



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO
INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE
ANTÍGENOS CIRCULANTES DE *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ELBA CARRASCO RAMÍREZ

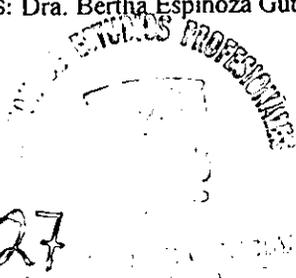
DIRECTORA DE TESIS: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez



MEXICO, D. F.

2000

286427





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estandarización y Evaluación del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la Detección de Antígenos Circulantes de *Trypanosoma cruzi*.

realizado por Elba Carrasco Ramírez

Con número de cuenta 8924883-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis

Propietario Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Propietario Dra. Patricia Tato Zaldivar

Propietario M. en C. Fernando Ramos Reyes

Suplente Dra. Rosaura Mayen Estrada

Suplente Dr. Guillermo Salgado Maldonado

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz
Coordinadora de Licenciatura



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL ENSAYO
INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE
ANTÍGENOS CIRCULANTES DE *Trypanosoma cruzi***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGA**

PRESENTA:

ELBA CARRASCO RAMÍREZ

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y fue subsidiado por los proyectos de la DGAPA IN232399 y la Agencia Internacional de Energía Atómica, contrato no. 106773/RO. Agradezco la beca otorgada por el proyecto de la DGAPA para la realización de este trabajo.

MEXICO, D. F.

2000

DEDICATORIA

A mis papás Enrique Carrasco y Antonia Ramírez por su paciencia pero sobre todo por su grandioso amor. Gracias.

A mis hermanas Angélica y Marisela por escucharme y apoyarme en todo momento. Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Bertha Espinoza por sus conocimientos y permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Al comité de sinodales integrado por las Dras. Bertha Espinoza, Patricia Tato y Rosaura Mayén, al M. En C. Fernando Ramos y al Dr. Guillermo Salgado por sus atinadas sugerencias en la revisión de esta tesis.

A Beatriz E. Sánchez y Esther A. Pachecho por ayudarme en el análisis estadístico.

A mis amigas de laboratorio: Lulú, Vicky, Gina, Bety Sánchez, Diana, Esther, Angélica y Bety Hernández.

A mis amigas Lilia Robert y Beatriz Martínez.

A todas aquellas personas que no menciono pero que contribuyeron en la elaboración del material de ilustración.

INDICE

	páginas
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
I. 1. Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
I. 1. a. Posición taxonómica	2
I. 1. b. Morfología	2
I. 1. c. Ciclo de vida	3
I. 2. Enfermedad de Chagas	6
I. 2. a. Vectores de la enfermedad de Chagas	8
I. 2. b. Mecanismos de transmisión	9
I. 2. c. Cuadro clínico de la enfermedad	9
I. 2. d. Tratamiento	10
I. 3. Enfermedad de Chagas en México	11
I.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	15
I. 4. a. Métodos parasitológicos directos	15
I. 4. b. Métodos parasitológicos indirectos	16
I. 4. c. Métodos moleculares	17
I. 4. d. Métodos serológicos	18
I. 4. e. Detección de antígenos en circulación	20
I.5. Anticuerpos monoclonales	25
II. JUSTIFICACIÓN	26
III. OBJETIVOS	27
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	28
IV. 1. Anticuerpos Monoclonales	28
IV. 2. Cultivo de hibridomas	28
IV.2.a. Descongelamiento de células	28

IV.2.b. Crecimiento de células	29
IV.2.c. Congelamiento de células	29
IV. 3. Producción del líquido de ascitis de F14B	29
IV. 4. Purificación por cromatografía de afinidad	30
IV. 4. a. Purificación del anticuerpo monoclonal B106E	30
IV. 4. b. Purificación del anticuerpo monoclonal F14B	31
IV. 4. c. Purificación de Inmunoglobulinas anti- <i>T.cruzi</i> de conejo	31
IV.5. Acoplamiento de biotina a los AcMc y AcPc	31
IV.6. Actividad de los anticuerpos puros	32
IV.6.a. ELISA	32
IV.6.b. Western Blot	33
IV.6.b.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	33
IV.6.b.2 Electrotransferencia	33
IV.7. Infección a ratones Balbc con <i>T. cruzi</i>	34
IV. 7. a. Curva de parasitemia	34
IV. 7. b. Obtención de suero de ratones infectados	35
IV.8. Obtención de plasma de ratones con infección aguda	35
IV.9. Estandarización del ELISA para la captura de antígeno	35
V. RESULTADOS	38
V.1. Purificación de anticuerpos dirigidos contra <i>T. cruzi</i>	38
V.1.a. Purificación de B106E	38
V.1.b. Análisis del AcMc B106E	39
V.1.c. Purificación de F14B	40
V.1.d. Análisis de F14B puro	41
V.1.e. Purificación de AcPc de conejo	42
V.1.f. Análisis de los AcPc de conejo.	42
V.2. Estandarización del ELISA de captura de antígeno	45
V.2. a. Combinación con AcPC de conejo y AcPc biotinilado	45
V.2. b. Combinación con AcPc de conejo y B106E.	46
V.2.c. Combinación con F14B y F14B biotinilado	47

V.2.d. Combinación con F14B y B106E biotinilado	48
V.2.e. Combinación con B106E y AcPc de conejo	49
V.2.f. Combinación con B106E y F14B biotinilado	50
V.2.g. Combinación con B106E y B106E biotinilado	51
V.2.h. Combinación con la mezcla F14B- B106E y F14B-B106E biot	52
V.3. Sensibilidad del ELISA de captura de antígenos	54
V.4. Especificidad del ELISA (B106E-B106E botinilado)	56
V.5. Detección de antígenos en suero de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	57
V.6. Detección de antígenos en plasma de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	62
V.7. Detección de antígenos circulantes de <i>T. cruzi</i> en suero humano	64
VI. DISCUSIÓN	66
VII. CONCLUSIONES	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71
APÉNDICE A	80
APÉNDICE B	81
APÉNDICE C	82
APÉNDICE D	83
APÉNDICE E	84
APÉNDICE F	85
APÉNDICE G	86
APÉNDICE H	88
APÉNDICE I	90

RESUMEN

Uno de los aspectos de mayor importancia en el estudio de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan la detección oportuna de la infección. Las técnicas sensibles, específicas y reproducibles para demostrar la presencia de antígenos libres de *T. cruzi* en el hospedero, tales como el ELISA, representan un avance en el control de la enfermedad ya que el diagnóstico temprano de ésta infección, previa a la producción de anticuerpos específicos en niveles detectables por serología, permitiría un mejor conocimiento de la evolución de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estandarizar y evaluar un método de ELISA para la determinación de antígenos circulantes del parásito, utilizando dos anticuerpos monoclonales (AcMc) F14B y B106E (producidos en ratón) y anticuerpos policlonales (AcPc) (producidos en conejo) dirigidos contra *T. cruzi*. Para la estandarización del ELISA se probaron diferentes concentraciones de los AcMc y AcPc, del extracto total de epimastigotes de la cepa Querétaro (Que) y de los anticuerpos marcados con biotina como segundo anticuerpo. La combinación que proporcionó mejores resultados fue en la que se usó el AcMc B106E a una concentración de 10 µg/ml como anticuerpo de captura y este mismo anticuerpo marcado con biotina diluido 1:2000 como anticuerpo de revelado; con estas condiciones se detectaron hasta 125 ng de antígeno. Después de la estandarización, se probaron plasmas de ratones infectados con *T. cruzi*, detectándose antígenos circulantes en 80% de las muestras. Sin embargo, se encontró que el ensayo no era 100% específico ya que ratones infectados con *Leishmania* sp, también resultaron positivos. Durante experimentos de cinética de infección en el modelo murino fue posible detectar antígenos circulantes en el suero. Al evaluar este ELISA con sueros de individuos en fase crónica sintomática y asintomática de la enfermedad, donde algunos tenían hemocultivo positivo, no se detectaron antígenos circulantes ya que no hubo diferencias con el grupo de sueros controles. Estos resultados se atribuyeron a una aparente baja concentración de antígenos circulantes que pudiera deberse a que éstos estén formando complejos inmunes o que dichos antígenos se encuentren atrapados en los tejidos del hospedero.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Biología de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular que causa la enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana. Este parásito es transmitido por varias especies de insectos reduvidos y muchas especies de mamíferos son reservorios de este protozooario patógeno (Kuhn, 1981).

I.1.a. Posición Taxonómica (Levine y cols., 1980; Cheng, 1986)

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

I.1.b. Morfología.

T. cruzi posee una mitocondria que recorre todo su citoplasma y presenta una zona definida denominada cinetoplasto que contiene DNA. La identificación de los estados de desarrollo del parásito se basa en criterios morfológicos como la posición del cinetoplasto y del núcleo, la forma general de la célula y del lugar donde emerge el flagelo. Según estos criterios se identifican tres formas del parásito (Pereira, 1990):

Tripomastigote. Se caracteriza porque es relativamente pequeño, mide de 16 a 20 μm (Schmidh y Roberts, 1989) tiene forma de c, un cinetoplasto voluminoso, subterminal y grande además de la membrana ondulante a lo largo del cuerpo, el cual es fino y puntiagudo. Esta forma no se multiplica pero constituye la forma infectante para los mamíferos y

triatominos. En los mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea (Atías y Apt, 1994) figura 1A.

Amastigote. Es la forma intracelular, prácticamente es inmóvil, tiene alta capacidad de multiplicarse por división binaria (Pinto, 1984) dentro del citoplasma de diferentes células como el corazón, músculo, hígado y vaso (Mehlron y Waldorf, 1988); carece de flagelo y membrana ondulante, su núcleo es central y el cinetoplasto es pequeño (1 a 4 μm) (Schmidth y Roberts, 1989) tiene forma redondeada o esférica y se encuentra en los tejidos de los mamíferos (Murray y cols., 1990) figura 1B.

Epimastigote. Es la forma de multiplicación del parásito en el interior del triatmino y la predominante en el medio de cultivo (Atías y Apt 1994). Es fusiforme, mide de 20 a 40 μm de longitud, el núcleo está en el centro, el cinetoplasto está situado cerca de la base del flagelo empezando a aparecer la membrana ondulante (Romero, 1993), figura 1C.

I.1.c. Ciclo de vida.

En el ciclo de vida de *T. cruzi* están involucrados organismos que fungen como huéspedes, reservorios y un artrópodo vector (Schmidth y Roberts, 1989).

El ciclo de vida de *T. cruzi* empieza cuando los tripomastigotes ingeridos por el vector al alimentarse de sangre contaminada de algún reservorio, se diferencian en epimastigotes, que se reproducen por fisión binaria longitudinal en el intestino medio del vector, éstos a su vez se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el recto y son eliminados con las heces y orina (Pereira, 1990) durante o después de haberse alimentado el insecto (Brenner, 1992).

Cuando los tripomastigotes metacíclicos ingresan al organismo mamífero a través de las membranas mucosas de la boca, ojos, nariz o abrasiones de la piel (Santos-Buch y Acosta, 1985); invaden una gran cantidad de células donde se diferencian a amastigotes (Schmidth y Roberts, 1989), se reproducen por fisión binaria simple que luego de varias generaciones rompen las células gliales en el sistema nervioso central, músculo cardíaco, tracto urogenital y el sistema reticuloendotelial. Posteriormente, se diferencian a tripomastigotes que por estar en la sangre se les denomina tripomastigotes sanguíneos (Romero, 1993), los cuales invaden nuevas células (Katz y cols., 1989), figura 2.

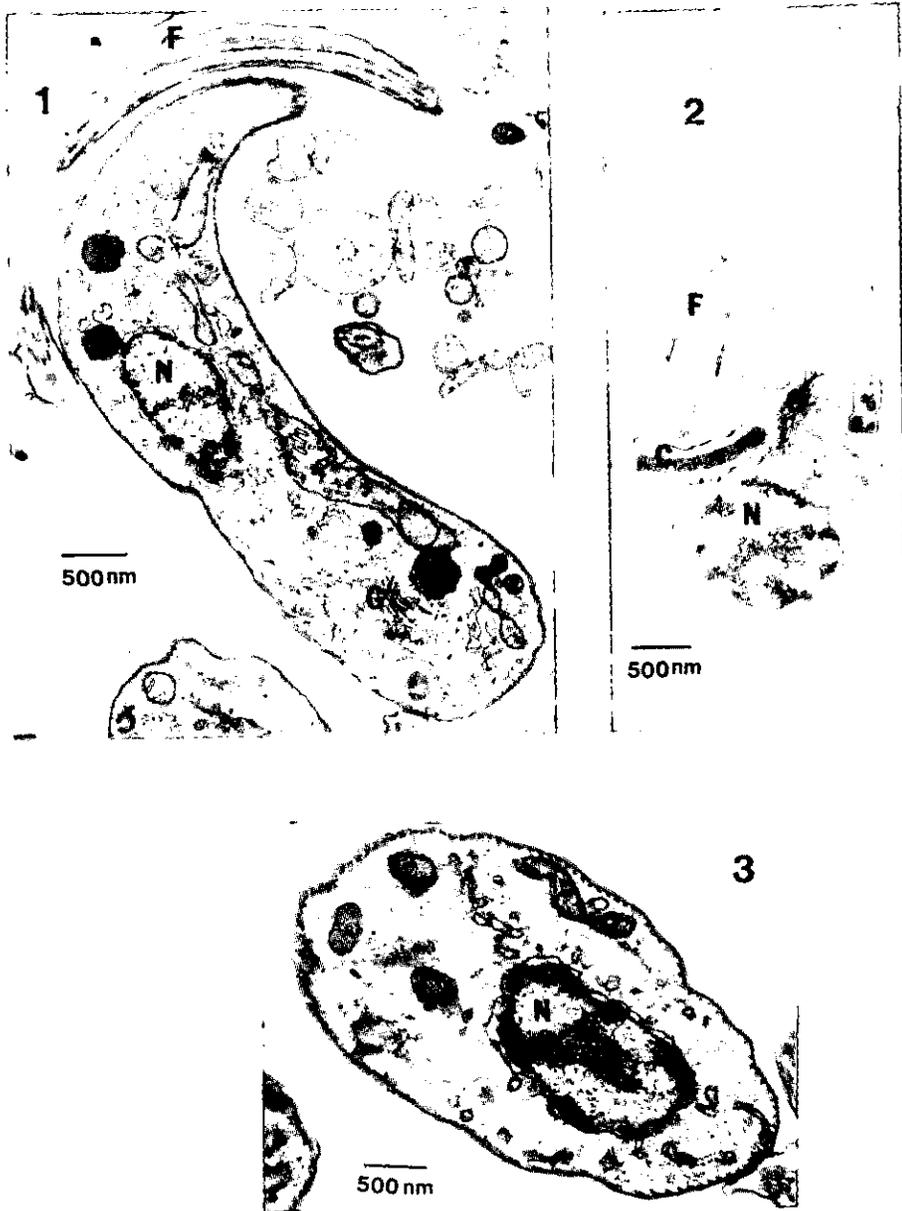


Figura 1. Ultraestructura de *T. cruzi* por microscopía electrónica de transmisión. 1) Tripomastigote (1000X), 2) Epimastigote (15000X) y 3) Amastigote (12000X). C cinetoplasto, G aparato de golgi, N núcleo y F flagelo. (Cortesía del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina. UNAM).

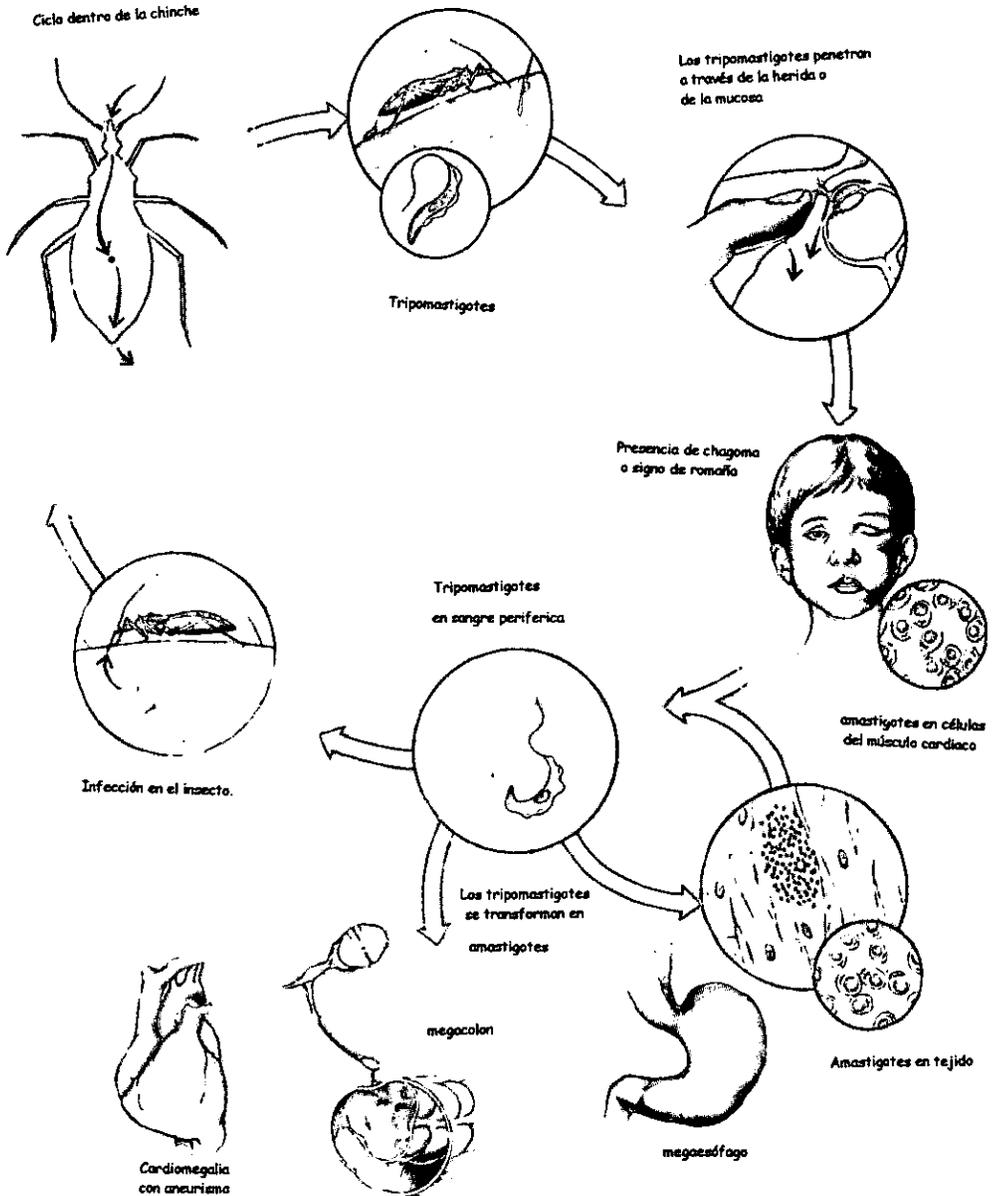


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Involucra los diferentes estadios del parásito tanto en la chinche como en el humano (tomado de Katz y cols., 1989).

