubos de 10 por 75.
- Tubos con tapón de rosca.
- Gradilla.
- Micropipetas calibradas de 0.05 y 0.025 ml.
- Pipetas Pasteur con bulbo.
- Probetas de 100 ml.
- Matraces de diferentes capacidades.
- Centrífuga.
- Tubos de centrífuga.
- Baño maría.
- Microdilutores de 0.050 ml.
- Mechero.
- Placas de microtitulación con fondo en "U".
- Vibrador.
- Espejo para la lectura.

9. 2. - REACTIVOS.

- Solución de citrato de sodio al 3.8 % (anticoagulante).
- Soluciones amortiguadoras de fosfatos.
- Solución de ácido tánico.

- Suero normal de conejo.
- Antígeno en su concentración óptima
- Eritrocitos de carnero lavados.
- Eritrocitos tanados.
- Eritrocitos sensibilizados.
- Suero control positivo.
- Suero control negativo.

9. 3. - PREPARACION DE REACTIVOS.

9. 3. 1. - SOLUCION DE CITRATO DE SODIO AL 3. 8%

Citrato de sodio. 3. 8g.

Agua destilada. 100 ml.

Se esterilizó en autoclave a 15 lb por 15 minutos. Guardada en refrigeración dura hasta un mes. La proporción más adecuada fué de 27 ml de la solución de citrato de sodio más 23 ml de sangre de carnero.

9. 3. 2. - SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE FOSFATOS.

Soluciones madre.

A. Solución de fosfato disódico monohidrogenado.

(0. 15 M Na_2HPO_4)

Na_2HPO_4 21. 3g.

Agua destilada cbp. 1000 ml.

B. Solución de fosfato de potasio dihidrogenado.

(0. 15 M KH_2PO_4)

KH_2PO_4 20. 4 g.

Agua destilada cbp. 1000 ml.

C. Solución de cloruro de sodio.

(0.15 M NaCl)

NaCl.....8.8 g.

Agua destilada cbp.....1000 ml.

- Soluciones amortiguadoras de fosfatos con pH 6.4 (PBS 6.4) y pH 7.2 (PBS 7.2)

	(PBS 6.4)	(PBS 7.2)
Solución de Na_2HPO_4 0.15 M.....	32.3 ml.	76 ml.
Solución de KH_2PO_4 0.15 M.....	67.7 ml.	24 ml.
Solución de Na Cl 0.15 M.....	100 ml.	100 ml.

9.3.3. - SOLUCION DE ACIDO TANICO.

Acido tánico.....0.1 G.

PBS 7.2.....10 ml.

Se tomó 0.1 ml de la solución anterior y se agregaron 19.9 ml de PBS 7.2, quedando una dilución 1:20,000.

9.3.4. - SUERO NORMAL DE CONEJO.

Suero normal de conejo.....1ml.

PBS 7.2.....99 ml.

Queda una dilución 1:100.

9.3.5. - DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTIGENO.

- Se efectuaron diluciones del antígeno 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 con PBS 7.2.
- Los eritrocitos se lavaron, talaron y sensibilizaron con cada dilución del antígeno.

- Con una micropipeta calibrada, se colocaron 0.050 ml de suero normal de conejo 1:100 a cada una de las pozas de una placa de microtitulación.
- Se agregaron 0.050 ml de suero control positivo y se efectuaron diluciones.
- Se añadieron 0.025 ml de eritrocitos sensibilizados con antígeno 1:20.
- Se agitó la placa durante 5 minutos.
- Se dejó reposar durante 3 horas.
- Esta metodología se repitió para cada dilución del antígeno.
- Se procedió a efectuar la lectura. La máxima dilución del antígeno que produjo hemaglutinación fue la dilución óptima del antígeno.

9.3.6. - LAVADO DE ERITROCITOS.

- La cantidad de eritrocitos a utilizar, se retiró del matraz junto al mechero y previa agitación, se repartieron en cantidades de 4 ml por tubo de centrifuga graduado y se aforó con PBS 7.2 hasta 12 ml.
- Se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 minutos.
- Con pipeta pasteur y bulbo se retiró el sobrenadante y la capa superficial de leucocitos.
- Nuevamente se aforó a 12 ml con PBS 7.2.
- Se mezcló y centrifugó durante 5 minutos a 2,500 rpm.
- Se repitió este procedimiento durante 4 veces.

9. 3. 7. - TANADO DE GLOBULOS ROJOS.

- Después de retirar el sobrenadante del último lavado, se midió el paquete de eritrocitos y se llevaron a una suspensión al 2. 5%, agregándose por cada 0. 1 ml del paquete de eritrocitos, 4 ml de PBS 7. 2.
- Se colocó este volumen en un matraz de 125 ml y se añadió un volumen igual de solución de ácido tánico 1:20,000.
- Se incubó en baño maría a 37°C durante 10 minutos.
- Se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 minutos.
- Se decantó el sobrenadante y se midió el paquete de células rojas para llevarlas al 2. 5% en PBS 6. 4 (por cada 0. 1 ml de células, se agregaron 4 ml de PBS 6. 4).

9. 3. 8. - SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS.

- Se añadió un volumen igual de la dilución óptima de antígeno al volumen de células tanadas al 2. 5% en PBS 6. 4.
- Se incubó a 37°C durante 15 minutos.
- Se agregó 1 ml de suero normal de conejo al 1%.
- Se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 minutos.
- Se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces con suero normal de conejo al 1% en PBS 7. 2 y se centrifugó.
- Se decantó el sobrenadante y el paquete de células se ajustó a una suspensión al 1. 5% con suero normal de conejo al 1%. (por cada 0. 1 ml de células se agregaron 6. 6 ml de suero normal de conejo).

- Estas células sensibilizadas con antígeno de Trypano soma cruzi, son las que se utilizaron en la microhemaglutinación.

9. 4. - MICROHEMAGLUTINACION.

- Se pusieron 0.050 ml (con micropipeta calibrada) de suero normal de conejo al 1:100, a cada una de las pozas de la placa de microtitulación con excepción de la primera.
- Se transfirieron 0.10 ml del suero problema a la primera poza.
- Se mezcló vigorosamente y se prepararon 11 diluciones, transfiriendo 0.050 ml a cada poza, se desecharon 0.050 ml de la última poza.
- Se agregaron 0.025 ml de la suspensión al 1.5% de las células sensibilizadas a cada una de las pozas.
- Se colocaron las placas sobre el vibrador durante 5 minutos.
- Se dejaron las placas a temperatura ambiente por tres horas hasta que las células se encontraron completamente sedimentadas.
- Se efectuó la lectura. Una prueba positiva estuvo dada por aglutinación completa de las células. El punto final de una prueba positiva, estuvo indicado por un anillo de células que cubrieron el fondo de las pozas (aglu

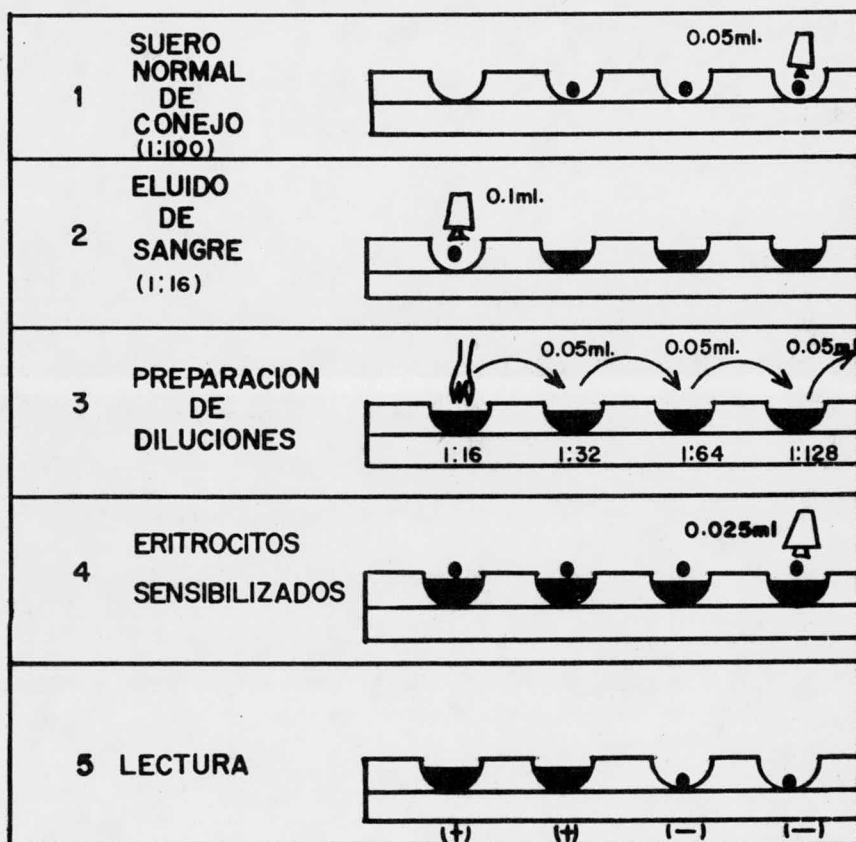
tinación parcial). Una prueba negativa estuvo indicada por las células que sedimentaron para formar un paquete compacto en el centro de la poza (no aglutinación).

- Se consideraron como positivas las pruebas con títulos mayores o iguales a 1:32.

9. 4. 1. - CONTROLES.

			Aglutinación
- Suero Normal de conejo	+ Suero control negativo	+ Células tanadas	(-)
0.050 ml.	0.050-diluir	0.025 ml.	
- Suero Normal de conejo	+ Suero control negativo	+ Células sensibilizadas	(-)
0.050 ml.	0.050-diluir	0.025 ml.	
- Suero Normal de conejo	+ Lavado salino de papel filtro	+ Células tanadas	(-)
0.050 ml.	0.050-diluir	+ 0.025 ml.	
- Suero Normal de conejo	+ Lavado salino de papel filtro	+ Células sensibilizadas	(-)
0.050 ml.	0.050-diluir	+ 0.025 ml.	
- Suero Normal de conejo	+ Suero control positivo	+ Células tanadas	(-)
0.050 ml.	0.050-diluir	0.025 ml.	
- Suero Normal de conejo	+ Suero control positivo	+ Células sensibilizadas	(+)
0.050 ml.	0.050-diluir	0.025 ml.	

ESQUEMA DE TRABAJO PARA LA MICROTITULACION



CAPITULO IV.

RESULTADOS.

De las 895 muestras de sangre en papel filtro procedentes de Oaxaca, México, ensayadas para determinar la presencia de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi, 34 mostraron títulos positivos (3.8%); de las cuales 19 (2.12%), presentaron un título de 1:32; 13 (1.46%), un título de 1:64; 1 (0.11%), presentó un título de 1:128 y 1 (0.11%), presentó un título de 1:256 (Cuadro 1, Gráfica 1).