I.2. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomosis Americana descubierta por Carlos Chagas en 1909, es endémica de Brasil y otros países latinoamericanos (Lewinsohn, 1981). Su alta prevalencia y elevadas tasas de morbi-mortalidad le confieren gran importancia, principalmente a nivel de poblaciones rurales y marginadas (Pinto, 1984). Sus manifestaciones y características epidemiológicas son muy variables entre las diferentes zonas endémicas por lo que existe gran diversidad en las formas de transmisión, características parasitarias, patología clínica, vectores y reservorios (OMS, 1991).

La infección humana se encuentra distribuida principalmente desde los 42° de latitud Norte (Norte de California y Maryland) hasta los 46° de latitud Sur (Sur de Argentina y Chile). Aunque el acceso a datos fidedignos sobre la prevalencia e incidencia de la enfermedad en seres humanos, mejoró en los años ochenta, aún es difícil conocer con exactitud la distribución de esta parasitosis (OMS, 1991).

Los países endémicos se clasifican en cuatro grupos a partir de los siguientes criterios: magnitud de la transmisión, la cantidad y la calidad de la información epidemiológica disponible, y la existencia de medidas coordinadas para controlar esta enfermedad.

Grupo I. Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela pertenecen a este grupo debido a la intensa prevalencia de la enfermedad, que ha obligado a las autoridades de salud a establecer programas de control más rigurosos.

Grupo II. En este grupo se encuentran Bolivia, Colombia y Costa Rica ya que se pudo comprobar la transmisión domiciliaria, donde existe una obvia relación entre la infección por *T. cruzi* y las anomalías registradas en electrocardiogramas, así como otras patologías.

Grupo III. En este grupo se incluyen El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá, en donde también se ha comprobado la transmisión domiciliaria. Los vectores que se encuentran en estos países tienen similares tasas de infección y de infestación.

Grupo IV. Los países incluidos en este grupo como México tienen en común la presencia de reservorios y de vectores naturalmente infectados con *T. cruzi*, por lo que la enfermedad es enzoótica (OMS, 1991), figura 3.

Originalmente la Tripanosomosis Americana fue una zoonosis restringida a un ciclo biológico selvático, entre mamíferos y triatominos silvestres; pero el hombre ha brindado las condiciones propicias para que se desarrolle un problema de salud pública de gran magnitud, reportando en la actualidad una población infectada de unos 20 millones de personas de los

cuales unos 5 millones padecen cardiopatía crónica progresiva e irreversible y una población de 90 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección (OMS, 1991). Considerada hasta hace poco como una endemia rural, de las áreas donde las condiciones de vivienda facilitan el ciclo de transmisión domiciliar, la enfermedad tiene también ahora una presentación urbana debido al fenómeno creciente de migración de la población rural hacia las ciudades, dando lugar a la formación de sectores marginales donde las condiciones de hacinamiento y de vivienda de mala calidad, facilitan la transmisión de la infección (Moncayo, 1992).

Aunque naturalmente la enfermedad de Chagas es exclusiva de los países Latinoamericanos, la dinámica de los movimientos migratorios de la población humana han permitido que se extienda a países no endémicos del mismo continente y de otros continentes. Solo en Estados Unidos, se estima actualmente que viven unas 100 000 personas infectadas debido a la inmigración de América Central (Kirchhoff, 1993), en Canadá y algunos países de Europa se han encontrado casos de infección adquiridos por transmisión sanguínea y congénita (Kirchhoff y Neva, 1983).



Figura 3. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Se muestran los principales países (zonas punteadas) con casos humanos infectados con *T. cruzi* (tomado de OMS, 1991).

1.2.a. Vectores de la Enfermedad de Chagas.

El hospedero intermediario o vector de esta parasitosis es un insecto hematófago de la familia Reduviidae (Tay y cols., 1992), se caracteriza porque su picadura es indolora debido a la presencia de anestésicos en la saliva, tiene una probóscide corta y recta constituida por tres segmentos que lo diferencia de las especies fitófagas que poseen una trompa formada por 4 segmentos. Los vectores están distribuidos principalmente en áreas tropicales y subtropicales, aunque se pueden encontrar en latitudes que corresponden a climas fríos (Schenone y cols., 1961). El triatomino se mantiene oculto en la vivienda y en el peridomicilio. Generalmente, se alimenta de noche ingiriendo una cantidad variable de sangre que depende de la fase del ciclo de vida, el cual es un vector potencial del parásito desde el primer estadio ninfal hasta el adulto (Tay y cols., 1992). En el Continente Americano existen alrededor de 50 especies naturalmente infectadas, las especies con mayor importancia epidemiológica que están ampliamente distribuidas en Latinoamérica son: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* y *Pastrongilus megistus* (Schenone y Rojas, 1989).

Con la llegada de los europeos al continente, los procesos de colonización, los movimientos migratorios y los asentamientos humanos, dieron lugar a una cadena de desequilibrios ecológicos que facilitaron que algunas especies de triatominos muy eficientes como transmisores del parásito, encontraran las condiciones favorables en el tipo de vivienda de la época, estableciéndose el ciclo de transmisión intradomiciliaria y un proceso de adaptación a la vivienda humana.

Por otro lado, las rutas de los intereses económicos de los conquistadores sirvieron para dispersar a los triatominos. Este es el caso de *T. infestans*, triatomino originario de Bolivia (Schofield y Dujardin, 1997) y dispersado durante la colonia a Brasil, Paraguay, Argentina, Chile y Perú.

Esta situación ha continuado y los triatominos al igual que otros vectores pueden ser transportados fácilmente. Se presume que en el siglo pasado, *R. prolixus* originario de Venezuela y Colombia fue transportado posiblemente por aves migratorias a Nicaragua, Honduras, el Salvador y Guatemala (Schofield y Dujardin, 1997).

I.2.b. Mecanismos de Transmisión.

Los humanos son infectados principalmente por vectores naturales, transfusión sanguínea y transmisión congénita (OMS, 1991). Sin embargo también se puede adquirir la infección por accidentes en el laboratorio, transplante de órganos, ingesta de leche materna, el desollamiento de animales silvestres, la ingestión de carne parasitada semicruda o de bebidas contaminadas con material fecal de triatomíneos (Velasco y cols., 1992; Pinto, 1992; Shikanai – Yasuda y cols., 1991).

Transmisión por el triatomino. En las regiones donde la enfermedad es endémica un individuo contrae la infección al entrar en contacto con heces contaminadas de triatomíneos (Pinto, 1984). Esta transmisión depende de varios factores que incluyen la densidad de los vectores y la capacidad de defecar inmediatamente después de haberse alimentado y haber eliminado gran cantidad de parásitos. Generalmente los niños o mamíferos jóvenes son los más susceptibles a este tipo de infección (Pinto, 1992).

Transmisión por transfusión sanguínea. Se sabe que por lo menos un 60% de chagásicos crónicos presentan permanentemente formas circulantes de *T. cruzi*. El parásito puede ser transmitido por vía sanguínea e inclusive permanece vivo en la sangre guardada en congelación durante 2 semanas o más. El parásito también se puede adquirir a través de trasplantes de órganos ya que se encuentra en riñón, páncreas, ganglios linfáticos, corazón, tubo digestivo y musculatura estriada. Para trasplantes o transfusiones, el empleo de corticoesteroides e inmunosupresores aumenta el riesgo de transmisión porque eleva la parasitemia del dador o disminuye la resistencia del receptor (Pinto, 1984).

Transmisión congénita. Ocurre en 0.7 a 10.5 % de niños donde la madre está infectada con el parásito. La infección intrauterina puede causar aborto o nacimiento prematuro. Los síntomas de la enfermedad pueden ser severos y aparecen poco tiempo después del parto o son asintomáticos. Los niños infectados raramente sobreviven hasta la pubertad (Brabin, 1992; Dusanic, 1991).

I.2.c. Cuadro Clínico de la Enfermedad de Chagas.

Esta enfermedad puede ser aguda, crónica sintomática o asintomática, uno de los signos tempranos es la presencia en el sitio de la infección o picadura, de una inflamación llamada chagoma (Murray y cols., 1990).

Fase aguda. Comprende el período inicial de la infección, es relativamente corta (4-8 semanas), se caracteriza por alta parasitemia, por la transitoriedad de los síntomas y signos, por las incipientes defensas humorales específicas y por un cuadro agudo y febril. El periodo de incubación es de 4 a 10 días siendo generalmente asintomático. Esta fase de la infección es fácilmente detectable por métodos parasitológicos directos (Dusanic, 1991).

Fase crónica asintomática o fase indeterminada. Comienza 8 o 10 semanas después de la fase aguda y puede durar varios años (OMS, 1991). El paciente carece de síntomas clínicos y al parecer goza de buena salud. Las pruebas serológicas son positivas y se detectan parásitos en la sangre por hemocultivo y xenodiagnóstico. Además, se pueden empezar a detectar ligeras anormalidades electrocardiográficas y radiológicas del corazón, esófago y colon (Rassi y cols., 1992; Dusanic, 1991; Santos-Buch y Acosta, 1985).

Fase crónica sintomática. Se caracteriza por una baja parasitemia pero con un nivel elevado y persistente de anticuerpos, la gran mayoría de los pacientes presentan palpitaciones, mareo, disnea, edema y dolor pectoral; cuando se presenta miocardiopatía chagásica, provoca insuficiencia cardiaca y en algunos casos muerte súbita (Pinto, 1984 y 1990). Los órganos más afectados durante esta fase son el esófago y el colon, ocasionando disfunción motora de estos órganos. Esta puede persistir indefinidamente en un número considerable de pacientes hasta 30-40% y evolucionar hacia una forma clínica definida, en un tiempo mas o menos prolongado (10 a 20 años) (Pinto 1984). Esta fase es mas frecuente en adultos (OMS, 1991).

I.2. d. Tratamiento.

Se han usado numerosos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero sin resultados satisfactorios. Los derivados del nitrofurano han mostrado tener una alta actividad tripanocida en la fase aguda, sin embargo, son muy tóxicos para el humano por lo que es necesario buscar nuevas estructuras químicas que puedan ser usadas para el tratamiento de esta enfermedad. Los dos fármacos que se han utilizado con mayor frecuencia son el nifurtimox y el benznidazol (Peña, 1999).

El nifurtimox (3-Metil-4(5' nitrofurforilidenamino-tetrahidro1-4)-thiazina1,1-dióxido), conocido como Bayer 2502 o Lampit, se utiliza para tratamiento de la enfermedad de Chagas, es efectivo en los casos agudos y al principio de la fase indeterminada. La dosis pediátrica en casos agudos es de 25 mg/kg. de peso diarios, por vía oral (Guardia y cols, 1989). En adultos, se empieza con 5 a 7 mg /kg de peso por día. La duración total del tratamiento es de 120 días.

El benznidazol (N-benzil-2-nitro-imidazol-1-acetamida), conocido como Ro-1051, Radanil o Rochagan, se ha utilizado principalmente en Argentina y otros países del cono sur desde 1971 demostrando considerable actividad antiparasitaria en la fase aguda (Romero, 1993). Se emplea a dosis de 5 mg/kg de peso diarios en adultos, y de 10 mg/kg por día en niños durante 60 días (Markel y cols., 1990).

Ambas drogas causan algunos efectos adversos relacionados con el sistema digestivo como la epigastralgia, hiporexia, náusea, vómito, y pérdida de peso que son más frecuentes con nifurtimox, mientras que reacciones de la piel son frecuentes con el benzonidazol. Los principales efectos observados con ambas drogas son alteraciones hematológicas por hipersensibilidad, alteraciones dermatológicas y neurológicas (National Health Foundation of Brazil, 1997).

I.3. Enfermedad de Chagas en México.

En México, la enfermedad es considerada como endémica en dos terceras partes del territorio nacional y actualmente su importancia se refleja en el aumento de casos comprobados de infección en humanos (Tay y cols., 1992) (figura 4). Sin embargo en nuestro país hablar sobre la enfermedad de Chagas implica enfrentar un problema complejo donde el primer paso es conocer la magnitud real de la enfermedad. Durante los últimos veinte años, ha crecido el interés por el estudio de esta enfermedad (Reyes y cols., 1983), pero se ha especulado sobre su importancia, ya que mientras unos consideran que la enfermedad es poco frecuente y que las cepas de *T. cruzi* presentes en México son poco patógenas (Salazar y cols., 1988), otros aseguran que es un problema importante de salud pública (Tay, 1980; Tay y cols., 1992 y Velasco y cols., 1992), debido a la presencia de casos de enfermedad aguda y que evolucionan hasta la muerte. Esto debería interesar a las autoridades sanitarias estatales para definir el estado real de esta enfermedad en nuestro país (Velasco y Guzmán, 1986; Velasco y cols., 1991).

Una posible explicación sobre estas diferencias en cuanto a la situación actual de la enfermedad de Chagas en México, es la falta de un diagnóstico serológico o parasitológico preciso de la Tripanosomosis Americana como causa de cardiopatía crónica en adultos ó debido al escaso o nulo conocimiento de la enfermedad por el médico (Reyes y cols., 1983).

Se han descrito casos humanos de infección por *T. cruzi* en los estados de Chiapas, Guerrero, estado de México, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, Jalisco y Zacatecas. Se estima que la prevalencia es mayor en los estados de la costa del pacífico desde Nayarit hasta Chiapas y

en la Península de Yucatán. Estudios realizados en 60 comunidades del Estado de Oaxaca, mostraron que el 16% de los habitantes tenían serología positiva, por ejemplo, en la localidad de Nopala, se estableció que entre el 8% de la población con serología positiva, también presentaba alteraciones electrocardiográficas (Rueggsegger y cols., 1993), e incluso se detectó el primer caso con megasigmoide (Tay y cols., 1987). Mas recientemente con técnicas serológicas como ELISA, Western Blot y hemocultivo se encontró que el estado de Morelos debe ser considerado como zona endémica de la enfermedad de Chagas ya que se demostró la presencia de individuos infectados (Sánchez, 1996).

Estudios realizados para conocer la incidencia de la respuesta humoral a *T. cruzi* en individuos con diagnóstico establecido de miocardiopatía dilatada en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" indicaron que la enfermedad fue más frecuente en pacientes de origen rural, principalmente de los estados de Veracruz, Oaxaca, Morelos, y San Luis Potosí, cuyas edades oscilaron entre 26 y 73 años (Monteón y cols., 1996). Por contraelectroforesis, se detectó el caso de un niño de 14 meses de Comacalco, Tabasco, que presentó fiebre, signo de Romaña, insuficiencia cardiaca congestiva, hipergammaglobulinemia policlonal y anticuerpos contra el parásito (Reyes y cols., 1983). Estos estudios indican que la enfermedad de Chagas puede ser un factor etiológico importante de la miocardiopatía dilatada (Rodas y cols., 1992).



Figura 4. Distribución de la enfermedad de Chagas en México. Se muestran los principales estados donde se han diagnosticado casos de infección causada por *T. cruzi* (tomado de Tay y cols., 1992).

Entre 1994 y 1996, se realizó un estudio en bancos de sangre de 18 centros estatales de transfusión sanguínea, para conocer el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por esta vía en México y estimar así la prevalencia de la infección. Los resultados que se obtuvieron indicaron, que de los 64,969 donantes de sangre estudiados en los centros de transfusión participantes, 996 fueron positivos a la prueba de tamizaje (hemaglutinación indirecta), lo cual equivale a una prevalencia de infección de 1.5%. La seropositividad osciló entre 0.2 y 2.8 %. En el estado de Hidalgo la prevalencia fue 14 veces mayor que en el estado de Chihuahua (Tabla 1). De los sueros positivos al tamizaje de anticuerpos contra *T. cruzi*, se confirmaron 647 por inmunofluorescencia indirecta, lo cual corresponde a 64% de los individuos seropositivos por hemaglutinación indirecta (Guzmán-Bracho y cols., 1998). También se ha demostrado la presencia de anticuerpos (0.28%) contra *T. cruzi* en donadores de sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" utilizando ELISA-DOT, Western blot y ELISA (Ramos-Echevarría y cols., 1993).

Tabla 1. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre de diversos estados de México, 1994-1996 (Guzmán- Bracho y cols., 1998).

Estado	No. Personas estudiadas	Seroprevalencia (%)
Hidalgo	15568	2.8
Tlaxcala	2921	1.9
Puebla	4321	1.8
Chiapas	3227	1.8
Yucatán	7144	1.7
Oaxaca	8186	1.1
Veracruz	996	1.1
San Luis Potosí	505	1.0
Distrito Federal	2300	1.0
Morelos	3013	0.8
Tabasco	727	0.8
Guerrero	5760	0.7
Jalisco	4081	0.7
Colima	986	0.5
Nuevo León	431	0.5
Quintana Roo	2736	0.4
Querétaro	874	0.3
Total	64969	Promedio 1.5

Estos estudios sugieren que se debe incorporar la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* como una medida de los bancos de sangre, que permita conocer con mayor precisión el grado de infección por *T. cruzi* en las diversas regiones (Velasco y cols., 1992). Debido a que la población campesina que migra a las ciudades industrializadas o turísticas en busca de trabajo dispersa la enfermedad de Chagas por todo el país y aumenta el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre en las áreas urbanas (Goldsmith y cols., 1978; Guzmán-Bracho y cols., 1998).

En cuanto a los vectores de *T. cruzi* en México, se han descrito 27 especies de triatomos infectados con *T. cruzi* donde la mayoría son parcial o totalmente silvestres, aunque *T. barberi* es completamente domiciliada. Se ha considerado que *T. dimidiata* es un vector importante ya que se ha encontrado en casas y asociado a los reservorios como armadillos y zari güeyas (Zárate y Zárate, 1985). Algunas especies como *T. phyllosoma*, *T. barberi*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* son las que tienen hábitos domésticos marcados, ya que se les ha encontrado dentro de la habitación humana rural e incluso en la periurbana en los diferentes estadios ninfales y adultos, detectándose altos índices de infección por *T. cruzi* (Tay y cols., 1996). También se han encontrado vectores en criaderos de animales como gallinas, perros, cerdos, en nidos de ratas, ratones, perros y armadillos (Tay y cols., 1992). Bautista en 1993, realizó un estudio de vectores de *T. cruzi* en el estado de Morelos, comprobando la presencia de triatomos en áreas intradomiciliarias, peridomiciliarias y silvestres. Según la OMS, hasta 1991, se habían encontrado vectores y mamíferos infectados en Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo y Jalisco (OMS, 1991).

En cuanto a los reservorios de *T. cruzi*, han sido diagnosticados animales domésticos y silvestres. De los silvestres los más comúnmente observados son la rata, el armadillo, el tlacuache, las ardillas y ratones (Velasco y Guzmán, 1986) aunque también algunas especies de mamíferos como el jabalí, el venado de cola blanca, el ocelote, pudieran tener alguna relación con la persistencia natural de la enfermedad y como riesgo potencial de transmisión a la población local humana (Solís y cols., 1997). Entre los reservorios domésticos se encuentran el perro y el gato, además llama la atención el caso de un cerdo infectado naturalmente, el cual fue detectado por xenodiagnóstico, pruebas serológicas, exámenes histopatológicos y la inoculación en animales de experimentación (Bautista, 1993; Salazar y cols., 1997).