En el cuadro 2 se observa la distribución por edad de 750 muestras efectuadas con la prueba de hemaglutinación indirecta, para detectar reactores positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi, encontrándose un total de 28 (3.73%) muestras positivas, de las cuales 1 (0.13%) correspondió al grupo de uno a tres años; 3 (0.40%) se encontraron en el de cuatro a seis años; 11 (1.47%) dentro del grupo de siete a nueve años; 5 (0.67%) dentro del grupo de diez a doce años; 4 (0.53%) correspondieron al grupo de trece a quince años; 1 (0.13%) al grupo de dieciséis a dieciocho años y 3 (0.40%) correspondieron al grupo de más de diecinueve años (Gráfica 2).

De las 28 muestras positivas, 8 (28.57%) pertenecieron a donadores del sexo masculino, encontrando 1 (3.57%) muestra dentro del grupo de uno a tres años; 1 (3.57%) dentro de cuatro a seis años; 3 (10.72%) dentro del grupo de siete a nueve años;

1 (3.57%) dentro del grupo de diez a doce años; 1 (3.57%) dentro del grupo de trece a quince años y 1 (3.57%) dentro del grupo de más de diecinueve años (Cuadro 3 y Gráfica 3).

Por lo que respecta al sexo femenino, se encontraron 20 (71.43%) muestras positivas, encontrando 2 (7.14%) muestras - dentro del grupo de cuatro a seis años; 9 (32.14%) dentro del - grupo de siete a nueve años; 3 (10.72%) dentro del grupo de diez a doce años; 3 (10.72%) dentro del grupo de trece a quince años; 1 (3.57%) dentro del grupo de dieciseis a dieciocho años y 2 (7.14%) dentro del grupo de más de diecinueve años (Cuadro 4 y Gráfica 3).

En la gráfica 3, se anota la distribución por edad y sexo, encontrándose una mayor incidencia de anticuerpos anti-Trypano soma cruzi, en donadores del sexo femenino y dentro del grupo - de siete a nueve años de edad.

El cuadro 5, muestra las variaciones en el título de anti- cuerpos en 444 muestras obtenidas en papel filtro y almacenadas 100 días, comparadas con el título de la muestra procesada 8 días después de la toma. Se observa que 5 (1.13%) muestras aumentaron en una dilución, 12 (2.7%) disminuyeron en una dilución y 6 - (1.35%) disminuyeron en dos diluciones. 421 muestras permanecieron con título igual.

En el cuadro 6, se anota la distribución de frecuencias de títulos de anticuerpos obtenidos en las tres zonas de cuatro municipios estudiados del estado de Oaxaca, observándose que en la zo na tres se encuentra el mayor porcentaje de títulos positivos.

En el cuadro 7, se anota la distribución por sexo masculino de reactores positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi de las tres zonas estudiadas del estado de Oaxaca, observándose el mayor número de positivos en la zona tres.

En el cuadro 8, se anota la distribución por sexo femenino, encontrándose igualmente el mayor porcentaje de positivos en la zona tres y dentro del grupo de siete a nueve años de edad.

CUADRO 1.

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE TITULOS DE ANTI CUERPOS, OBTENIDOS CON LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA CON MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO.

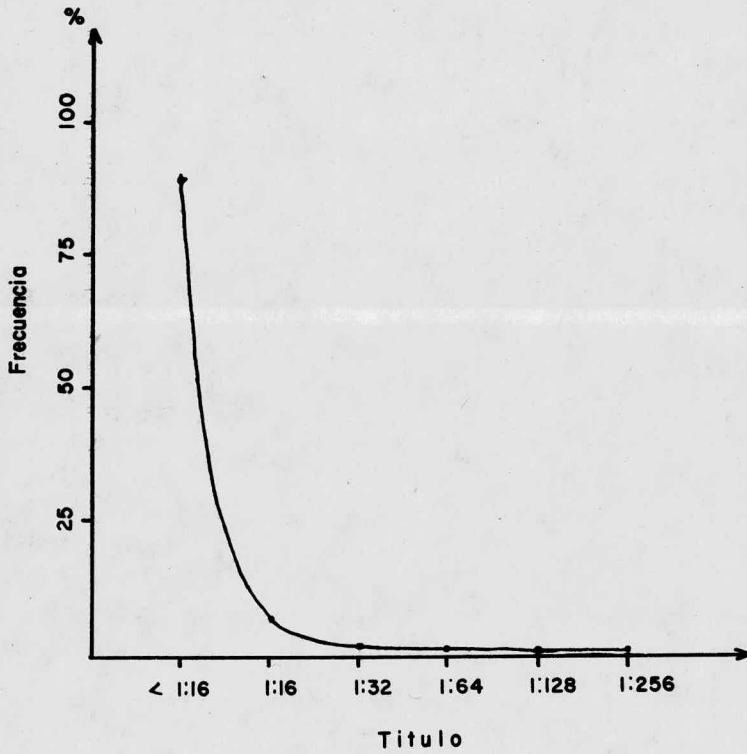
TITULO DE ANTICUERPOS	NUMERO DE PERSONAS.	%	TITULO
< 1:16	799	89.27	-
1:16	62	6.93	-
1:32	19	2.12	+
1:64	13	1.46	+
1:128	1	0.11	+
1:256	1	0.11	+
TOTAL	895	100	

$$\% \text{ DE POSITIVOS} = \frac{\text{NUMERO DE POSITIVOS}}{\text{NUMERO ESTUDIADO.}}$$

$$\% \text{ DE POSITIVOS} = \frac{34}{895} = 3.8$$

GRAFICA 1.

Distribución de frecuencias de títulos de anticuerpos obtenidos con la prueba de Hemaglutinación indirecta con muestras de sangre en papel filtro:



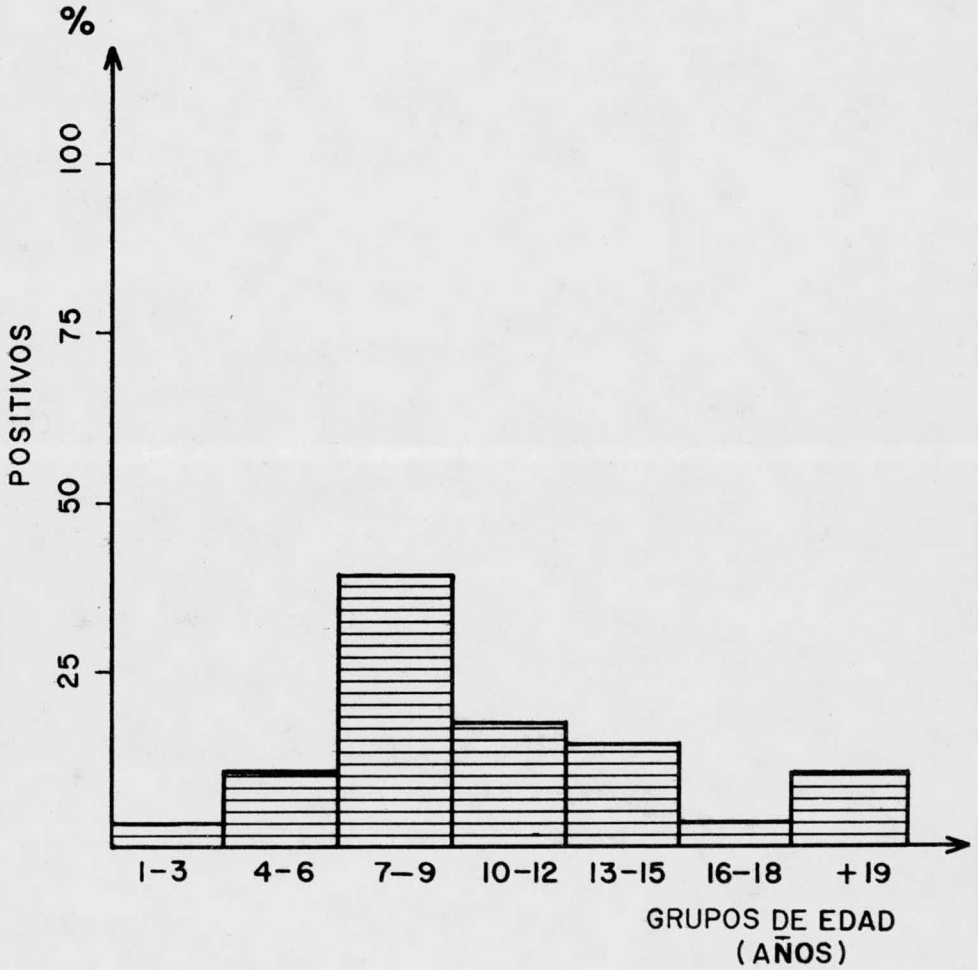
CUADRO 2.

DISTRIBUCION POR EDAD DE REACTORES POSITIVOS CON ANTI-CUERPOS ANTI-Trypanosoma cruzi.

GRUPOS DE EDAD (AÑOS)	NUMERO DE PERSONAS ESTUDIADAS	% DEL TOTAL ESTUDIADO	POSITIVOS	% DEL TOTAL ESTUDIADO	% DEL TOTAL DE POSITIVOS
1 - 3	33	4.40	1	0.13	3.57
4 - 6	84	11.20	3	0.40	10.71
7 - 9	149	19.87	11	1.47	39.29
10 - 12	249	33.20	5	0.67	17.86
13 - 15	132	17.60	4	0.53	14.29
16 - 18	35	4.66	1	0.13	3.57
+ 19	68	9.07	3	0.40	10.71
TOTAL	750	100.00	28	3.73	100.00

GRAFICA 2

Distribución por edad de reactores positivos con anticuerpos anti Trypanosoma cruzi



CUADRO 3.

DISTRIBUCION DE REACTORES POSITIVOS MASCULINOS CON ANTICUERPOS ANTI-Trypanosoma cruzi.

GRUPOS DE EDAD (AÑOS)	MAS-CULI NOS.	% DEL TOTAL ESTUDIADO	POSITIVOS	% DEL TOTAL ESTUDIADO	% DEL TOTAL DE POSITIVOS.
1 - 3	14	3.90	1	0.28	12.50
4 - 6	35	9.75	1	0.28	12.50
7 - 9	71	19.78	3	0.83	37.50
10 - 12	128	35.65	1	0.28	12.50
13 - 15	72	20.06	1	0.28	12.50
16 - 18	22	6.13	0	0	0
+ 19	17	4.73	1	0.28	12.50
TOTAL	359	100.00	8	2.23	100.00