I.4. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

El diagnóstico de la enfermedad se fundamenta en antecedentes epidemiológicos que incluyen procedencia o lugar de origen del individuo, el tipo de habitación, el conocimiento de los triatomíneos y si ha ocurrido la picadura del insecto (Romero, 1993), así como datos clínicos (Atías y Apt, 1994). Durante la fase aguda suele haber confusiones con varias enfermedades infecciosas febriles. Sin embargo, la presencia del chagoma de inoculación o signo de Romaña es una característica clínica que contribuye al diagnóstico. En la fase crónica, el diagnóstico por métodos parasitológicos es difícil, debido a la baja parasitemia, por lo que se usan métodos indirectos, que a pesar de presentar alta sensibilidad, tienen problemas de reacción cruzada con otros parásitos como *Leishmania* sp. (Malchiodi y cols., 1994), por lo que es necesario establecer el diagnóstico clínico diferencial con otras enfermedades (Luquetti, 1990) (Tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidad de algunos métodos de diagnóstico utilizados en la enfermedad de Chagas (OMS, 1991).

Métodos de Diagnóstico	Sensibilidad %	
	Fase aguda	Fase crónica
Directos		
Frotis delgado	< 60	< 10
Frotis sanguíneo grueso	<70	< 10
Examen de sangre fresca	80-90	< 10
Método de Strout	90-100	<10
Indirectos		
Xenodiagnóstico	100	20-50
Hemocultivo	100	40-50
Serológicos		
ELISA		78.1*
Inmunofluorescencia		69.2*
Hemaglutinación		64.6*
Moleculares		
PCR		96.5+

* Zicker y cols., 1990.

+ Wincker y cols., 1997.

I.4.a. Métodos parasitológicos directos.

Consisten principalmente en la observación directa del parásito durante las primeras 6-8 semanas de la infección (Chiari, 1994). Se emplean técnicas como el frotis sanguíneo grueso, el microhematocrito, el examen de las preparaciones coloreadas que permiten la caracterización morfológica del parásito mientras que las preparaciones frescas permiten

detectar a los parásitos por su movilidad (OMS, 1991). Se utiliza también el método de concentración de Strout, el método de Daene Kirchner y el método de silicones (Freilij y Storino, 1994). La observación y aislamiento del parásito en muestras orgánicas del paciente confirman eficazmente el diagnóstico. Sin embargo, esto resulta muy difícil en la fase crónica de la enfermedad.

Método de Strout. Consiste en extraer 5-10 ml de sangre por punción venosa, la cual se deja coagular, el coágulo se descarta y se centrifuga el suero a 160 g por 30 minutos. El sobrenadante se centrifuga y se examina una gota del sedimento obtenida por microscopía directa (Freilij y Storino, 1994).

Método de Silicones. Concentra los hemoparásitos exoeritrocíticos. La sangre se deposita sobre aceite de silicones de 1.075 de densidad. Luego de una centrifugación, los hematíes quedan en el fondo mientras que las plaquetas, los leucocitos y los parásitos quedan en suspensión en la parte superior del aceite de silicones. Esta suspensión se centrifuga y se obtiene un sedimento que se observa al microscopio (Freilij y Storino, 1994).

Método de Deane y Kircher. Se basa en la lisis diferencial de los glóbulos rojos, donde a 1 ml de sangre extraída con anticoagulante se le agregan 9 ml de agua destilada y luego de mezclar rápidamente, una solución de cloruro de sodio al 17%, agitando siempre en rotación. Esta mezcla es centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos y el sedimento se observa al microscopio para la identificación de los parásitos (Freilij y Storino, 1994).

1.4.b. Métodos parasitológicos indirectos

Son usados principalmente para el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad.

Xenodiagnóstico. Consiste en la reproducción artificial del ciclo natural del parásito a través de 40 ninfas de tercer estadio de *T. infestans* o *R. prolixus* libres de infección y criados en el laboratorio o ninfas de primer estadio de *Dipetalogaster maxima* distribuidas 10 por cada caja, las cuales se alimentan de la sangre del paciente. Después de 30 a 60 días, se examinan las heces y los intestinos bajo el microscopio con el fin de detectar tripomastigotes metacíclicos o epimastigotes, una fuente de error en el xenodiagnóstico es la presencia de *T. rangeli* que infecta humanos pero no es patógeno (Pereira y cols., 1989; OMS, 1991). Algunos estudios

sugirieron que la eficacia del xenodiagnóstico, para la enfermedad de Chagas crónica, parece estar asociada al insecto utilizado, ya que se encontró que *P. megistus* era el más adecuado debido a su alto índice de infectividad, elevada carga parasitaria, una rápida evolución y buena multiplicación de los pocos parásitos ingeridos del hospedero en la fase crónica (Szumlewicz y Muller, 1987).

Hemocultivo. El cultivo sanguíneo permite el crecimiento de los parásitos por períodos largos de tiempo. La eficacia del método puede aumentarse mediante la centrifugación diferencial de la sangre antes de agregarla al medio (Pereira y cols., 1989). En la fase crónica de la enfermedad se pueden detectar parásitos en el 40 al 50% de los pacientes. Este método se ha utilizado para evaluar la curación después del tratamiento, donde se realizan numerosos cultivos sanguíneos y/o métodos serológicos (OMS, 1991). En el hemocultivo, se realizan observaciones directas desde la extracción hasta 90 días después en intervalos de 10 días. Esta técnica tiene la facilidad de implementarse en los laboratorios de diagnóstico y puede dar resultados positivos en pacientes que se encuentran en fase indeterminada de la enfermedad (Sánchez, 1996).

1.4.c. Métodos moleculares.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. En general los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos específicos que flanquean el segmento del gen que actúa como blanco para la amplificación), mezcla de desoxinucleótidos (DNTPs) solución amortiguadora de reacción y ADN Polimerasa. Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos que están determinados por temperaturas y tiempos específicos (Barrera y cols., 1993). En el caso de *T. cruzi* se utilizan oligonucleótidos de la secuencia nuclear del parásito o la secuencia del minicírculo del kADN. Algunos estudios demostraron que en ciertas condiciones el PCR presenta 100% de sensibilidad y 90% de especificidad en la detección de *T. cruzi* en la sangre de pacientes chagásicos utilizando el fragmento de 330 pb perteneciente a la región hipervariable de *T. cruzi* (Degrave, 1994). Se ha aplicado la PCR en áreas de transmisión activas donde los casos crónicos y agudos coexisten y que pueden complementarse con los datos obtenidos de la serología (Wincker y cols., 1997).

1.4.d. Métodos serológicos.

La base de las técnicas serológicas es la reacción de los anticuerpos con componentes antigénicos del parásito, resultando en complejos antígeno-anticuerpo específicos (Weiland, 1988). Son eficaces para detectar anticuerpos o antígenos del parásito; entre las diversas pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de la infección, las más usadas son: la prueba de fijación del complemento, la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la aglutinación directa y el ensayo de ELISA. Debido a que la especificidad de las pruebas puede variar considerablemente de un sitio geográfico a otro, los límites de la positividad pueden definirse localmente utilizando un panel serológico. Son también comunes las discrepancias entre resultados de la misma prueba efectuada en distintos laboratorios, de ahí que se recomiende el empleo de al menos dos pruebas serológicas para confirmar la infección (OMS, 1991; Camargo, y cols., 1986; Figueredo-Silva y cols., 1991).

Fijación del complemento (FC). Presenta alta sensibilidad para el diagnóstico de casos crónicos sintomáticos, asintomáticos y elevada especificidad cuando se utilizan los antígenos adecuados. La complejidad de la técnica y la diversidad de antígenos usados en el diagnóstico de rutina, contribuyen a las diferencias en la sensibilidad de esta reacción. Se observan así resultados negativos en la fase inicial de la enfermedad y menor sensibilidad que en las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación en la fase crónica. La FC presenta dos fases, una consiste en la incubación del suero del paciente con el antígeno apropiado y con una cantidad específica de complemento. La segunda fase es la del indicador, en la cual la presencia de una reacción antígeno-anticuerpo que ha ocurrido en la primera fase queda indicada porque el complemento se fija a estos complejos y pierde por lo tanto, su reactividad en el ensayo (Levy y cols., 1988). Los eritrocitos de la sangre recubiertos con su anticuerpo específico se añaden a la mezcla de la fase uno, y si queda algo de complemento libre, este queda entonces ligado a los eritrocitos recubiertos por el anticuerpo causando la lisis de dichas células. Al contrario, la ausencia de lisis en la fase dos indica la fijación del complemento y la presencia en el suero de un anticuerpo reactivo con el antígeno en la primera fase de la prueba. Se han empleado extensamente extractos acuosos o de metanol de *T. cruzi*, que han sido substituidos por fracciones purificadas del parásito en un intento de normalizar la sensibilidad y especificidad (OMS, 1991). Con la FC se obtiene una gran variedad de resultados por lo que no se considera un método eficaz para la detección de la infección (Pereira y cols., 1989), además es una prueba tediosa que requiere un estricto control de calidad de los

reactivos difícil de obtener en el laboratorio de rutina (Luquetti, 1990).

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Presenta excelentes resultados en el diagnóstico de las fases agudas y crónicas de la infección. Los sueros de chagásicos en dilución 1:40 muestran alta especificidad, aunque pueden ocurrir reacciones falso positivas con sueros de pacientes con Leishmaniosis visceral y cutánea. La utilización del diluido de sangre, desecado en papel filtro provee resultados semejantes a los obtenidos con sueros que han sido mantenidos por periodos de hasta treinta días a temperatura ambiente. La IFI se vuelve positiva en la mayoría de los casos agudos 3 o 4 semanas antes que las otras reacciones permitiendo así la caracterización de la fase inicial de la infección y de transmisión congénita a través de la búsqueda de anticuerpos IgM. Los epimastigotes fijados con formol son antígenos estables. La IFI ofrece la ventaja de que puede emplearse para diferenciar anticuerpos IgM de las IgG (Primavera y cols., 1990).

Hemaglutinación Indirecta (HAI). Consiste en la modificación de las membranas de los glóbulos rojos por medio de ácido tánico, los cuales son capaces de absorber los antígenos parasitarios que en presencia de anticuerpos, formarán redes, cuya imagen produce el fenómeno de aglutinación. Presenta durante la fase inicial de la infección, una sensibilidad superior a la reacción de FC. Durante la fase crónica, los resultados son comparables a la IFI. Se utilizan hematíes estabilizados con glutaraldehído y sensibilizados con extractos de epimastigotes de *T. cruzi*. Estas células se pueden conservar a 4°C por largos periodos sin que se presenten alteraciones, lo que permite y facilita la estandarización de la HAI (Ferreira, 1994).

Hemaglutinación Directa (HAD). Se obtiene un reactivo estable con suspensiones de epimastigotes tratados con formol y tripsina. Se realiza la absorción de sueros con 2 mercaptoetanol que aumenta la especificidad de la técnica, sin disminuir la sensibilidad, para la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, se considera que no es una buena técnica de diagnóstico (OMS, 1991).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA). El principio básico del ELISA es el uso de un anticuerpo acoplado a una enzima como la peroxidasa la cual reacciona con su sustrato dando una coloración. El cambio de color es visualizado por un lector para determinar la presencia de antígenos o de anticuerpos presentes en una muestra problema (Carpenter, 1990; Maizels y

cols., 1991). La sensibilidad del ELISA depende en gran medida de los antígenos empleados (extracto total del parásito, antígenos puros o recombinantes).

También se han utilizado como antígenos péptidos sintéticos que se caracterizan por poseer epitopes específicos que generan una respuesta inmune contra el parásito (Zingales y cols., 1990; Peralta y cols, 1994) y por lo tanto son de utilidad en el diagnóstico serológico. Por ejemplo, los péptidos TcD y PEP2 utilizados en ELISA, mostraron una sensibilidad de 93 y 91% respectivamente y no presentaron reacción cruzada con *Leishmania* sp. Ensayos de ELISA usando la mezcla de los péptidos, mostraron 99.7% de sensibilidad y 99% de especificidad (Zingales y cols., 1990).

La sensibilidad y especificidad del ELISA utilizando antígenos recombinantes como herramienta del diagnóstico ha sido evaluada en diferentes estudios coordinados por la OMS (Franco da Silveira, 1994; Affranchino y cols., 1989). El uso de antígenos recombinantes podría ser de gran ayuda en el diagnóstico porque su expresión, en vectores de alto rendimiento, facilitaría la producción en gran cantidad y con un grado aceptable de pureza (Almeida y cols., 1990).

La reacción cruzada que se observa entre *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania* sp. en las pruebas serológicas conduce a la identificación de antígenos que pudieran ser usados para distinguir entre las infecciones provocadas por estos tres parásitos, por ello se han descrito sistemas con diferentes antígenos puros como la GP90 (Schechter y cols., 1983; Guhl, 1990) que se encuentra en tripomastigotes sanguíneos, amastigotes y epimastigotes (Snary y Hudson, 1979) o la GP25 (Scharfstein y cols., 1985), las cuales son altamente específicas para *T. cruzi*. La glicoproteína (GP90) mostró una sensibilidad, especificidad y valor predictivo del 100% considerándose que los antígenos puros pudieran proveer la base práctica para el diagnóstico especialmente en áreas donde existe la necesidad de distinguir entre infecciones patógenas y no patógenas (Guhl, 1990).

I.4.e. Detección de antígenos en circulación.

Los métodos serológicos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se han enfocado principalmente a la determinación de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Sin embargo, es importante contar con pruebas que presenten evidencia definitiva de la presencia del parásito, lo cual podría lograrse mediante la detección de antígenos circulantes. A este respecto, se sabe que los antígenos circulantes y/o exoantígenos (Gruppi y cols, 1997) tienen tres posibles orígenes: productos metabólicos secretados por los parásitos, componentes

solubles de la pared celular y componentes citoplasmáticos liberados por la degradación de los parásitos en el hospedero (Moretti y cols., 1985). Los exoantígenos han sido descritos en varias infecciones causadas por virus (Voller y cols., 1976 y Unkonen y cols., 1977), bacterias (Beauvery y cols., 1979), protozoarios (Turunen, 1983; Ungar y cols., 1985) y helmintos (Li y cols., 1994; Deelder y cols., 1996). Estos exoantígenos son muy importantes porque representan un factor de estimulación permanente de la respuesta inmune (Carlier y cols., 1976), ya que tienen propiedades inmunogénicas y carecen de toxicidad (Araujo, 1976). También han sido propuestos como indicadores de infección activa y por lo tanto son útiles en el diagnóstico (Carlier y cols., 1976) principalmente cuando no hay suficientes títulos de anticuerpos que puedan ser detectados por las pruebas serológicas tradicionales (Ferreira, 1994). Por lo tanto, los estudios de antígenos circulantes son importantes para el diagnóstico de la fase aguda y crónica de la enfermedad lo que da un indicio de la infección activa (Mancipar y cols, 1982).

Uno de los primeros estudios de detección de antígenos circulantes de *T. cruzi*, fue el trabajo de Siqueira y colaboradores en 1966, donde se reportó la presencia de un antígeno soluble en el plasma de ratones por la prueba de reacción de fijación de complemento y reacción de precipitación en agar-gel.

En 1976, Araujo describió la presencia de antígenos solubles en el plasma de ratones infectados y en el sobrenadante del cultivo por pruebas como la fijación del complemento e inmunolectroforesis. Sus estudios sugirieron que los antígenos, que estaban presentes en ratones con infección aguda, eran los responsables de las manifestaciones de hipersensibilidad descritas en la infección de la enfermedad de Chagas humana.

Chávez y colaboradores, en 1979 identificaron complejos inmunes circulantes formados por la participación de antígenos parasitarios, lo que pudiera explicar en parte la depleción del complemento debido a su capacidad de reaccionar con el componente C1q. Esta reacción es inhibida cuando los inmunocomplejos son separados y alquilados.

Araujo y colaboradores en 1981 demostraron la presencia de antígenos en el suero humano por medio de ELISA.

Se ha encontrado que existen antígenos específicos de epimastigotes y amastigotes que el parásito pierde durante la transformación de un estado a otro, siendo detectados en el suero y otros fluidos del cuerpo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra epimastigotes y amastigotes de este parásito. Los anticuerpos monoclonales pueden ser usados para dilucidar el papel exacto de los antígenos en la resistencia de *T. cruzi* y los

mecanismos por el cual el parásito sobrevive en el hospedero a pesar de la respuesta inmune (Araujo, 1982).

Mancipar y colaboradores en 1982 propusieron que existen glicopéptidos altamente antigénicos que se expresan tanto en medio de cultivo como en el hospedero.

En 1985, Moretti y colaboradores, estudiaron las condiciones de aparición de exoantígenos de *T. cruzi* en ratones infectados, determinando el nivel de parasitemia, el tiempo de infección y la presencia de anticuerpos contra los exoantígenos en los animales infectados.

Con la prueba de aglutinación se demostró la presencia de antígenos excretados específicamente en orina. Los antígenos detectados mediante esta técnica, eventualmente fueron caracterizados e identificados por cromatografía de afinidad y electroforesis bidimensional, como proteínas de peso molecular aproximado de 100 kDa, punto isoeléctrico (pI) de 5.0-5.5 de 80 kDa con pI 6.0 y de 50 kDa pI 6.5-7.0 (Katzin y cols., 1989).

Corral y colaboradores en 1989, reportaron la presencia de un antígeno excretado de 80 kDa en la orina de perros infectados con *T. cruzi*, cuyo punto isoeléctrico fue de 6.3-6.5.

En 1991, Ouassi y colaboradores realizaron un estudio utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos de secreción del parásito, el cual fue utilizado como anticuerpo de captura de antígenos siendo su prueba altamente sensible y específica.

En 1992, Corral y colaboradores, describieron una técnica sencilla y sensible basada en la unión del antígeno a nitrocelulosa, con esta técnica demostró la presencia de antígenos en suero de ratones infectados y en suero de humanos.

En 1998, Corral y colaboradores encontraron que el antígeno de 80 kDa fue reconocido preferentemente por anticuerpos de isotipo IgM de individuos chagásicos. Al hacer una comparación en un ELISA; utilizando el lisado del antígeno total del parásito y el antígeno urinario purificado por cromatografía de afinidad, encontraron que con el antígeno de 80 kDa, se incrementó la sensibilidad y especificidad de la prueba al evaluar sueros de pacientes con infección aguda. Por lo tanto, sugirieron que este antígeno puede ser usado para el diagnóstico de la infección de *T. cruzi* en fase aguda de la enfermedad.