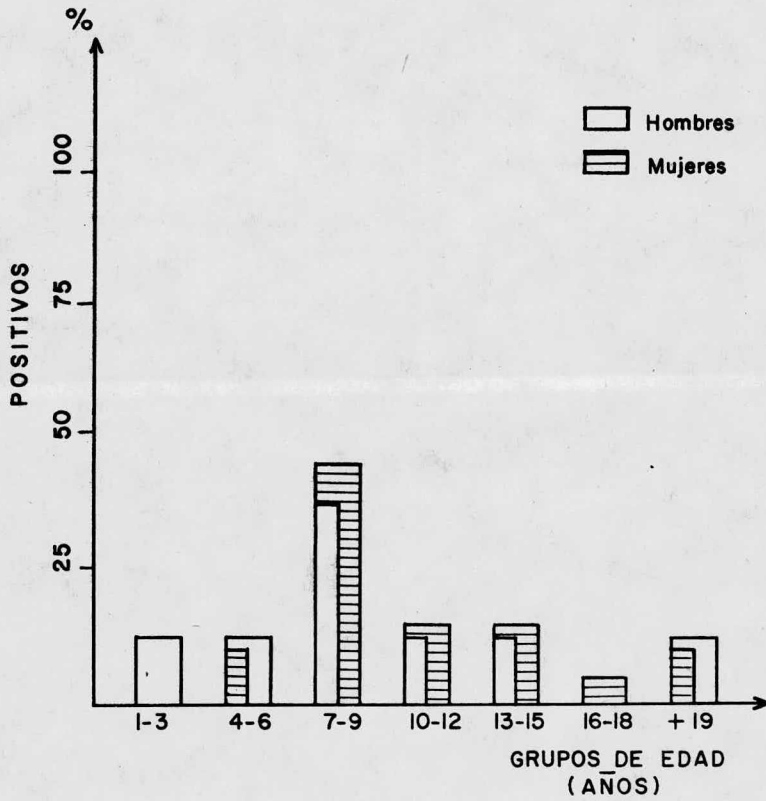
CUADRO 4.

DISTRIBUCION DE REACTORES POSITIVOS FEMENINOS CON ANTI
CUERPOS ANTI-Trypanosoma cruzi.

GRUPOS DE EDAD (AÑOS)	FEME NINOS	% DEL TOTAL ESTUDIADO	POSI TIVOS	% DEL TOTAL ESTUDIADO	% DEL TOTAL DE POSITIVOS
1 - 3	19	4.86	0	0	0
4 - 6	49	12.53	2	0.51	10
7 - 9	78	19.95	9	2.30	45
10 - 12	121	30.95	3	0.77	15
13 - 15	60	15.34	3	0.77	15
16 - 18	13	3.32	1	0.26	5
19	51	13.04	2	0.51	10
TOTAL	391	100.00	20	5.12	100.00

GRAFICA 3

Distribución por edad y sexo de reactivos positivos con anticuerpos anti Trypanosoma cruzi



CUADRO 5.

VARIACIONES EN EL TITULO DE ANTICUERPOS EN 444 MUESTRAS RECOGIDAS EN PAPEL FILTRO Y ALMACENADAS 100 DIAS COMPARADAS CON EL TITULO DE LA MUESTRA PROCESADA 8 DIAS DESPUES DE LA TOMA.

TITULO DE ANTICUERPOS.	MUESTRA A LOS 8 DIAS.	%	MUESTRA A LOS 100 DIAS.	%
< 1:16	395	88.96	401	90.32
1:16	37	8.33	41	9.23
1:32	8	1.80	1	0.23
1:64	4	0.90	1	0.23
TOTAL	444	100.00	444	100.00

VARIACIONES DEL TITULO.	NUMERO DE DILUCIONES	MUESTRA A LOS 100 DIAS	%
AUMENTO	1	5	1.13
	2	0	0
	3	0	0
DISMINUCION	1	12	2.7
	2	6	1.35
	3	0	0
COINCIDENTE		421	94.82

CUADRO 6.

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS EN LAS TRES ZONAS ESTUDIADAS DEL ESTADO DE OAXACA.

TITULO DE ANTICUERPOS	MUNICIPIO: MIAHUATLAN (ZONA 1)	MUNICIPIO: CHILATECA (ZONA 2)	MUNICIPIOS: TLAACOHUAYA Y STO. DOMINGO TOMALTEPEC. (ZONA 3).
< 1:16	177	434	188
1:16	15	43	4
1:32	2	8	9
1:64	4	4	5
1:128	0	0	1
1:256	1	0	0
TOTAL	199	489	207

CUADRO 7.

DISTRIBUCION DE REACTORES POSITIVOS MASCULINOS EN LAS TRES ZONAS ESTUDIADAS DEL ESTADO DE OAXACA.

GRUPOS DE EDAD (AÑOS)	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 1)	POSI TIVOS	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 2)	POSI TIVOS	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 3)	POSI TIVOS
1 - 3	2	0	0	0	12	1
4 - 6	20	0	3	0	12	1
7 - 9	14	0	42	2	15	1
10 - 12	33	0	83	0	12	1
13 - 15	12	0	52	1	8	0
16 - 18	0	0	19	0	3	0
+ 19	0	0	6	0	11	1
TOTAL	81	0	205	3	73	5

CUADRO 8.

DISTRIBUCION DE REACTORES POSITIVOS FEMENINOS EN LAS
TRES ZONAS ESTUDIADAS DEL ESTADO DE OAXACA .

GRUPOS DE EDAD (AÑOS)	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 1)	POSI TIVOS	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 2)	POSI TIVOS	No. DE PERSONAS ESTUDIADAS (ZONA 3)	POSI TIVOS
1 - 3	1	0	0	0	18	0
4 - 6	21	2	14	0	14	0
7 - 9	10	2	52	3	16	4
10 - 12	29	0	73	0	19	3
13 - 15	5	1	47	2	8	0
16 - 18	0	0	3	0	10	1
+ 19	0	0	2	0	49	2
TOTAL	66	5	191	5	134	10

CAPITULO V.

COMENTARIOS.

En estudios serológicos de la Enfermedad de Chagas en los que se requiere probar de cientos a miles de sueros, es recomendable utilizar métodos sencillos de muestreo como lo es el coleccionar muestras de sangre por punción digital y absorbida en papel filtro, lo que resulta más fácil que obtener la sangre por punción venosa.

Entre las ventajas que observamos al utilizar muestras de sangre en papel filtro están:

1. - El método de colecta es sencillo y fácil de realizar tanto en niños como en adultos.
2. - El traumatismo para el donador es mínimo.
3. - Se obtiene un gran número de muestras en poco tiempo.
4. - La muestra seca fácilmente.
5. - No es necesario mantener la muestra en condiciones estériles.
6. - Las muestras pueden enviarse por correo del área - de estudio hacia el laboratorio.
7. - Pueden detectarse anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi por reacciones de hemaglutinación, fijación del complemento e inmunofluorescencia.
8. - La actividad de los anticuerpos no varía significativamente bajo condiciones variables de humedad, ya que aparentemente

te no hay desnaturalización de las proteínas.

9. - La muestra puede ser guardada a temperatura ambiente por períodos de hasta 80 días y la reactividad de anticuerpos no varía significativamente.

Por lo tanto, este método es aplicable en estudios seroepidemiológicos de la Enfermedad de Chagas.

En el presente trabajo utilizamos las muestras de sangre en papel filtro para ser probadas por la técnica de hemaglutinación indirecta, la cual presentó las siguientes ventajas:

1. - Puede ser efectuada con muestras de sangre absorbida en papel filtro.
2. - Se necesita un pequeño volumen de sangre.
3. - Se requieren pequeñas cantidades de antígeno.
4. - Es de simple ejecución y no es cara.
5. - Las diluciones se efectúan fácilmente.
6. - Se pueden correr numerosas muestras en corto tiempo.
7. - Las reacciones son de fácil lectura.
8. - Es una prueba cuantitativa.
9. - Detecta casos crónicos de la Enfermedad de Chagas.

Por lo tanto, la prueba de hemaglutinación indirecta efectuada con muestras de sangre en papel filtro, resulta de gran utilidad para estudios serológicos y encuestas epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas. Además provee de un método simple de coleccionar y probar cantidades pequeñas de sangre en áreas

endémicas de éste padecimiento.

En estudios seroepidemiológicos de la Enfermedad de Chagas puede utilizarse la técnica de hemaglutinación indirecta, como una prueba rápida para detectar reactores positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi. Esta selección de reactores positivos puede ser también de utilidad en bancos de sangre en los que sea necesario descartar a donadores positivos.

De las 895 muestras estudiadas, 34 resultaron positivas, esto significa que los donadores han estado o están en contacto con Trypanosoma cruzi, o bien podrían tener o haber estado en contacto con enfermos con leishmaniasis u otras tripanosomiasis, ya que con estas enfermedades la prueba de hemaglutinación indirecta da reacciones cruzadas.

Con fines de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, habría que confirmar estos resultados positivos efectuando frotis sanguíneos, inoculación en animales sensibles, hemocultivos, xenodiagnósticos, electrocardiogramas y además sería de utilidad efectuar no solo una prueba serológica, sino que habría que confirmar los resultados con una serie de pruebas, que al mostrarnos variación en el título de anticuerpos sería de gran significancia y ayudarían a normar el criterio terapéutico a seguir con el paciente.

La gráfica 1 muestra la distribución de frecuencias de títulos de anticuerpos, obtenidos con la prueba de hemaglutinación in

directa, con muestras de sangre en papel filtro. Observamos una curva descendente monomodal con un máximo a títulos menores de 1:16. En un estudio similar efectuado por Goldsmith (22) en el estado de Oaxaca, obtiene una curva bimodal con máximos a títulos menores de 1:16 y a 1:512, esta curva bimodal quizá es debido a que se estudiaron personas de uno a más de cincuenta años y en el análisis por edad que efectúa el mismo autor, encuentra un aumento progresivo del porcentaje de reacciones positivas en cada decenio de la vida, en el grupo de más de cincuenta años encuentra el mayor porcentaje de positivos. La curva monomodal obtenida por nosotros, puede deberse a que se estudiaron en su mayoría niños y adolescentes menores de 19 años.

Como podemos observar en la gráfica 3, encontramos mayor incidencia de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi, en donadores de 7 a 9 años de edad y del sexo femenino. En el cuadro 3 y cuadro 4, se observa el predominio de reactores positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en el sexo femenino. Este predominio de anticuerpos en el sexo femenino puede ser debido a factores hormonales, apoyamos esta hipótesis en un estudio efectuado por Tay y cols. (48) en el cual demuestran que niveles altos de progesterona y testosterona en ratones, provocan una disminución en mortalidad, parasitemia y número de nidos de amastigotes que se producen en diferentes órganos. El mismo autor encuentra una disminución más marcada de estos factores con niveles altos de -

progesterona. Se sugiere que estas hormonas pueden producir una estimulación inespecífica del sistema reticuloendotelial, dicha estimulación sería mayor con progesterona, por lo que aumentarían los niveles de anticuerpos en suero, es decir que sucedería lo contrario que en otras parasitosis como por ejemplo en Entamoeba histolítica.

En el cuadro 5, se anotan las variaciones en los títulos de anticuerpos al mantener las muestras a temperatura ambiente durante 100 días. No podemos afirmar que haya variaciones significativas en el título de anticuerpos ya que el número de muestras positivas, así como los títulos obtenidos fueron bajos.

En los cuadros 7 y 8, observamos que en la zona tres hay más reactores positivos con anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi, ya que de las 28 muestras positivas, 15 pertenecen a dicha zona, lo cual nos indica que las personas pertenecientes a la misma, están o han estado en contacto con Trypanosoma cruzi más frecuentemente que las personas pertenecientes a las otras dos zonas.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES.

1. - Utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta con muestras de sangre en papel filtro, es posible detectar y cuantificar la presencia de inmunoglobulinas específicas capaces de reaccionar con componentes de Trypanosoma cruzi.
2. - El uso de muestras de sangre absorbida en papel filtro es útil en estudios serológicos y encuestas epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas.
3. - Las muestras de sangre en papel filtro pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por un lapso de 100 días encontrándose pequeñas variaciones en el título de anticuerpos. Aunque este estudio sería mas significativo procesando un gran número de muestras positivas con títulos altos.