En 1993, Umezawa y colaboradores, produjeron un antisuero con antígenos recombinantes para detectar antígenos en orina de pacientes crónicos con el fin de incrementar la especificidad del ELISA y del Western Blot, detectaron en sus ensayos una banda antigénica de 150-160 kDa, la especificidad fue del 60% mientras que otras pruebas como el xenodiagnóstico y el hemocultivo solamente confirmaron del 20 al 50% de los pacientes crónicos. Estos autores sugirieron que las muestras de orina simplifican el diagnóstico ya que los resultados pueden ser obtenidos 48 hr después de haber colectado la muestra. Una posible

correlación entre la presencia de esos antígenos en orina y la infección activa puede ofrecer una nueva herramienta para evaluar la susceptibilidad de *T. cruzi* en estudios terapéuticos. Esta prueba puede ser usada en casos donde hay conflicto de serología o como un paso previo al xenodiagnóstico (Umezawa y cols., 1993).

Por otro lado, se han detectado componentes antigénicos liberados por el parásito como el polipéptido de 50-55 kDa identificado, como la tubulina de *T. cruzi*, en la orina de ratones con infección aguda (Bertot y cols., 1998).

En la tabla 3 se muestra una recopilación de los antígenos identificados en diferentes fluidos biológicos utilizando métodos serológicos.

Tabla 3. Detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* por diferentes grupos de investigación.

Método de detección	Tipo de muestra	Antígenos kDa	Hospedero	Referencia
FC y precipitación en agar-gel	Suero	Nd	Ratas	Siqueira y cols., 1966.
FC y Contrainmunolectroforesis	Plasma	Nd	Ratones	Araujo, 1976.
Inmunoprecipitación	Plasma	Carbohidrato	Ratones	Gottlieb, 1977.
Inmunodifusión	Suero	Nd	Ratones	Chávez y cols., 1979.
ELISA	Suero	Nd	Humano	Araujo, 1981.
ELISA, IFI	Plasma y orina	Nd	Conejo y ratones	Araujo, 1982.
IFI	Suero y medio de cultivo	Nd	Ratones	Araujo y cols., 1982
ELISA	Orina y suero	80 y 55	Humano	Freilij y cols., 1987.
Aglutinación	Orina	100, 80 y 50	Humano	Katzin y cols., 1989.
Western blot	Orina	100-200	Humano	Katzin y Umezawa, 1991.
ELISA	Suero	Nd	Humano	Ouassi, 1991.
ELISA	Suero	Nd	Humano	Petry y cols., 1992.
DOT-BLOT	Suero y sobrenadante de cultivo de células infectadas	Nd	Ratones y humanos	Corral y cols., 1992.
ELISA	Orina	150-160	Humano	Umezawa y cols., 1993
ELISA	Orina	Nd	Humano	Coral, 1996
ELISA	Orina	Tubulina	Ratones	Bertot y cols., 1998.
ELISA	Orina	80	Perro	Corral y cols., 1998.

1.5. Anticuerpos Monoclonales.

El suero contiene muchos tipos de anticuerpos que son específicos para diferentes antígenos. El uso de esa mezcla de anticuerpos crea diferentes problemas con la técnicas inmunoquímicas. Debido a esto, se investigó la manera de producir anticuerpos homogéneos con una especificidad definida, la cual fue desarrollada con la tecnología de los hibridomas. El primer aislamiento de una población homogénea fue a partir de los tumores de las células B. Las poblaciones clonales de esas células se propagan como tumores en animales o en cultivo celular. Debido a que todos los anticuerpos secretados por las clonas de células B son idénticas, esas células tumorosas dieron origen a anticuerpos homogéneos. En el animal, los anticuerpos son sintetizados primariamente por células plasmáticas (Harlow y Lane, 1988).

Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse para purificar diferentes moléculas de superficie celular, algunas de las cuales pueden ser moléculas conocidas y otras no. Algunas de las aplicaciones más comunes de los hibridomas y de los anticuerpos monoclonales son las siguientes: identificación de los marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular e inmunodiagnóstico.

Debido a que el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas sistémicas se basa en la detección de antígenos o anticuerpos específicos, estos anticuerpos pueden utilizarse en inmunoanálisis (Abbas y cols., 1995).

Los anticuerpos monoclonales han sido empleados frecuentemente para identificar cepas de *T. cruzi* (Bongertz y Carvalho, 1992), moléculas asociadas con la patogenicidad o virulencia de los parásitos, para caracterizar antígenos inmunoprotectores después de la vacunación con *Leishmania* sp (Grimaldi y McMahon-Pratt, 1996), así como para antígenos puros que complementen los métodos de diagnóstico (Weiland, 1988; Tachibana y cols., 1988). También los anticuerpos monoclonales son utilizados para determinar la importancia de la respuesta humoral en la resistencia a *T. cruzi* y los mecanismos por los cuales el parásito sobrevive en el hospedero (Araujo y cols., 1982).

II. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Chagas resulta difícil ya que los síntomas pueden ser confundidos con otros padecimientos, debido a esto, resulta muy importante desarrollar métodos serológicos de diagnóstico específicos para detectar tanto a los anticuerpos como a los antígenos del parásito a fin de conocer si el individuo se encuentra infectado. La detección de anticuerpos es solo un diagnóstico de posible contacto con el parásito y la comprobación real de la infección se da con la determinación de la presencia del parásito o de sus productos de secreción. Existen reportes de la presencia de antígenos de *T. cruzi* en suero de animales y en humanos infectados por este parásito. Debido a que en nuestro país aún hay pocos datos de la prevalencia e importancia de la enfermedad de Chagas, el objetivo de este estudio fue estandarizar un ELISA para detectar antígenos de *T. cruzi* utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra este parásito.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general.

Estandarizar y evaluar un ELISA de doble captura para la detección de antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi*.

III.1.a. Objetivos particulares.

Purificar los anticuerpos monoclonales y policlonales para el ELISA de captura.

Estandarizar el ensayo con plasmas y sueros de ratones infectados experimentalmente.

Determinar la sensibilidad y la especificidad del ELISA.

Evaluar la utilidad del ELISA para el diagnóstico humano.

IV. MATERIAL Y METODOS.

IV.1. Anticuerpos Monoclonales.

Las características de los anticuerpos monoclonales (AcMc), producidos en el laboratorio del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, contra antígenos de la cepa Querétaro (Que) de *T. cruzi*, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los anticuerpos monoclonales B106E y F14B.

Características	B106E	F14B
Isotipo	IgG 2 ^a	IgM
Antígeno que reconoce	Doblete >100 kDa	Doblete de 40 y una de 35 kDa
Especificidad	No cruza con <i>Leishmania</i> sp	Cruza con <i>Leishmania</i> sp
Estadio que reconoce	Epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes	Reconoce los mismos antígenos en los tres estadios del parásito
Localización	Está dirigido contra un epitopo de superficie del parásito.	Está dirigido contra un epitopo liberado al medio de cultivo de células Vero infectadas
Funciones	Logró reducir la infección de <i>T. cruzi</i> a células Vero y a ratones	Retrasó la infección de <i>T. cruzi</i> a células Vero y a ratones

IV.2. Cultivo de hibridomas.

IV.2.a. Descongelamiento de células.

Los criotubos (Nunc) que contenían los hibridomas B106E y F14B congelados en nitrógeno líquido, se transfirieron a un baño de 37°C para su descongelamiento bajo condiciones de esterilidad, se limpió la taparrosca de los criotubos con alcohol al 70%. Se removieron las células con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron en tubos de centrifuga que contenían 10 ml de medio de cultivo D-MEM (GIBCO) a pH 7.3 complementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) inactivado (56°C por 30 minutos) a una concentración final de 10%,

penicilina-estreptomicina a 100 µg/ml (SIGMA), L-glutamina 0.2 mM (GIBCO), aminoácidos no-esenciales 0.01 mM (GIBCO), piruvato de sodio 0.1 mM (SIGMA) y vitaminas-MEM (dilución 1:100.GIBCO). Se centrifugaron a 300 g por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se transfirieron a cajas de cultivo de 25 cm² (Costar) debidamente etiquetadas que contenían 8 ml de medio de cultivo fresco para su crecimiento (Apéndice A) (Harlow y Lane, 1988).

IV.2.b. Crecimiento de células.

Las células se transfirieron a cajas de cultivo de 75 cm² (Costar). Se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos y se guardó a -20°C para la purificación de los AcMc. Las células que se obtuvieron, se sembraron en cajas de cultivo de 75 cm² a las que se les adicionó 20 ml de medio de cultivo fresco aproximadamente cada tres días. Los cultivos celulares se incubaron a 37° C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

IV.2.c. Congelamiento de células.

Los cultivos celulares se criopreservaron de la siguiente manera: se transfirieron las células a un tubo estéril, se centrifugaron a 400 g por 10 min y se removió el sobrenadante; el botón de células se resuspendió en 1 ml de SFB al 92% con 8% de dimetil sulfóxido (DMSO). Las células se transfirieron a un criotubo (NUNC), se congelaron a -72° C durante 24 h y después se mantuvieron en nitrógeno líquido (Harlow y Lane, 1988) (Apéndice A).

IV.3. Producción de líquido de ascitis en ratones inyectados con el hibridoma de F14B.

El líquido de ascitis es un fluido intraperitoneal de ratones que han desarrollado un tumor peritoneal. Para la producción de anticuerpos, el tumor es inducido por la inyección de células de hibridomas dentro del peritoneo, el cual sirve como una cámara para el crecimiento de células. Las células de los hibridomas crecen en altas cantidades y continúan secretando altos títulos de anticuerpos (Harlow y Lane 1988). Para la producción de ascitis, se utilizaron ratones de la cepa Balbc de 8 semanas, los cuales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 500 µl de pristane, 2, 6, 10, 14- Tetramethylpentadecane (Aldrich). Siete días después de la inyección de pristane, se inocularon 5 x 10⁸ células productoras de anticuerpos. A la semana

siguiente, se obtuvo el líquido por punción de la cavidad peritoneal, se dejó 1h a temperatura ambiente para que sedimentara el material celular, después se centrifugó a 1500 g por 30 min, se separó únicamente el sobrenadante y se guardó a -20°C para la eventual purificación de anticuerpos monoclonales.

IV.4. Purificación de los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es una metodología útil para la purificación de macromoléculas biológicas similares, para llevar a cabo separaciones que serían muy difíciles o imposibles por otros mecanismos. La base de la separación está relacionada con la función biológica de las moléculas (Day y Underwood, 1989).

IV.4.a. Purificación del anticuerpo monoclonal (AcMc) BIOGE de Isotipo IgG2a.

La proteína A es un componente muy abundante de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, se caracteriza por su alta afinidad por diferentes IgGs. La proteína A acoplada a una resina como la sefarosa, une inmunoglobulinas a valores fisiológicos de pH aunque varía de acuerdo a la especie y clase de estas (Ternynck y Avrameas, 1990).

El AcMc B106E se purificó a partir de 150 ml de sobrenadante del cultivo de hibridomas con una columna de 2 ml de agarosa-proteína A (GIBCO). Esta había sido equilibrada previamente con 50 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M, posteriormente el sobrenadante pasó a una velocidad de 0.5 ml/min, después se lavó con 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M para quitar proteínas unidas inespecíficamente hasta que la densidad óptica a 280 nm fuera menor a 0.05, se eluyó el AcMc con 10 ml de glicina 0.2 M pH 2.8 colectándose en tubos (eppendorf) que contenían 200 μl de amortiguador tris 1 M pH 8 para neutralizar el pH de la glicina, las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm para saber la concentración de los anticuerpos eluidos. La columna se lavó y se guardó a 4°C con el amortiguador de fosfatos 0.14 M que contenía 0.02% de azida de sodio. Los anticuerpos se guardaron a -20°C hasta su uso. La pureza del AcMc B106E se verificó por electroforesis en condiciones reductoras y tinción con azul de Comassie (Apéndice B).

IV.4.b. Purificación del AcMc F14B de isotipo IgM.

Los anticuerpos F14B se purificaron de 4 ml de líquido de ascitis y de 200 ml de sobrenadante de cultivo de hibridomas en una columna de 2 ml de agarosa anti-IgM de ratón (SIGMA). La resina se equilibró con 50 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.2 con NaCl 0.5 M (PB), se le agregó a la columna el líquido de ascitis dejándolo incubar toda la noche a 4°C y en agitación continua. En el caso del sobrenadante, se pasó por la columna en 3 h. Después se lavó la resina con 150 ml para quitar proteínas unidas inespecíficamente y se leyó en un espectrofotómetro a 280 nm hasta que la D.O fuera menor a 0.05. Se eluyó el AcMc con 10 ml de glicina 0.1 M NaCl 0.15 M colectándose en tubos eppendorf que contenían 200 µl de amortiguador tris 1 M pH 8.2; por último, la columna se lavó y se guardó a 4°C en PB que contenía 0.02% de azida de sodio. El AcMc se guardó a -20°C hasta su uso (Apéndice C).

IV.4.c. Purificación de inmunoglobulinas anti-*T. cruzi* de conejo.

Las IgGs policlonales (AcPc) anti-*T. cruzi* se purificaron de suero hiperinmune de conejo en una columna de 2 ml de agarosa proteína A (GIBCO), la cual se incubó con 2 ml de suero toda la noche a 4°C, se lavó la columna con 200 ml de amortiguador de fosfatos 0.14 M hasta que la densidad óptica a 280 nm fuera menor a 0.05. Las IgGs pegadas a la proteína A se eluyeron con glicina 0.1 M pH 2.8, se colectaron en tubos eppendorf que contenían 200 µl de amortiguador tris 1 M pH 8. A cada fracción se le midió la densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro para detectar el pico de elución de IgGs. La columna se lavó y se guardó a 4°C en el amortiguador de fosfatos que contenía 0.02% de azida de sodio. Las IgGs eluidas se guardaron a -20°C para su eventual acoplamiento a biotina (Apéndice B).

IV.5. Acoplamiento de biotina a los AcMc y AcPc.

La biotina es una proteína muy abundante, en la forma de un ester activo, es un hapteno que fácilmente se acopla a los grupos amino de las proteínas (Ternynck y Avrameas, 1990); las proteínas biotinizadas pueden ser detectadas cuando se utiliza estreptoavidina o avidina las cuales tienen afinidad por la biotina y se encuentran disponibles comercialmente (Harlow y Lane, 1988). Una parte de los anticuerpos purificados se marcaron con N-HS-L-Biotin Sulfosuccinimidyl 6-(biotinico) Hevonoate (Pierce) de acuerdo al procedimiento que

describieron Ternynck y Avrameas en 1990. Se ajustó la concentración de anticuerpos a 2mg/ml, se dializaron contra 1L de solución de bicarbonato de sodio 0.1 M, se realizaron 3 cambios, después se agregaron 10 µl de biotina 0.1 M disuelta en DMSO manteniendo la mezcla 1h a temperatura ambiente, por último se dializó la muestra contra 1L de PBS realizando 3 cambios, se guardó en alícuotas a - 20°C hasta su uso (Apéndice D).

IV.6. Actividad de los anticuerpos puros.

IV.6.a. ELISA.

La metodología empleada para este ensayo fue descrita por Ternynck y Avrameas en 1990 donde se utilizaron placas de 96 pozos EIA RIA 3590 (Costar), las cuales se sensibilizaron con 100 µl por pozo de una solución de extracto total de epimastigotes (cepa Que) diluido en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 a una concentración de 10 µg/ml durante 2h a 37°C. Después de la incubación en atmósfera húmeda, los pozos se lavaron con 200 µl de PBS-tween 0.05%, tres veces durante cinco minutos en cada lavado, después se bloquearon con una solución de gelatina al 0.5% en PBS por 1h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µl/pozo de los sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, se utilizó un suero de ratón en fase crónica de la enfermedad, como control positivo y un suero de ratón sano como control negativo, ambos diluidos 1:500. En el caso de las inmunoglobulinas de conejo, se utilizaron como controles un suero de conejo sano y el suero de conejo hiperinmune antes de purificar por la columna de afinidad ambos diluidos 1:1000, se dejó incubar toda la noche a 4°C después se les agregó 50 µl del conjugado anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (ZYMED) para el caso de los AcMc y para las inmunoglobulinas de conejo se utilizó el conjugado anti-IgG de conejo ambos diluidos 1:2000 en PBS-tween, se dejaron incubar durante 2h a 37° C. Por último se agregaron 100 µl/pozo de una solución de cromógeno que contenía 4 µl de H₂O₂, 4mg de ortofenil diamina (SIGMA), 10 ml de solución amortiguadora de citrato-fosfato pH 5 y se incubó a temperatura ambiente por 8 min, la reacción se detuvo agregando 50 µl/pozo de H₂SO₄ 2.5 N antes de que los testigos negativos empezaran a virar. La densidad óptica se leyó a 490 nm utilizando un lector de ELISA (Bio Rad).

IV.6.b. Western Blot.

Esta técnica permite identificar proteínas antigénicas reconocidas por anticuerpos (Malchiodi y cols., 1994).

IV.6.b.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se sometieron 150 µg de antígeno total de epimastigotes (cepa Que) a geles preparativos de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras, de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli (1970). Se utilizó un sistema discontinuo de dos geles; el primer gel por el que pasó la muestra (gel superior) concentró la muestra y el segundo (gel inferior) separó las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara para electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad) en presencia del amortiguador de electroforesis. Se aplicó una corriente de 200 volts durante 45 minutos a temperatura ambiente (Apéndice F).

IV.6.b.2. Electrotransferencia.

Después de la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro (Millipore), la transferencia se llevó a cabo con una corriente de 100 volts durante una hora (Apéndice G). Se cortaron tiras de nitrocelulosa de 0.3 mm las cuales se bloquearon con 1 ml de leche descremada (Sveltes, Nestle®) al 10% a 37°C por 2h, se lavaron tres veces con PBS-tween 0.1% durante 10 minutos cada uno de ellos, se incubaron con los AcMc y AcPc puros diluidos 1:100 en PBS-tween 0.1%, 2h a temperatura ambiente en agitación continua. El suero de ratón sano (control negativo) y el suero de ratón con infección crónica (control positivo) se utilizaron a una dilución de 1:500 mientras que los sueros de conejo preinmune e hiperinmune que se usaron como controles se utilizaron a una dilución 1:1000. Después de los lavados, las tiras se incubaron con los conjugados unidos a peroxidasa anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo correspondiente diluidos 1:2000 por 2 h a 37°C. Después de los lavados la reacción se reveló con el sustrato 3'3' diaminobencidina a una concentración de 0.5 mg/ml en PBS y 0.6 µl/ml de H₂O₂ al 30 %; se detuvo la reacción con agua destilada.

IV. 7. Infección a ratones Balbc con *T. cruzi*

Para detectar antígenos circulantes en el modelo murino, se realizaron dos experimentos. En el primero se utilizaron 16 ratones de la cepa Balbc los cuales se dividieron en 2 grupos con 8 ratones cada uno. Un grupo se utilizó para inocularlos, por vía intraperitoneal, con 1×10^5 parásitos de la cepa JJO (grupo experimental) mientras que los ratones del otro grupo fueron inoculados con 200 μ l de solución de PBS (grupo control). En el segundo experimento se utilizaron 5 ratones por cada grupo infectados de la misma manera que en el primer experimento.