CAPITULO VII.RESUMEN.

Se empleó la técnica de hemaglutinación indirecta para ampliar la información sobre la prevalencia de anticuerpos - anti-Trypanosoma cruzi en el estado de Oaxaca, México.

De un total de 895 muestras de sangre en papel filtro, se obtuvieron 34 positivas lo que representa un total del 3.8%.

Se observó una mayor incidencia de anticuerpos en donadores de 7 a 9 años de edad y del sexo femenino.

Se estudiaron las variaciones en el título de anticuerpos de las muestras coleccionadas en papel filtro cuando fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 100 días.

Los resultados indican en general, que la técnica de hemaglutinación indirecta descrita para el uso de pequeñas cantidades de sangre, es aplicable a investigaciones epidemiológicas y estudios serológicos de la Enfermedad de Chagas.

CAPITULO VIII.BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alvarez, M., De Rissio, A.M., Winne G.J. y cols.: Recolección de Sangre en Papel para Diagnóstico de Infección Chagásica por Inmunofluorescencia. Bol. Chil. Parasit. 26 : 2-6, 1971.
- 2.- Allain, D.S., Kagan, I.G.: An Evaluation of the Direct Agglutination Test for Chagas Disease. J. Parasit. 60 (1) : 179-184, 1974.
- 3.- Anderson, R.I., Sadun, E.H., Williams, J.S.: A technique for the Use of Minute Amounts of Dried Blood in the Fluorescent Antibody Test for Schistosomiasis. Exp. Parasit. 11 : 111-116, 1961.
- 4.- Atias, A., Schilling, E., Naquira, N. y col.: Un Caso de Enfermedad de Chagas Congénita de Curso Fatal. Bol. Chil. Parasit. 16 : 15-18, 1961.
- 5.- Boyden, S.V.: The Adsorption of Proteins on Erythrocytes Treated with Tannic Acid and Subsequent Haemagglutination by Antiprotein Sera. J. Exp. Med. 93 : 107-120, 1951.

- 6.- Brener, Z., Alvarenga, N.J.: Life Cycle of Trypanosoma cruzi in the Vector. New Approaches in American Tripanosomiasis. Proceeding of an International Symposium. P.A.H.O. 88, 1975.
- 7.- Boyd, W.C.: Fundamentos de Inmunología. Ed. Universitaria de Buenos Aires. 2a. ed. 721-722, 1970.
- 8.- Camargo, M.E.: Reacciones Serológicas y Consecuencias Sociales de los Resultados Positivos a la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 72: 576-582, 1972.
- 9.- Camargo, M.E., Serologic Diagnosis of Chagas Disease. New Approaches in American Tripanosomiasis. Proceeding of an International Symposium. Brasil P.A.H.O. 206-211, 1975.
- 10.- Camargo, M.E., Amato, N.V.: Anti Trypanosoma cruzi IgM Antibodies as Serological Evidence of Recent Infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 16 (4): 200-202, 1974.
- 11.- Camargo, M.E., Guimares, M.C., Pérez, B.A. y col.: Antigenic Fractionation and Development of New Antigens. New Approaches in American Tripanosomiasis. Proceeding of an International Symposium. Brasil. P.A.H.O. 227-234, 1975.
- 12.- Camargo, M.E., Hoshino, S., Siqueira, R.V.: Haemagglutination

- with Preserved, Sensitized Cells. A Practical Test for Routine Serologic Diagnosis of American Tripanosomiasis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 15 (2) : 81-85, 1973.
- 13.-Cerisola, J.A., Alvarez, M., Lugones, H. Y col.: Sensibilidad de las Reacciones Serológicas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasit. 24 : 2-8, 1969.
- 14.-Cerisola, J.A., Fatala-Chaben, M., Lazzari, J.C.: "Test" de Hemaglutinación para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. P. Med. Arg. 49 (34): 1761-1767, 1962.
- 15.- Chapman, W.L., Hanson, W.L., Waits, V.: The Influence of Gonadectomy of Host on Parasitemia and Mortality of Mice Infected with Trypanosoma cruzi. J. Parasit. 61 (2) : 213-216, 1975.
- 16.-Craig, C.F., Faust, E.C.: Parasitología Clínica. Ed. Salvat. 107-116, 1974.
- 17.-Fong, P.F.: Encuesta sobre la Enfermedad de Chagas en Tetitlan, Gro. Tesis Recepcional. UNAM. 1963.
- 18.-Franco, M.F., Chamma, L.G.: Technical Modification on Indirect Immunofluorescent Antibody Test Using Filter Paper Blood Eluates.

Int. Arch. Allergy.

44 : 692-696, 1973.

- 19.-Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Calwell, J.L. y col.: Manual de Inmunología Clínica. México. Ed. Manual Moderno. 745-746, 1978.
- 20.-Gell, P.G., Coombs, R.A.: Clínica Inmunológica. Ed. Salvat. la. ed. 810, 1965.
- 21.-Goedbloed, E.M.: Hemoculture Compared with Xenodiagnosis - for the Detection of Trypanosoma cruzi Infection in Man and in Animals. New Approaches in American Tripanosomiasis Research. Proceeding of an International Symposium. Brasil. P.A.H.O. - 245-253, 1975.
- 22.-Goldsmith, R.S., Kagan, I.G., Reyes, M.A. y cols.: Estudios Seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. Bol. Of. Sa_nit. Panam. 500-518, 1971.
- 23.-Goldsmith, R.S., Kagan, I.G., Zárate, C.R. y cols.: Epidemio_logic Studies of Chagas Disease in Oaxaca, México, Bol. Of. Sa_nit. Panam. Submitted for Publication. 1-42, 1972.
- 24.- Herbert, W.J.: Passive Haemagglutination with Special Reference to the Tanned Cell Technique. Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications. 20.1-20.19, 1973.

- 25.-Kagan, I.G., Goldsmith, R.S., Zárate, C.R. y cols.: Evaluation of Serologic Test for Studies on Chagas Disease. Bol. Of. Sanit. Panam. Submitted for Publication. 1-35, 1973.
- 26.-Knierim, F., Rubinstein, P.: The Detection of Chagas Disease. Vox Sang. 18 : 280-286, 1970.
- 27.-Knierim, F., Saavedra, P.: Técnica de la Reacción de Hemaglutinación Aplicada al Diagnóstico Serológico de las Parasitosis. Bol. Chil. Parasit. 21 : 39-44, 1966.
- 28.-Link, A., Topelberg, S., Baeza, F. y col.: Enfermedad de Chagas Congénita en un Lactante. Bol. Chil. Parasit. 18 (4) : 105-106, 1976.
- 29.-Linch's, S.S.: Medical Laboratory Technology. 3a. ed. 820-822, 1976.
- 30.-Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y col.: Protein Measurement with the Folin Phaenol Reagent. J. Biol. Chem. 193-: 265-275, 1951.
- 31.-Maekelt, G.A.: Die Komplementbindungsreaktion der Chagas--krankheit. Ztschr. Tropenmed. Parasit. 11 : 152-186, 1960.

32. -Martínez, M. R. : Estudio Sobre la Inmunofluorescencia en la Enfermedad de Chagas. Tesis Recepcional, 1963.
33. -Miles, M. A. : Distribution and Importance of Triatominaeas vectors of Trypanosoma cruzi. New Approaches in American Tripanosomiasis Research. Proceeding of an International - Symposium. Brasil P. A. H. O. 48-53, 1975.
34. - Navarrete, C. E. : Estudio Sobre la Enfermedad de Chagas - en el Municipio de Tuxpan, Michoacán. Tesis Recepcional, - 1964.
35. - Neal, R. A. , Miles R. A. : Indirect Haemagglutination Test for Chagas Disease with a Simple Method for Survey Work. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 12 (5) : 325-332, 1970.
36. - Petana, W. B. : Sensitivity of the Indirect Fluorescence Test (IFT) for Chagas Disease in Large Scale Serologic Surveys. New Approaches in American Tripanosomiasis Research. Proceeding of an International Symposium. Brasil P. A. H. O. 289-291, 1975.
37. -Petana, W. B. , Willcox, H.P. : Data on Comparative Serology for Chagas Disease. New Approaches in American Tripanoso_miasis Research. Proceeding of an International Symposium. Brasil. P. A. H. O. 292-297, 1975.

38. -Roitt, J. M. : Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications. 2a. ed. 260-261, 1975.
39. -Rubio, M., Ebensperger, I., Howard, J. y cols. : Búsqueda de Enfermedad de Chagas en 100 madres de Prematuros con Hallazgo de un Caso de Enfermedad de Chagas Congénita. Bol. Chil. Parasit. 4 (1) : 13-15, 1962.
40. -Sadun, E.H., Anderson, R.I., Williams, J.S. : Fluorescent Antibody Test for the Laboratory Diagnosis of Schistosomia in Humans by Using Dried Blood Smears on Filter Paper. Exp. Parasit. 11: 117-120, 1961.
41. -Sadun, E.H., Dexbury, R.E., Williams, J.S. y col. : Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of African and American Tripanosomiasis in Man. J. parasit. 49 (3): 385-388, 1963.
42. -Salazar, P.M., Tay, J., Navarrete, F. y col. : Comportamiento en el Ratón de una Cepa Mexicana de Trypanosoma cruzi de Peculiar Virulencia. Rev. Inv. Salud Pública. 35: 37-45, 1975.
43. -Salgado, A.A. : Xenodiagnosis in the Selection of Patients and Evaluation of Treatment. New Approaches in American Tripanosomiasis Research. Proceeding of an International Symposium. Brasil. P. A. H. O. 223-226, 1975.
44. -Souza, S.L., Camargo, M.E. : The Use of Filter Paper Blood

- Smears in a Practical Fluorescent Test for American Trypanosomiasis Serodiagnosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 8 (6) : 225-228, 1966.
45. -Stavitsky, A. B. : Micromethods for the Study of Proteins and Antibodies. J. Immun. 72: 360-367, 1954.
46. -Swellengrebel, S. : Animal Parasites in Man. Ed. Van Nostrand Company. 49-56, 1961.
47. -Tarufi, W.L. : Fine Structure of Chagas Disease Lesions. -
New Approaches in American Tripanosomiasis Research. Pro-
ceeding of an International Symposium. Brasil P. A. H. O. - -
152-161, 1975.
48. -Tay, J., Alonso, G. T., Salazar, P.M. : Efecto de las Hormonas (progesterona y testosterona) Sobre la Patogenicidad de -
Trypanosoma cruzi. En Prensa.
49. -Tay, J., Gutiérrez, M., Salazar, P.M. : Estudios Sobre Seis Cepas Mexicanas de Trypanosoma cruzi. Rev. Inv. Salud. Púb. 33: 67-76, 1973.
50. -Tay, J., Ontiveros, D., Ortega, M. y col. : Estado Actual de los conocimientos Sobre Infección en Vertebrados por la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 67:310-314, 1969.
51. - Tay, J., Velazco, O. : Apuntes de Parasitología para Estudiantes de Medicina. México, 1972.