Se registró la parasitemia a partir del tercer día de infección, determinando el día en que el número de parásitos fue mayor. Antes de infectar a los ratones, se sangraron de la cola y se colectó la sangre en un tubo eppendorf para obtener el suero control.

Cabe mencionar que para infectar a los ratones de ambos experimentos, se utilizaron los parásitos provenientes de ratones de la cepa CD-1, los cuales estaban infectados con *T. cruzi* de la cepa JJO.

IV.7.a. Curva de Parasitemia.

En el primer experimento, a partir del cuarto día de infección, los ratones se sangraron cada tercer día y hasta el día 39 en el que se sacrificaron. De la sangre obtenida, se tomaron 10 μ l, la cual se agregó a 490 μ l de solución de Alsever con el fin de observar la cantidad de parásitos en circulación de cada uno de los ratones. De la dilución 1:50 preparada con el anticoagulante Alsever, se tomó una muestra de 10 μ l y se colocó en una cámara de Neubauer. Se hizo el conteo de parásitos en un microscopio óptico MICROSTAR IV (Reichert Jung) con un aumento de 400X. El total de parásitos contados, este resultado se multiplicó por el factor de dilución, obteniendo el valor total de parásitos por ml de sangre (Harlow y Lane, 1988).

En el segundo experimento, se colectó la sangre de los ratones diariamente a partir del primer día de infección; al séptimo día postinfección se sangraron cada tercer día hasta el día 66 en que se decidió terminar el experimento porque los ratones se encontraban en la fase crónica de la infección.

IV.7.b. Obtención de suero de ratones infectados con *T. cruzi*.

Se obtuvo el suero de los ratones tanto del grupo control como del grupo experimental los mismos días en que se determinó la curva de parasitemia. A todos los ratones se les sangró de la cola y se hizo una mezcla de cada grupo. La sangre del grupo experimental y control se colectó en tubos ependorf. La sangre se centrifugó a 300 g durante 10 minutos y el suero se guardó a -20°C hasta su uso.

IV.8. Obtención de plasma de ratones con infección aguda.

En el laboratorio se ha establecido y mantenido la infección de *T. cruzi* en ratones hembras de la cepa CD-1, a los que se les inocula intraperitonealmente 5×10^5 parásitos. Para sangrar a los ratones se anestesiaron con éter (BAKER) y a partir del plexo axilar derecho se obtuvo la sangre con parásitos. Inmediatamente los ratones se sacrificaron por dislocación cerebral. Se realizó periódicamente este mismo procedimiento de acuerdo al comportamiento de las diferentes cepas de *T. cruzi* (Caballero, 1996). Para obtener el plasma de los ratones infectados, se colectó la sangre con heparina a 20 unidades/ml. Se centrifugó inmediatamente a 300 g durante 10 minutos. Se separó el plasma y se centrifugó nuevamente 500 g 15 minutos para eliminar los posibles tripomastigotes. Los plasmas se guardaron a -20°C hasta su uso.

IV.9. Estandarización del ELISA para la captura de antígeno.

Las placas para ELISA (Costar) se sensibilizaron con 100 μl de AcMc y/o AcPc a diferentes concentraciones y por duplicado en un amortiguador de carbonatos pH 9.6, se incubaron a 37°C durante 2h. Después de cada incubación, los pozos se lavaron tres veces con 200 μl de PBS tween al 0.05% durante 5 minutos en cada ocasión. Se bloquearon con 200 μl /pozo de gelatina al 0.5% en PBS a 37°C por 1h. Se colocaron 100 μl /pozo de extracto total de epimastigotes (cepa Que) a diferentes concentraciones de tal manera que reaccionaran con los AcMc y/o AcPc. Se incubaron la placas toda la noche a 4°C . Se colocaron 100 μl /pozo del AcMc y/o AcPc marcados con biotina a diferentes diluciones en PBS-tween 20 al 0.05% durante 2h a 37°C . Después se agregaron 100 μl de un conjugado estreptoavidina peroxidasa diluido 1:2000 en PBS-tween 0.05% por pozo y la placa se incubó 2 h a 37°C . Por último, se reveló la reacción con 4 μg del sustrato p-ortofenildiamina que fue disuelto en 10 ml del amortiguador

citrato-fosfato pH 5 y 4 µl de peróxido de hidrógeno. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2.5 N y se determinó la densidad óptica en un lector de ELISA (Bio-Rad) a 490 nm.

Una de las combinaciones que se utilizaron para estandarizar el ELISA de captura fue en la que se sensibilizaron las placas con diferentes concentraciones de inmunoglobulinas de conejo que son las que capturan al antígeno, después se agregaron diferentes concentraciones de extracto de epimastigotes, luego se agregó el AcMc B106E a diferentes concentraciones, se utilizó el conjugado anti-IgG de ratón diluido 1:2000. Se reveló la reacción con el mismo sustrato que se mencionó anteriormente. Otra combinación fue sensibilizar las placas con el AcMc utilizando las diferentes concentraciones que se usaron en los anteriores ensayos así como diferentes concentraciones de antígeno y de inmunoglobulinas de conejo. Una vez encontradas las concentraciones óptimas para capturar extracto total de epimastigotes se procedió a probar los plasmas y sueros de ratones infectados y de ratones no infectados a diferentes diluciones.

La figura 5 muestra el esquema general del ELISA para la detección de antígenos circulantes que se llevó a cabo para la estandarización y evaluación del ensayo con antígeno total y con sueros y plasmas de los ratones infectados.

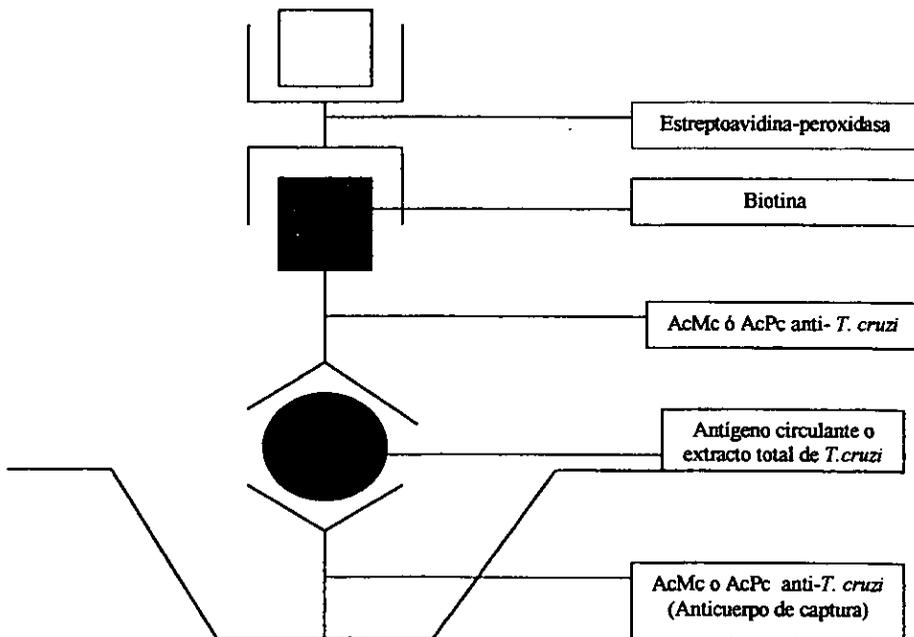


Figura 5. Esquema del ELISA para la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi*.

IV.10. Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante análisis de varianza con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y el grupo control.

V. RESULTADOS

V.1. Purificación de los anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra *T. cruzi*.

V.1.a. Purificación de B106E

La curva de purificación del AcMc B106E por cromatografía de afinidad con proteína A, se muestra en la figura 6: el anticuerpo fue eluido con glicina a pH ácido. Se recuperó en promedio una concentración total de 1.3 mg del anticuerpo por cada 150 ml de sobrenadante de cultivo de hibridomas aplicado a la columna. Se realizaron varias purificaciones del sobrenadante del cultivo celular con el fin de obtener la cantidad requerida para marcar una parte de ellos con biotina y otra para utilizarlos en los ensayos de captura en el ELISA. En todas las purificaciones se obtuvo una curva similar a la que se muestra en la figura 6.

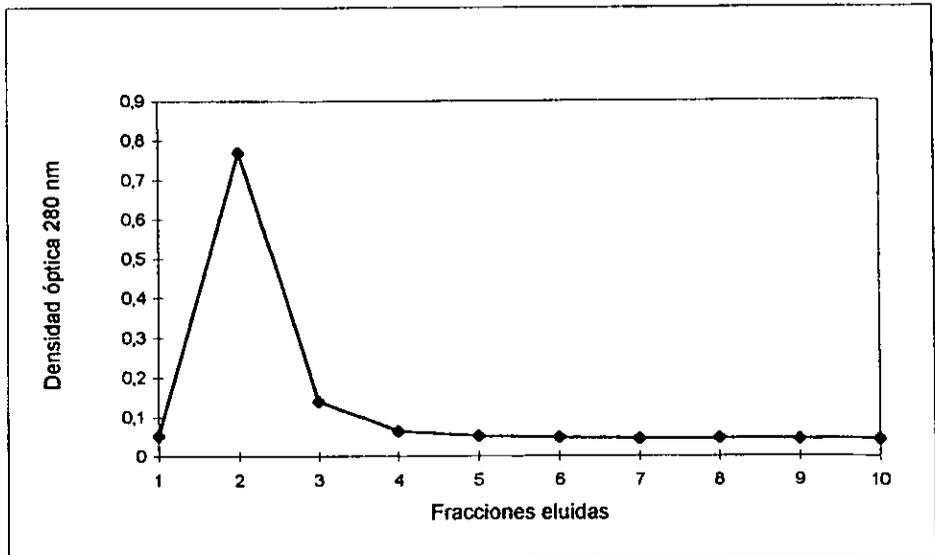


Figura 6. Purificación del AcMc B106E por columna de proteína A. El sobrenadante de cultivo de los hibridomas (150 ml) se aplicó a la columna de proteína A. La IgG se eluyó con glicina 0.2 M pH 2.8. El pico corresponde a la fracción 2 donde se obtuvo la mayor concentración del anticuerpo B106E.

V.1. b. Análisis del AcMc B106E.

Para determinar el grado de pureza de las inmunoglobulinas, las fracciones obtenidas de la columna (10 μ l) se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Al teñir el gel con azul de Coomassie se observaron las cadenas pesadas de 50 kDa y ligeras de 25 kDa que corresponden a las subunidades esperadas para inmunoglobulinas de isotipo IgG (figura 7, carriles C y D que corresponden a las fracciones 2 y 3 respectivamente de la figura 6). Para verificar que estas inmunoglobulinas puras seguían reconociendo a los antígenos del parásito después del proceso de purificación, se realizó un Western Blot donde se utilizaron 10 μ l de las fracciones obtenidas de la purificación. Se observó que el anticuerpo monoclonal B106E puro anti-*T. cruzi* mantuvo la misma actividad de reconocimiento a antígenos de epimastigotes (cepa Que) que presentaba antes de la purificación (figura 8 B). Como controles, se utilizaron dos sueros, uno de ratón infectado (figura 8 J) y otro de ratón no infectado (figura 8 K) diluidos 1:500. El antígeno reconocido por el AcMc B106E fue de un peso molecular superior a los 100 kDa.

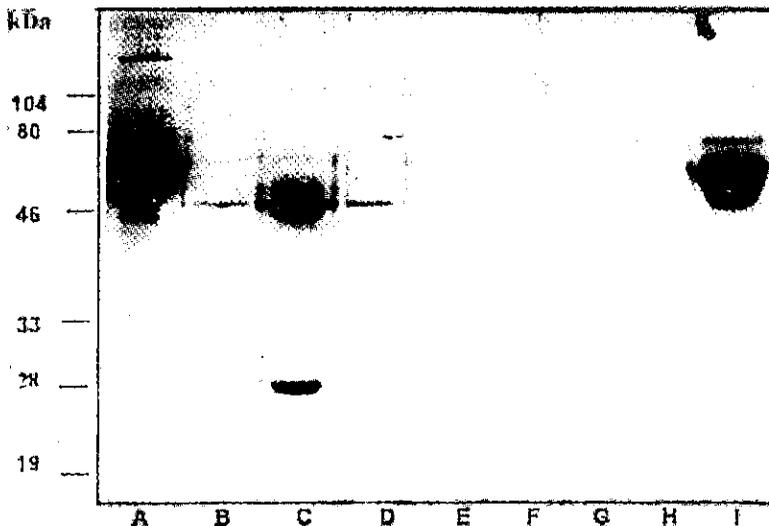


Figura 7: Análisis del AcMc B106E puro. Gel de acrilamida al 12% en condiciones reductoras. A, sobrenadante de cultivo de hibridomas antes de la purificación; B-H, fracciones obtenidas de la purificación; I, sobrenadante después de haber pasado por la columna de afinidad.

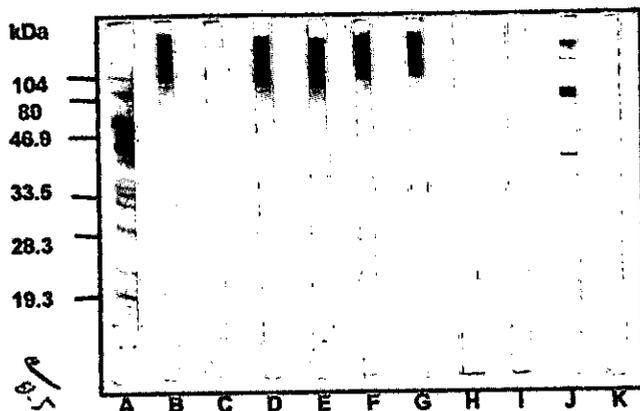


Figura 8. Análisis del reconocimiento antigénico del AcMc B106E puro por Western Blot. Extracto total de epimastigotes (cepa Que) se separó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras, posteriormente se transfirió a papel de nitrocelulosa y se incubó con: B, sobrenadante antes de purificar; C-H, fracciones de la 1 a la 6 eluidas de la columna; I, sobrenadante después de purificar; J, control positivo (suero de ratón en fase crónica de la enfermedad 1:500); K, control negativo (suero de ratón sano 1:500); A extracto total usado como antígeno, teñido con negro amido.

V.1.c. Purificación del AcMc F14B.

La curva de elución obtenida de la purificación del AcMc F14B por la columna de proteína anti-IgM de ratón, se muestra en la figura 9; se recuperaron en promedio 0.3 mg totales de anticuerpos por cada 200 ml de sobrenadante del cultivo de hibridomas y 0.4 mg de 2 ml de líquido de ascitis aplicado a la columna. La fracción con mayor concentración de anticuerpo fue la 2. En las fracciones 1, 3, 4 y 5 también se eluyó anticuerpo solo que en menor concentración. La figura 9 muestra solo la purificación a partir del líquido de ascitis. El rendimiento de la purificación de este anticuerpo resultó baja, posiblemente porque los hibridomas produjeron pocos anticuerpos y por lo tanto en el sobrenadante de los cultivos celulares los anticuerpos no estaban en alta concentración. Debido a que el anticuerpo de las fracciones obtenidas de las purificaciones estuvieron muy diluidas, se concentraron las fracciones 1, 2, 3, y 4 y se mezclaron para obtener una concentración de 2mg/ml.

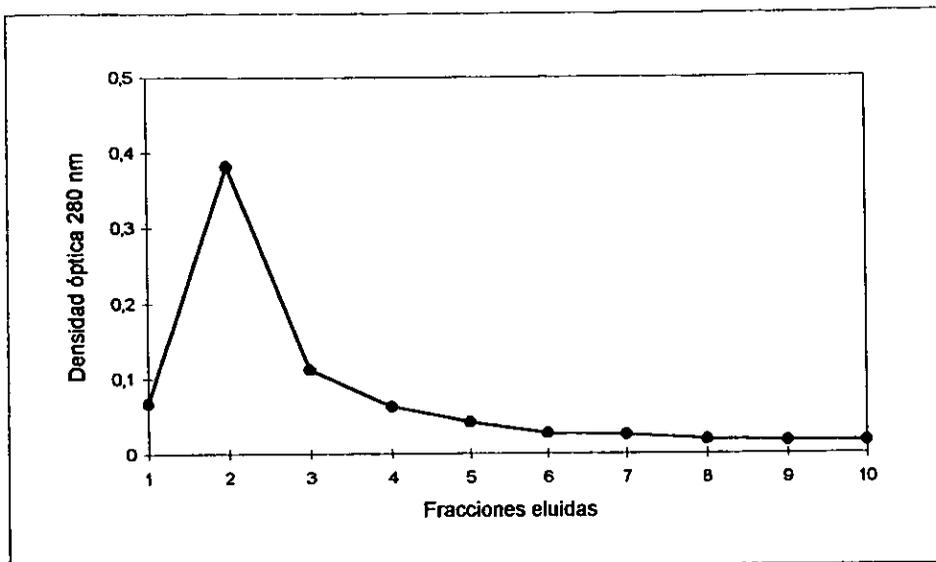


Figura 9. Purificación del AcMc F14B por columna de afinidad. 2 ml de líquido de ascitis se aplicaron a la columna, esta se lavó con PB pH 7.2 y el AcMc pegado a la columna se eluyó con glicina pH 2.4, se colectaron 10 fracciones que se muestran en la figura.

V.1.d Análisis del AcMc F14B puro.

Para determinar el grado de pureza de los anticuerpos IgM, se sometieron cada una de las fracciones colectadas antes de concentrar a geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras. En la figura 10, se observan las cadenas pesadas de 75 kDa y ligeras de 25 kDa que corresponden a las subunidades de inmunoglobulinas de isotipo IgM (carril C). Para verificar que estos seguían reconociendo a los antígenos del parásito después del proceso de purificación, se realizaron Western Blot donde se utilizaron 10 μ l de cada una de las fracciones obtenidas. Se observó que estos anticuerpos mantuvieron la misma actividad de reconocimiento a antígenos de epimastigotes (cepa Que) que presentaban antes de la purificación (figura 11 B). Como controles se utilizaron un suero de ratón en fase crónica de la enfermedad (figura 11 J) y uno de ratón sano (figura 11 K) diluidos 1:500. Los antígenos reconocidos por este AcMc se localizaron en el área de 35-40 kDa y en 70 kDa del extracto de epimastigotes.

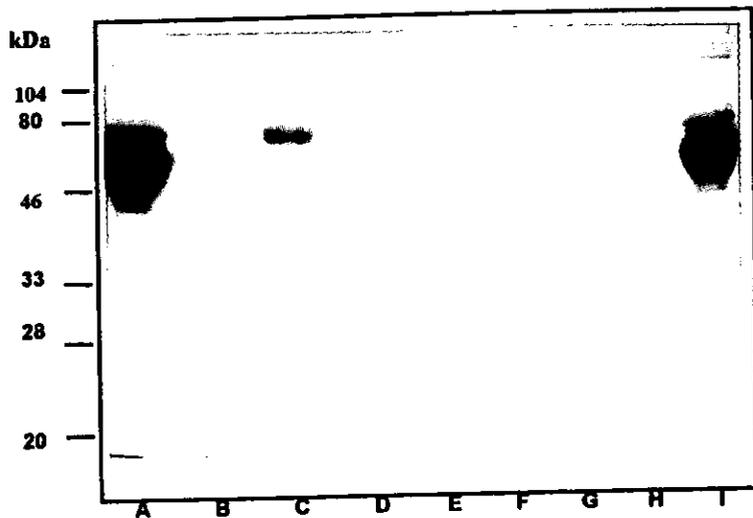


Figura 10. Análisis del AcMc F14B puro. Gel de acrilamida al 12% en condiciones reductoras. A, sobrenadante del cultivo de hibridomas antes de purificar; B-H, fracciones eluidas durante la purificación correspondientes a las fracciones 1-7 de la figura 9; I, sobrenadante después de purificar.

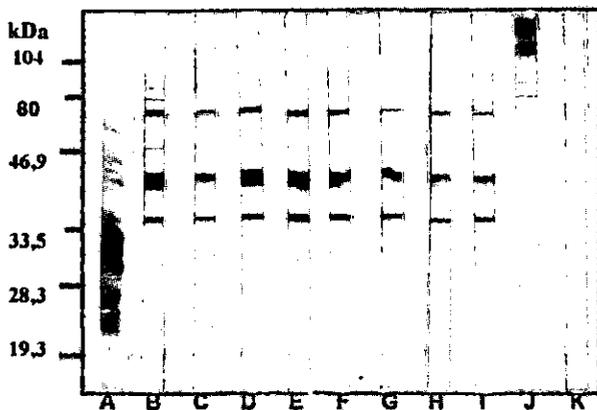


Figura 11. Análisis del reconocimiento antigénico del AcMc F14B puro por Western Blot. Extracto total de epimastigotes (cepa Que) se separó en geles de acrilamida al 12 % en condiciones reductoras, se transfirió a papel de nitrocelulosa, se cortó en tiras y se incubaron con: B, sobrenadante antes de purificar; C-I, fracciones obtenidas de la columna; J, control positivo (suero de ratón en fase crónica de la enfermedad); K, control negativo (suero de ratón sano), ambos diluidos 1:500; A extracto total usado como antígeno teñido con negro amido.

V.1.e. Purificación de anticuerpos policlonales de conejo.

La curva de purificación de las inmunoglobulinas anti-*T. cruzi* de conejo por la columna de proteína A, se muestra en la figura 12. De 2 ml de suero se purificaron aproximadamente 4 mg de IgGs de conejo.

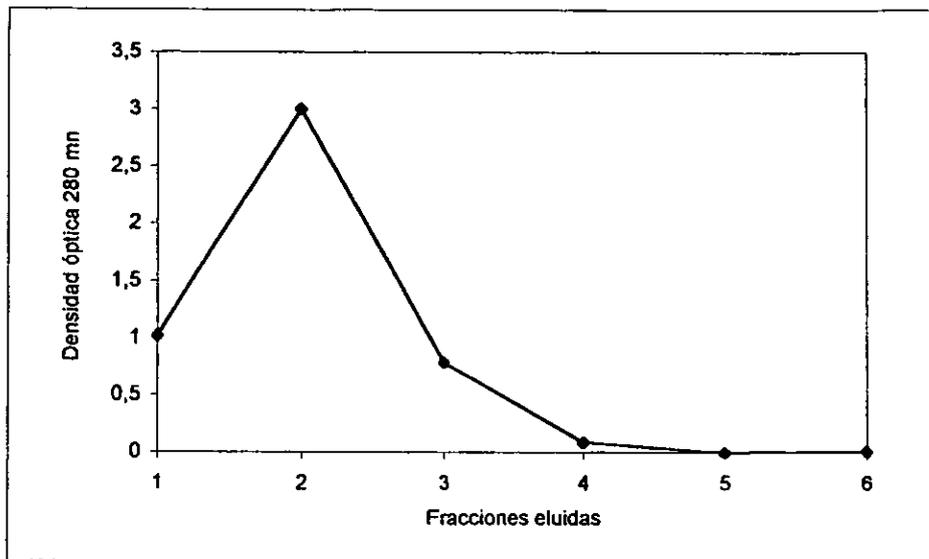


Figura 12. Purificación de IgGs de conejo por columna de proteína A. 2ml de suero de conejo hiperinmune se aplicó a la columna de proteína A. las IgGs se eluyeron con glicina 0.2 M pH 2.8. La mayor concentración de anticuerpo se obtuvo en la fracción 2 y en menor concentración en las fracciones 1 y 3.

V.1.f. Análisis de los anticuerpos policlonales de conejo.

Para determinar la pureza de las inmunoglobulinas de conejo, las fracciones obtenidas se sometieron a geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Se observan las cadenas pesadas y ligeras que componen a las inmunoglobulinas IgG (figura 13 C) que coinciden con la densidad óptica más alta obtenida en la curva de la figura 12 (fracción 2). Para verificar que las inmunoglobulinas puras seguían reconociendo a los antígenos del parásito después del proceso de purificación, se realizó un Western Blot. Se observó que los anticuerpos puros mantuvieron el mismo patrón de reconocimiento a los antígenos que presentaban antes de la purificación (figura 14 B, C y D). Los antígenos reconocidos por estas inmunoglobulinas reconocieron proteínas de diferentes pesos moleculares desde > 104 kDa hasta antígenos de ~ 19 kDa.

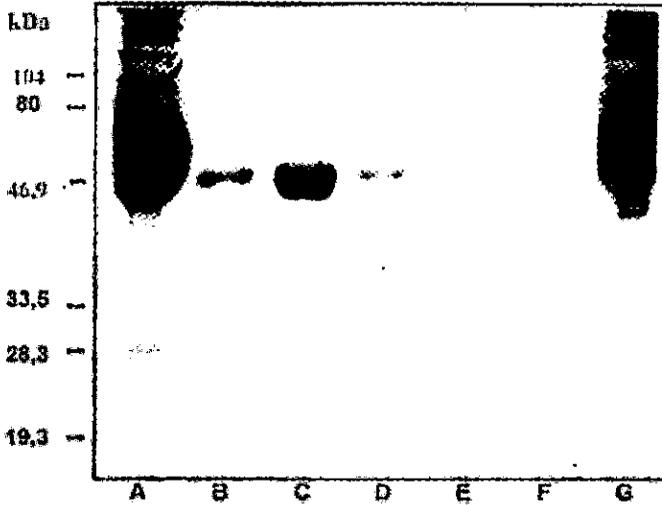


Figura 13. Análisis de IgGs de conejo puras. Gel de acrilamida al 12 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. A, suero de conejo hiperinmune antes de purificar; B-F, las fracciones obtenidas de la purificación; G, suero de conejo después de haber pasado por la columna de afinidad.

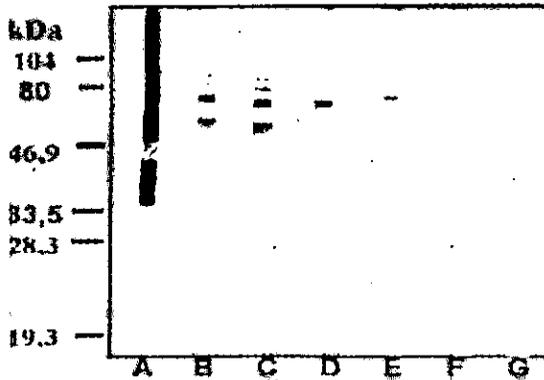


Figura 14. Análisis del reconocimiento antigénico de IgGs de conejo puras por Western blot. Extracto total de epimastigotes (cepa Que) se separó en geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras, se transfirió a papel de nitrocelulosa, y se incubaron con: A, suero de conejo hiperinmune anti-*T. cruzi* diluido 1:1000 antes de purificar; B-F, fracciones obtenidas de la purificación; G suero después de haber pasado por columna de afinidad diluido 1:1000.

V.2. Estandarización del ELISA de captura de antígenos.

Para la estandarización del ELISA, modalidad doble captura, se utilizaron diferentes concentraciones tanto del anticuerpo de captura como de los diferentes anticuerpos marcados con biotina para detectar 1 o 2 μg de antígeno total de epimastigotes de la cepa Querétaro (que corresponden a las figuras negras de las gráficas), las densidades ópticas obtenidas en estas condiciones, se compararon con las de los pozos donde no se agregó antígeno (figuras blancas). Las diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales y policlonales utilizados en el ELISA se describen en los siguientes apartados.

V.2.a. Combinación con el AcPc de conejo (anticuerpo de captura) y el AcPc de conejo biotinilado (anticuerpo de revelado).

Una de las combinaciones del ELISA de captura de antígenos fue aquella en donde se utilizaron a diferentes concentraciones las IgGs de conejo (AcPc) como anticuerpos de captura y diferentes diluciones de IgGs anti-*T. cruzi* de conejo biotiniladas (AcPc biot) con la finalidad de encontrar la concentración óptima de anticuerpos para detectar 2 μg de antígeno total (figura 15). Se observaron diferencias entre la densidad óptica con 2 μg de antígeno y la obtenida en los pozos donde no se agregó antígeno tanto en las diferentes concentraciones de anticuerpo de captura como de las diluciones del anticuerpo de revelado, encontrándose la mayor diferencia (1.96 veces) cuando se utilizaron las IgGs a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ y del anticuerpo biotinilado a una dilución 1:20.

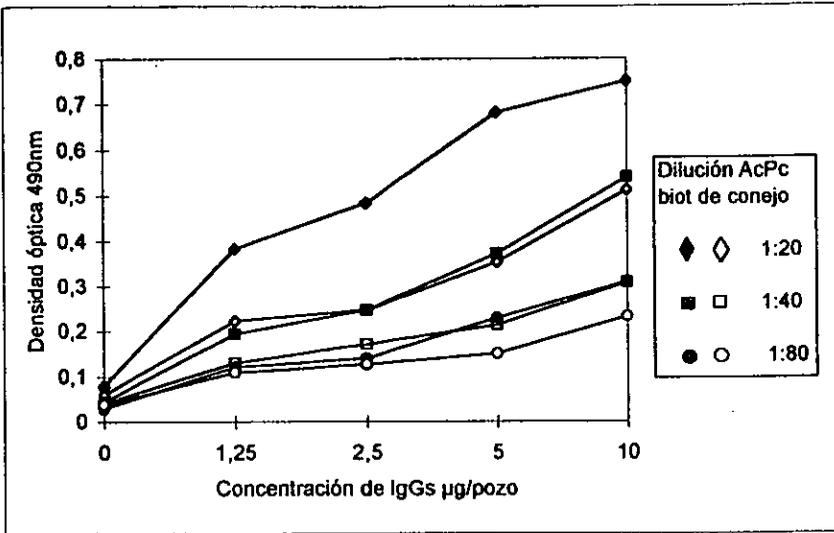


Figura 15. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total de *T. cruzi* (AcPc-AcPc biotinilado). Se utilizaron diferentes concentraciones del AcPc de conejo de captura –eje de abscisas- y diluciones del AcPc biotinilado de conejo como revelado –recuadro derecho- para detectar 2 µg de antígeno total (figuras negras) y sin antígeno (figuras blancas).

V.2.b. Combinación con IgGs de conejo (anticuerpo de captura) y B106E (anticuerpo de revelado).

En este ELISA se agregaron diferentes concentraciones de IgGs de conejo como anticuerpos de captura y del AcMc B106E como anticuerpos de revelado para detectar 2 µg de antígeno total de *T. cruzi*. Con esta combinación, se observó la mayor diferencia (1.7 veces) con 5 µg de AcPc de conejo y 2.5 µg de B106E. Esta diferencia también se observó con las otras combinaciones de anticuerpos (figura 16). En esta combinación del ELISA, las densidades ópticas obtenidas fueron muy bajas, menores a 0.3, a pesar haber dejado por mas de 20 minutos la reacción.

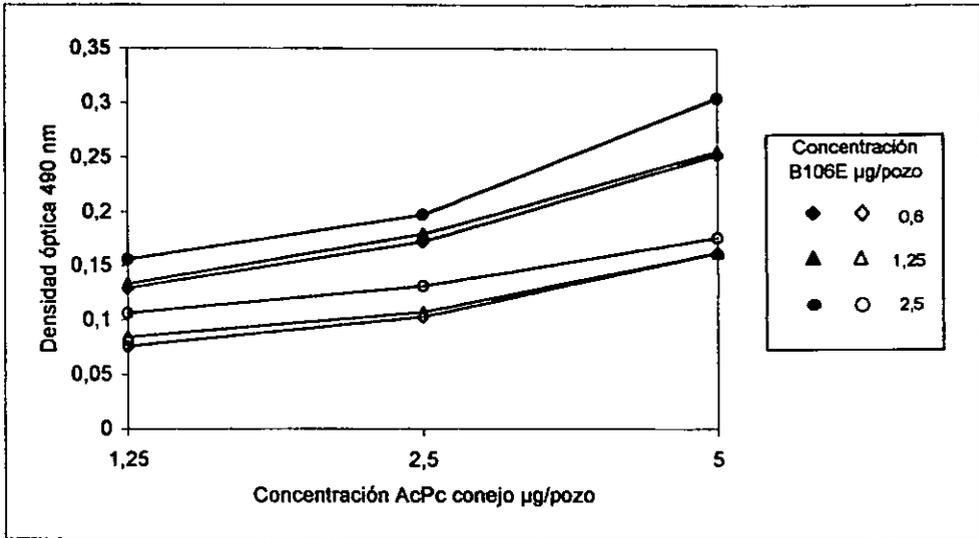


Figura 16. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total (AcPc conejo- AcMc B106E). Se utilizaron diferentes concentraciones de AcPc de conejo como anticuerpo de captura -eje de abscisas- y de anticuerpo B106E como revelado -recuadro derecho- para detectar 2 µg de antígeno total de *T. cruzi* -figuras negras- y sin antígeno -figuras blancas-. La gráfica representa el promedio de 2 experimentos independientes.

V.2.c. Combinación con F14B (anticuerpo de captura) y FI4B biotinilado (anticuerpo de revelado).

En este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones del anticuerpo de captura (FI4B) y este mismo marcado con biotina como anticuerpo de revelado a diferentes diluciones para detectar 2 µg de antígeno. Las densidades ópticas obtenidas se compararon con los valores donde no se agregó antígeno. Se observó que la mejor diferencia fue de 1.47 veces con 1 µg del AcMc F14B como anticuerpo de captura y el AcMc F14B biotinilado a una dilución 1:50 (figura 17).

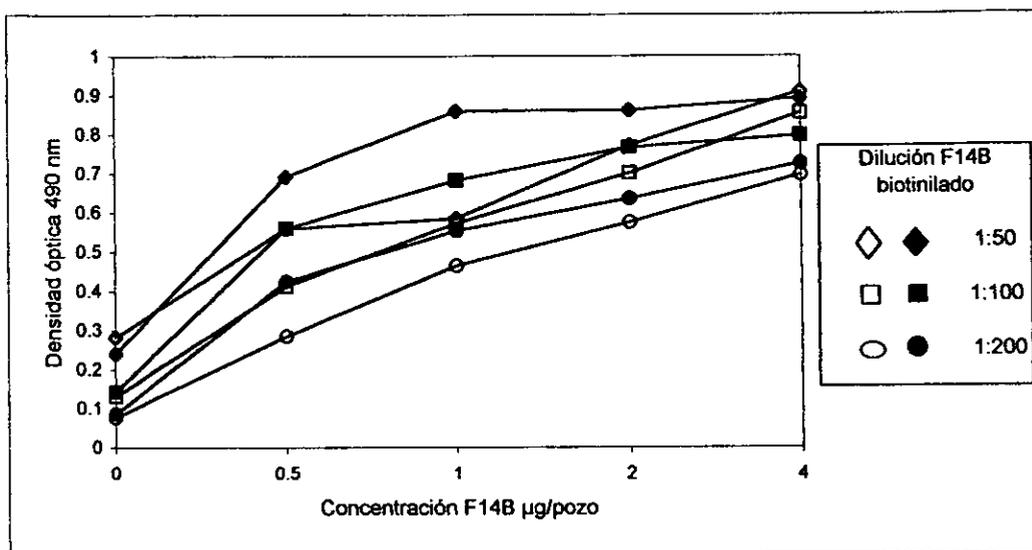


Figura 17. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total (AcMc F14B- AcMc F14B biotinilado). Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo F14B de captura -eje de abscisas- y de anticuerpo FI4B biotinilado como revelado -recuadro derecho- para detectar 2 µg de antígeno total de *T. cruzi* -figuras negras- y sin antígeno -figuras blancas-. La gráfica representa el promedio de 2 experimentos independientes.

V.2.d. Combinación con FI4B (anticuerpo de captura) y B106E biotinilado (anticuerpo de revelado).

Se utilizaron diferentes concentraciones del AcMc FI4B y diferentes diluciones del anticuerpo de revelado (B106E biot) para detectar 2 µg de antígeno total. En la figura 18 se observa que los valores en la densidad óptica van aumentando de acuerdo a la concentración de anticuerpo de captura y de la dilución del anticuerpo de revelado. Se observó la mejor diferencia, de 1.6 veces, con 2 µg de anticuerpo de captura y la dilución 1:2000 de B106E.

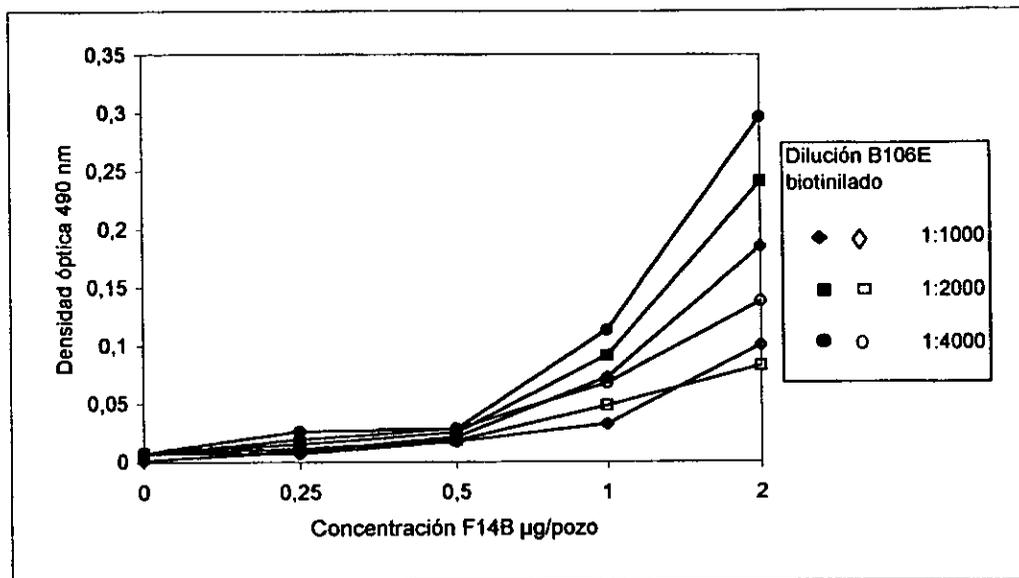


Figura 18. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total de *T. cruzi* (AcMc F14B-B106E biotinilado) Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo F14B de captura –eje de abscisa- y diluciones del anticuerpo de revelado B106E biotinilado –recuadro derecho- para detectar 2 µg de antígeno (figuras negras) y sin antígeno (figuras blancas).

V.2.e. Combinación con B106E (anticuerpo de captura) y AcPc de conejo (anticuerpo de revelado).

Se realizaron 2 experimentos independientes de ELISA, modalidad doble captura, para la detección de 1 µg de antígeno total de *T. cruzi*. Para escoger la concentración óptima de B106E unido a la placa y de AcPc de conejo, sin biotinar, se probaron diferentes concentraciones de ambos anticuerpos. Se observó la mayor diferencia de 1.96 veces, con 0.6 µg de B106E y 1.25 µg de AcPc de conejo (figura 19). Una diferencia similar de 1.8 se obtuvo con 1.25 µg de B106E y 1.25 µg del AcPc. Con las otras combinaciones de concentraciones de anticuerpos, las diferencias fueron menores.

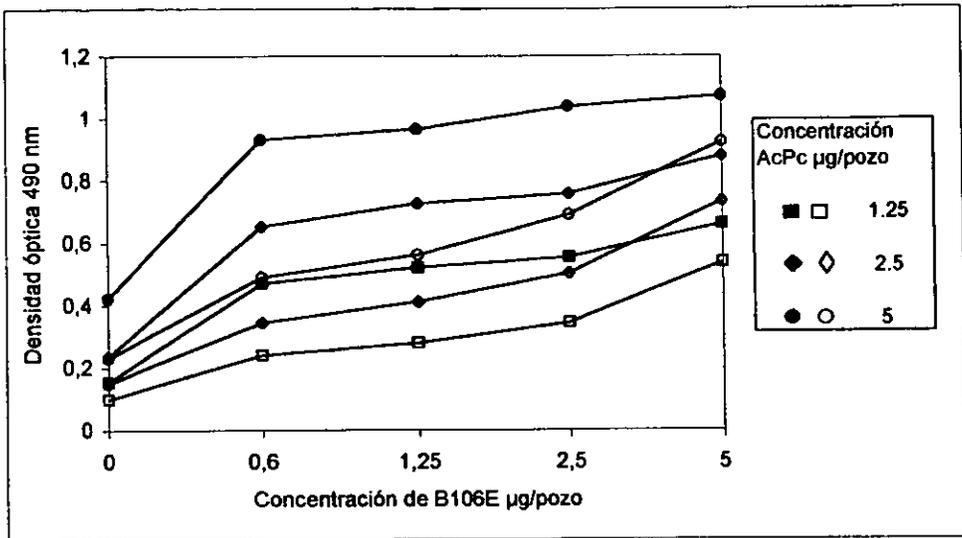


Figura 19. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total (AcMc B106E – AcPc de conejo). Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo B106E de captura (eje de abscisas) y de IgGs de conejo como anticuerpo de revelado (recuadro derecho) para detectar 1µg de antígeno -figuras negras- y sin antígeno (figuras blancas). La reacción se reveló con un anticuerpo anti-IgG de conejo unido a peroxidasa. Experimento representativo.

V.2.f. Combinación con B106E (anticuerpo de captura) y FI4B biotinilado (anticuerpo de revelado).

En esta combinación del ELISA se utilizó el anticuerpo de captura B106E a diferentes concentraciones, así como las diluciones del anticuerpo de revelado F14B biotinilado para detectar 2 µg de antígeno. En la figura 20 se observa un aumento en la densidad óptica a medida que aumenta la concentración de anticuerpo de captura y de las diferentes diluciones del anticuerpo de revelado. Se observó una mayor diferencia (1.6 veces) en los valores de densidad óptica con 1 µg de anticuerpo de captura y una dilución 1:100 del anticuerpo de revelado aunque los valores de la densidad óptica fueron menores a 0.3.

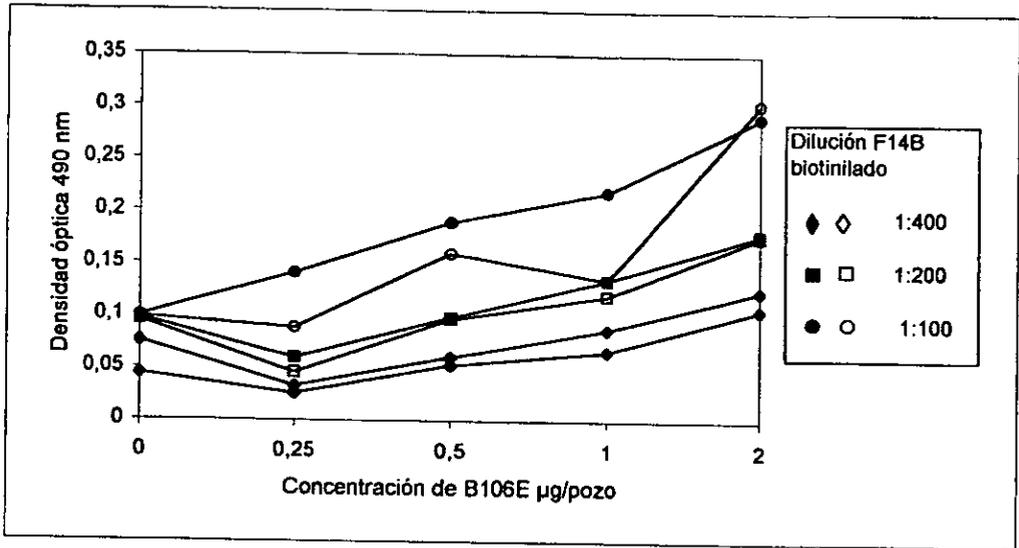


Figura 20 ELISA de doble captura para la detección de antígeno total (AcMc B106E – AcMc F14B biotinilado) Se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo de captura B106E (abscisas) y de diluciones del anticuerpo de revelado, F14B biotinilado (recuadro derecho) para detectar 2 µg de antígeno total –figuras negras – y sin antígeno –figuras blancas–.

V.2.g. Combinación con B106E (anticuerpo de captura) y B106E biotinilado (anticuerpo de revelado).

Para conocer la concentración óptima de anticuerpo monoclonal de captura y del anticuerpo marcado con biotina en ELISA, se variaron las concentraciones de anticuerpo de captura y las diluciones del anticuerpo de revelado para detectar 1µg de antígeno. La figura 21 muestra que la mejor concentración de anticuerpo de captura está entre 0.62 µg y 1.25 µg y con la dilución 1:2000 del anticuerpo de revelado (14.6 veces), aunque con las otras combinaciones también se observó una clara diferencia en la detección de 1µg de antígeno debido a que en los pozos donde no se agregó antígeno, las densidades ópticas, permanecieron prácticamente en cero.

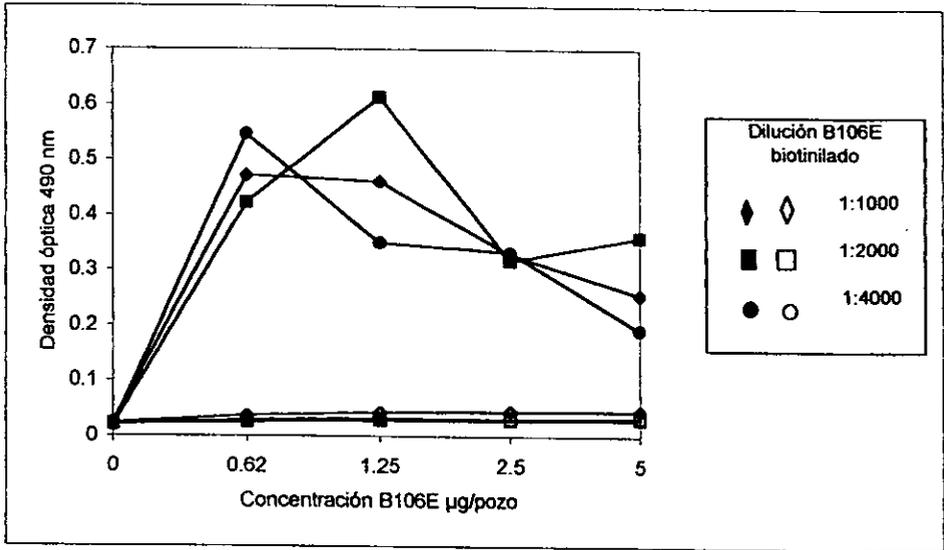


Figura 21. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total (AcMc B106E-B106E biotinilado). La estandarización del ELISA consistió en utilizar diferentes concentraciones de anticuerpo de captura B106E -abscisas- y de anticuerpo de revelado, B106E biotinilado (recuadro derecho) para detectar 1 µg de antígeno -figuras negras- y sin antígeno -figuras blancas-.

V.2.h. Combinación con la mezcla de F14B y B106E (anticuerpos de captura) y F14B y B106E biotinilados (anticuerpos de revelado).

Para la estandarización del ELISA, se utilizó una concentración de 5 µg/ml de una mezcla de anticuerpos con una proporción de 2.5 µg por cada anticuerpo (F14B y B106E). Se mantuvo constante la concentración de anticuerpos de captura. Se variaron las concentraciones de antígeno total y las diluciones de la mezcla de anticuerpos biotinilados. Se observó que los valores de densidad óptica van aumentando de acuerdo a la dilución de la mezcla de anticuerpos y de la concentración de antígeno total (figura 22).

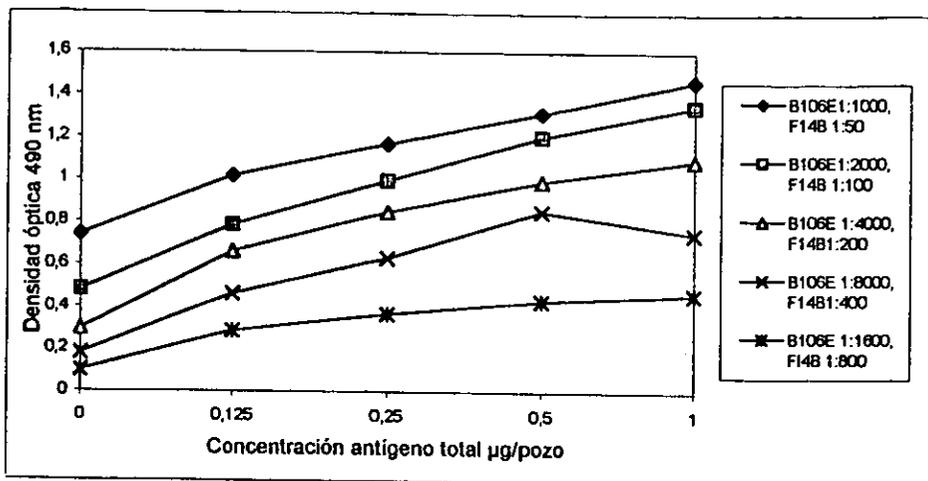


Figura 22. ELISA de doble captura para la detección de antígeno total de *T. cruzi* (mezcla de B106E y F14B). En el ELISA se utilizó una concentración de 5 µg/ml de la mezcla de anticuerpos de captura, se variaron las concentraciones de antígeno total (abscisas) y las diluciones de los anticuerpos de revelado (recuadro derecho).

La tabla 5 muestra un resumen de las combinaciones de anticuerpos utilizadas para la estandarización del ELISA, la cual proporciona información de las concentraciones óptimas de los anticuerpos de captura y de revelado para detectar 1 o 2 µg de antígeno total de *T. cruzi*.

Tabla 5. Estandarización del ELISA de doble captura para detectar antígeno de *T. cruzi*.

Anticuerpo de captura	Anticuerpo de revelado	Concentración de antígeno	Diferencia*
2.5 µg AcPc	1:20 AcPc biot	2	1.96
5 µg AcPc	2.5 µg AcMc B106E	2	1.7
1 µg AcMc F14B	1:50 AcMc F14B biot	2	1.47
1 µg AcMc F14B	1:1000 AcMc B106E	2	1.6
0.6 µg B106E	1.25 µg AcPc	1	1.96
1.25 µg AcMc B106E	1:2000 AcMc B106E biot	1	14.6
1 µg AcMc B106E	1:100 AcMc F14B biot	2	1.6
5 µg/ml mezcla B106E y F14B	1:100 F14B1:2000 B106E	1	3

* número de veces que la densidad óptica aumentó cuando se utilizó antígeno comparado con los pozos que no tenían antígeno.

V. 3. Sensibilidad del ELISA con algunas combinaciones de anticuerpos.

Para conocer la sensibilidad del ensayo de captura, se variaron las concentraciones del antígeno total (2, 1, 0.5, 0.25 y 0 $\mu\text{g}/\text{pozo}$) y del AcPc de conejo (5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 y 0 $\mu\text{g}/\text{pozo}$), como anticuerpo de revelado. Se mantuvo constante la concentración del AcMc B106E como anticuerpo de captura a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{pozo}$. En la figura 23 se observa que tanto en presencia como en ausencia de antígeno va aumentando la lectura de la densidad óptica respecto a la concentración del AcPc de conejo, lo que indica un reconocimiento del AcPc de conejo por el AcMc B106E. Debido a que la diferencia observada con diferentes concentraciones de antígeno fue pequeña, se decidió no utilizar esta combinación.

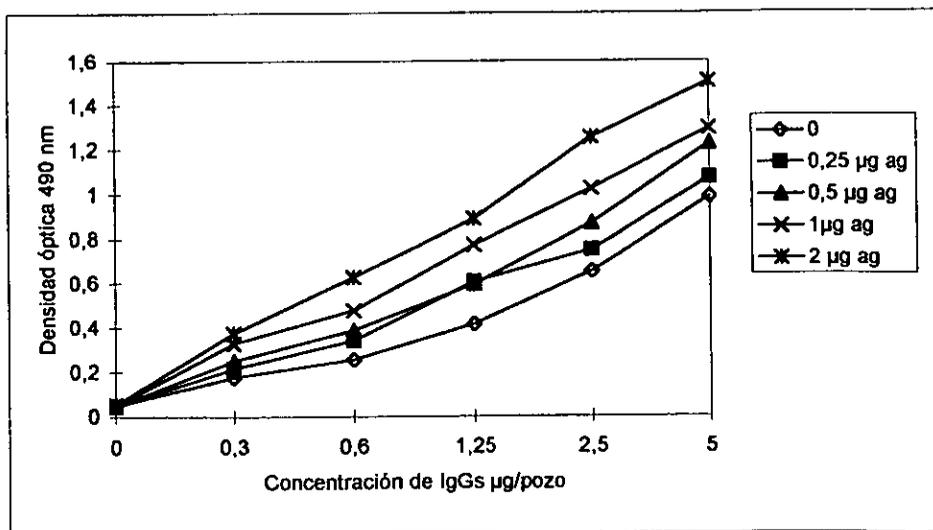


Figura 23. Sensibilidad del ELISA doble captura con B106E y AcPc de conejo. Se utilizó una concentración de $10\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo de captura (B106E) y diferentes concentraciones del anticuerpo de revelado (AcPc de conejo) –eje de abscisas-. Para conocer la sensibilidad del ensayo se agregaron diferentes concentraciones de antígeno total de epimastigotes –recuadro derecho- .

Una de las mejores combinaciones de anticuerpos para la detección de 1 µg de antígeno fue la que utilizó el AcMc B106E y este mismo marcado con biotina por lo que se procedió a conocer la sensibilidad del ensayo y para ello se variaron las concentraciones del antígeno. La figura 24 muestra la sensibilidad del ensayo, donde se utilizaron diferentes concentraciones de anticuerpo de captura y se mantuvo constante la dilución 1:2000 del anticuerpo de revelado. Se observó que a medida que aumenta la concentración de antígeno aumenta la densidad óptica por lo que en este ELISA se detectó hasta 0.5 µg de antígeno total.

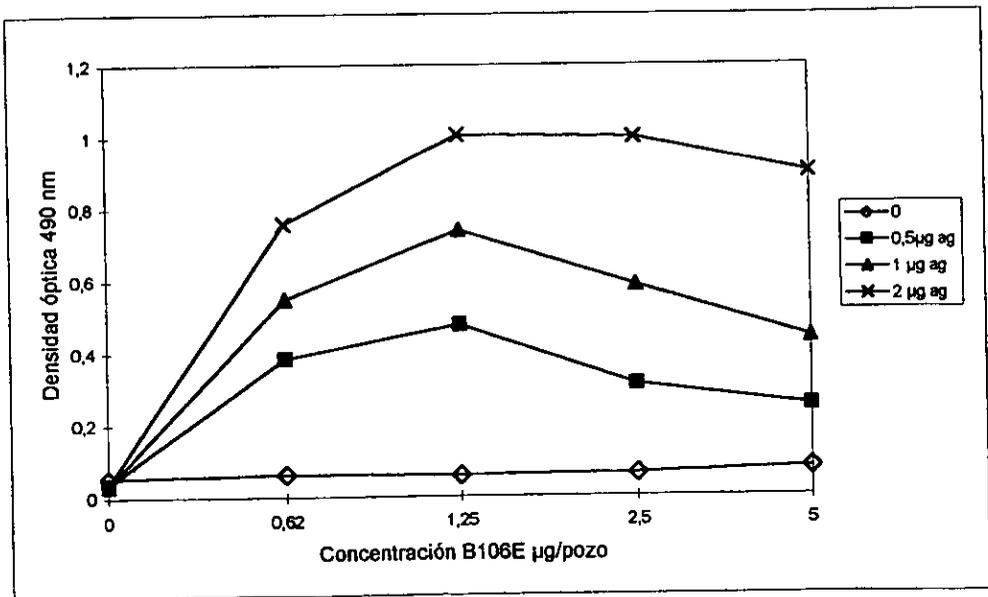


Figura 24. Sensibilidad del ELISA de captura para la detección de antígenos con AcMc B106E y este mismo marcado con biotina. Para conocer la sensibilidad del ELISA, se utilizaron diferentes concentraciones de extracto total y del anticuerpo de captura. Se mantuvo constante la dilución 1:2000 del anticuerpo de revelado (B106E biot).

V.4. Especificidad del ELISA con el anticuerpo monoclonal B106E.

La especificidad del ensayo de captura de antígenos, con B106E a 1µg/pozo como anticuerpo de captura y este mismo marcado con biotina diluido 1:2000 como anticuerpo de revelado, se evaluó utilizando diferentes concentraciones de extractos de otros microorganismos. La figura 25 muestra la especificidad del ensayo, se observó que el ELISA fue negativo, al utilizar diferentes concentraciones de extractos de otros parásitos, incluso el de *Leishmania* sp que pertenece a la misma familia que *T. cruzi*. Además, en este ensayo se pudo detectar hasta 0.125 µg de antígeno de *T. cruzi*

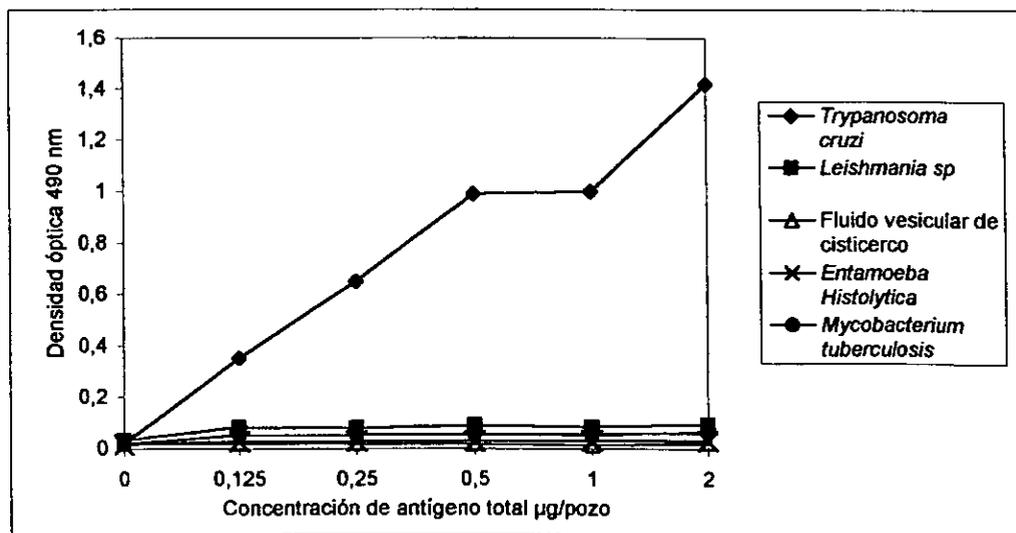


Figura 25. Especificidad del ELISA de captura de antígenos de por el AcMc B106E. Se utilizaron diferentes concentraciones de extracto total de ♦ *T. cruzi* ■ *Leishmania* sp. ✕ *Entamoeba histolytica*, • *Mycobacterium tuberculosis* y Δ fluido vesicular de cisticerco de *Taenia crassiceps*.

V. 5. Detección de antígenos en el suero de ratones infectados con *T. cruzi*.

Con el ELISA de doble captura estandarizado utilizando la combinación B106E a una concentración de 1µg/pozo de anticuerpo de captura y de B106E biotinilado diluido 1:2000 como anticuerpo de revelado, se procedió a la detección de antígenos circulantes en suero de ratones infectados. Para obtener el suero se realizaron dos experimentos, en el primero se infectaron 8 ratones y en el segundo experimento 5 ratones, con 1×10^5 parásitos de la cepa mexicana JJO.

En el primer experimento se colectó la sangre de los ratones cada tercer día. Se contó cada vez en el microscopio la cantidad de tripomastigotes circulantes/ml en cada ratón, la sangre de los ratones de cada grupo se mezcló y se obtuvo el suero. El ELISA para la detección de antígenos en el suero de los ratones infectados consistió en agregar 1µg/pozo de anticuerpo de captura (AcMc B106E) y una dilución 1:2000 del anticuerpo de revelado (AcMc B106E biotinilado). Las gráficas de la figura 26 muestran los resultados obtenidos de este experimento donde se observa que las diluciones del suero de ratón 1:25 y 1:50 fueron en las que se pudieron detectar los antígenos a partir del día 14, día en que empezó a aumentar la carga parasitaria (figura 26, A y B) mientras que con la dilución 1:100, las diferencias con respecto al grupo control variaron a partir del día 21 de infección y hasta el día 30 (figura 26 C). En el segundo experimento, la parasitemia se siguió hasta la fase crónica de la enfermedad, en las gráficas de la figura 27 se observa que se detectaron antígenos en el suero de los ratones en dos diluciones (1:50 y 1:100) a partir del día 17 y hasta el día 24 de la infección, lo que corresponde a la máxima parasitemia observada en la sangre de los ratones por microscopía, el ensayo no detecta antígenos en circulación los días 26, 28 y 31, mientras que en los días 33, 35, 38, 40, 52 y 66 también se detectaron antígenos circulantes ya que se observó una diferencia mayor entre los dos grupos de ratones con respecto a la diferencia encontrada en los días 17, 19, 21 y 24 con las diluciones 1:50 y 1:100, lo que indicaría que el antígeno reconocido por el AcMc B106E, está siendo secretado en mayor concentración en la fase crónica de la enfermedad en el modelo murino

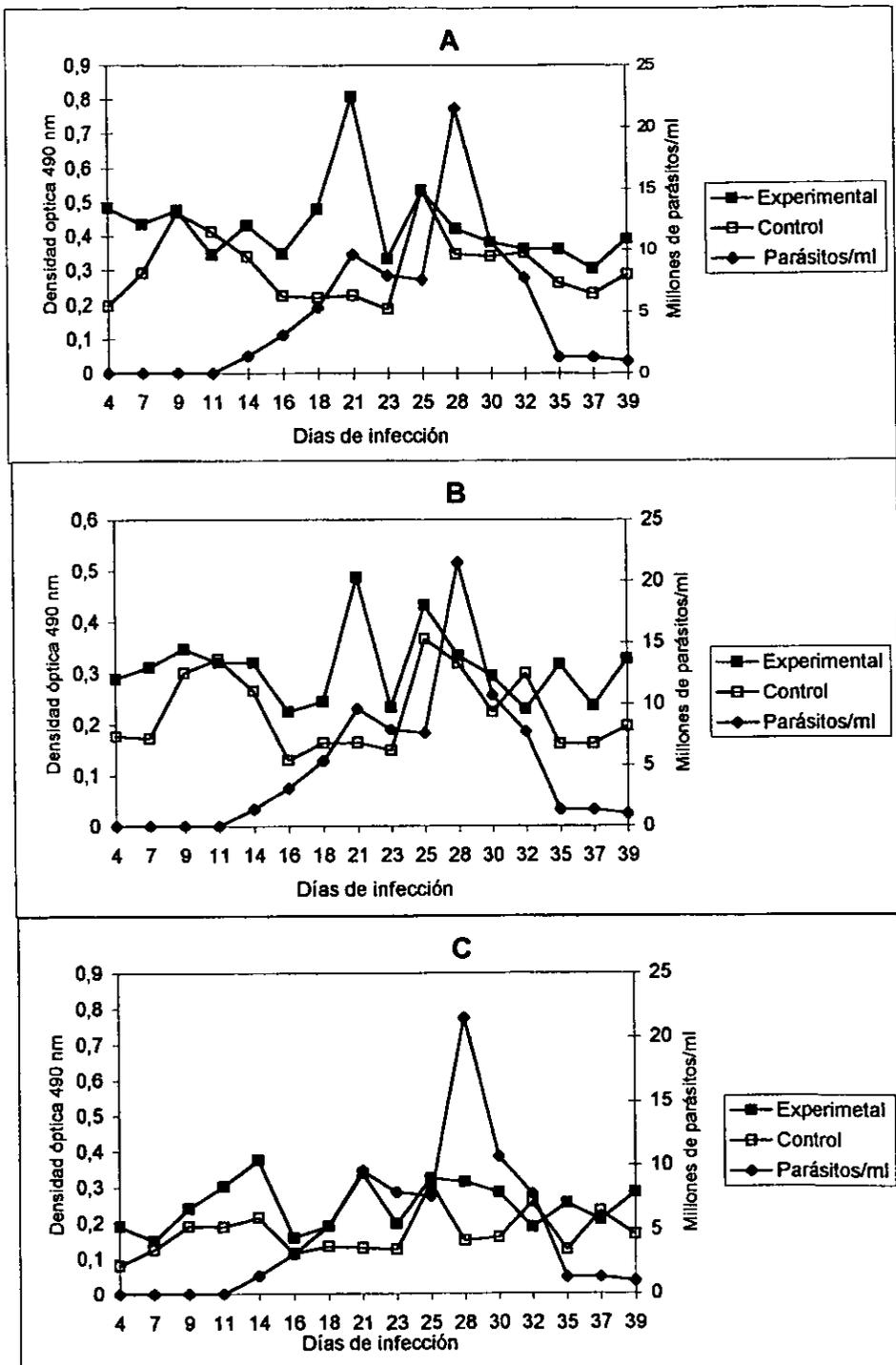


Figura 27. Detección de antígenos en el suero de ratones infectados con la cepa JJO por el AcMc B106E. Primer experimento. Las gráficas muestran los valores de densidad óptica del grupo experimental ■ y el de ratones controles □. Además se graficó la curva de parasitemia en los mismos ratones infectados ♦. En la gráfica A los sueros de los ratones se utilizaron a una dilución 1:25. En la gráfica B 1:50. En la gráfica C, 1:100.

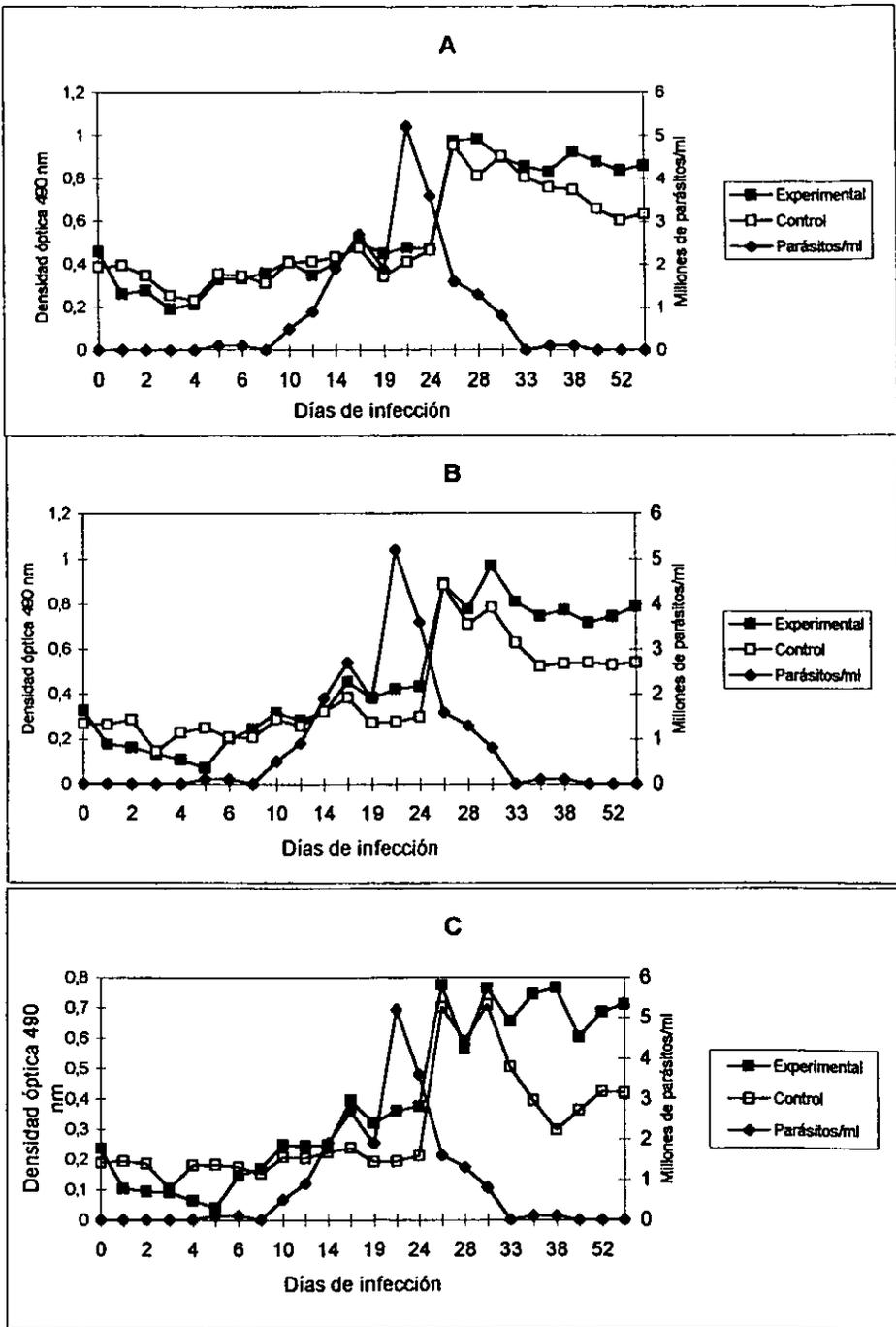


Figura 27. Detección de antígenos en el suero de ratones infectados con la cepa JJO por el AcMc B106E. Segundo experimento. La gráfica muestra los valores de densidad óptica del grupo experimental ■ y el grupo control □. Además se graficó la curva de parasitemia en los mismos ratones infectados ◆. En la gráfica A los sueros fueron diluidos 1:25. En la B 1:50. En C 1:100.

Con el fin de saber si los antígenos detectados por B106E en el ensayo de captura de antígenos dependía de la cepa y la cantidad de tripomastigotes circulantes en el hospedero, se decidió repetir el ensayo anterior con sueros de ratones infectados con la cepa Ninoa, que a diferencia de JJO, tiene bajos niveles de parasitemia y no es virulenta. Igual que en los experimentos mostrados en las figuras 26 y 27 se colectó la sangre y se obtuvo el suero de ratones a los diferentes días de infección, se evaluaron en el ELISA de captura y se compararon con los sueros obtenidos de los ratones infectados con la cepa JJO los cuales se utilizaron a una dilución 1:100. La gráfica A de la figura 28 muestra los sueros de los ratones infectados con la cepa Ninoa, donde no se observó diferencia entre el grupo de sueros de ratones infectados y el grupo de sueros controles. La gráfica B de la figura 28, muestra los sueros de los ratones infectados con la cepa JJO donde se observó diferencia respecto a los sueros de los ratones sanos a partir del día 10 de infección manteniéndose esta diferencia hasta el día en que se sacrificaron a los ratones.

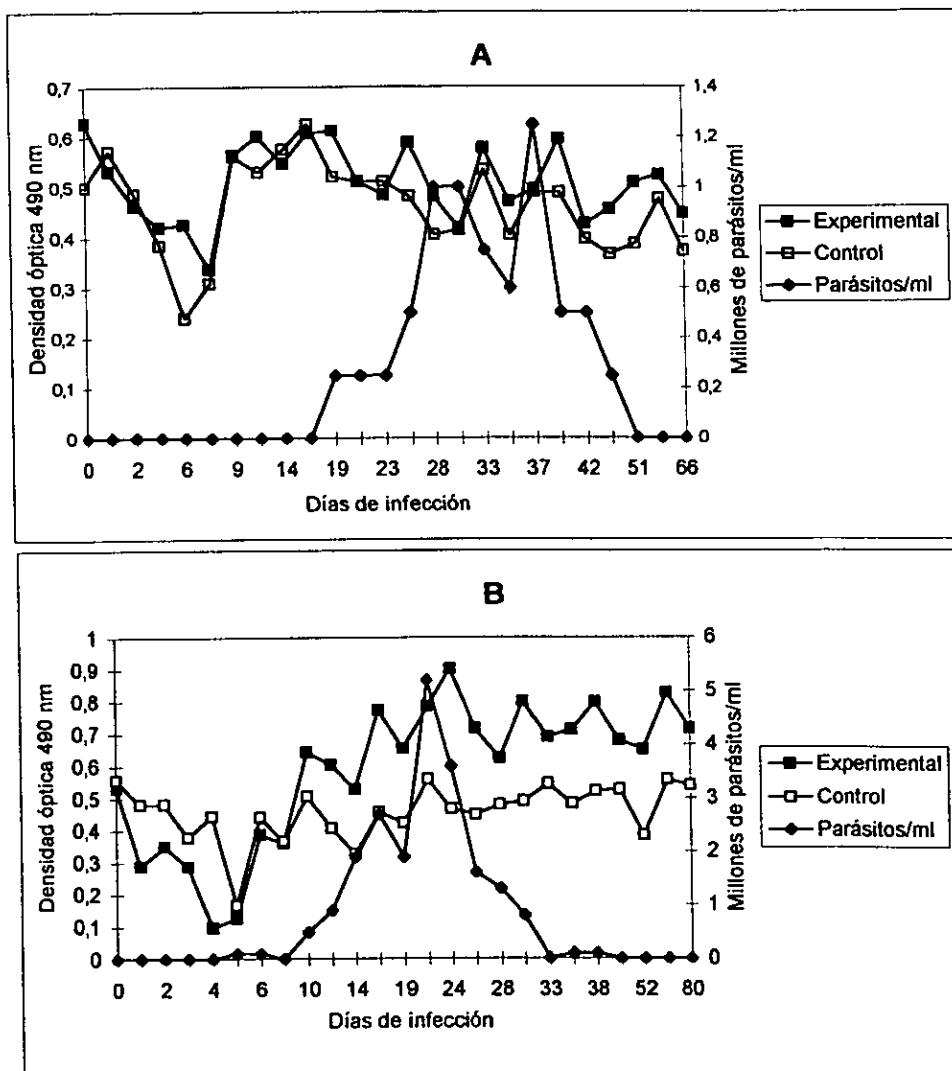


Figura 28. ELISA para la detección de antígenos en el suero de ratones infectados por el AcMc B106E. Se realizó una comparación entre sueros de ratones infectados con la cepa Ninoa A y sueros de ratones infectados con JJO B diluidos 1:100.

V.6. Detección de antígenos en el plasma de ratones infectados con *T. cruzi*.

Para evaluar el ensayo de captura de antígenos utilizando B106E, se sometieron al ensayo plasmas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*. Antes de sacrificar a los ratones se obtuvo la sangre a la que se le agregó heparina. Para evaluar el ELISA y conocer la dilución en que se detectan antígenos circulantes, se sometieron 38 plasmas de ratones infectados, 17 de ratones sanos y 6 plasmas de ratones infectados con *Leishmania* sp con el fin de conocer si existe reacción cruzada a pesar de que en la estandarización no se había encontrado reacción cruzada con este organismo. Los plasmas se utilizaron a tres diferentes diluciones 1:25, 1:50 y 1:100. En la figura 29 la gráfica C, se muestra que la dilución 1:100 fue la mejor ya que se detectaron antígenos en los ratones infectados. Se obtuvo el promedio de los valores de las densidades ópticas de los plasmas negativos y se sumaron dos desviaciones estándar, el valor de corte fue 0.22. A esta dilución; el 80% de los plasmas analizados fue positivo. De los 6 plasmas de ratones infectados con *Leishmania* sp., 3 resultaron positivos en el ensayo de captura de antígenos de *T. cruzi*.

El apéndice H muestra los valores de las densidades ópticas obtenidas de los plasmas provenientes de ratones infectados con las diferentes cepas de *T. cruzi*, las cuales inducen diferentes cargas parasitarias en los ratones. Los resultados del grupo experimental se analizaron estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza. Con esta prueba se encontró que para las diluciones 1:25 y 1:50 no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control ($p < 0.05$). para el caso de la dilución 1:100, se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control ($p > 0.05$). También se determinó que la sensibilidad del ELISA para detectar antígenos circulantes no depende del número de parásitos en circulación

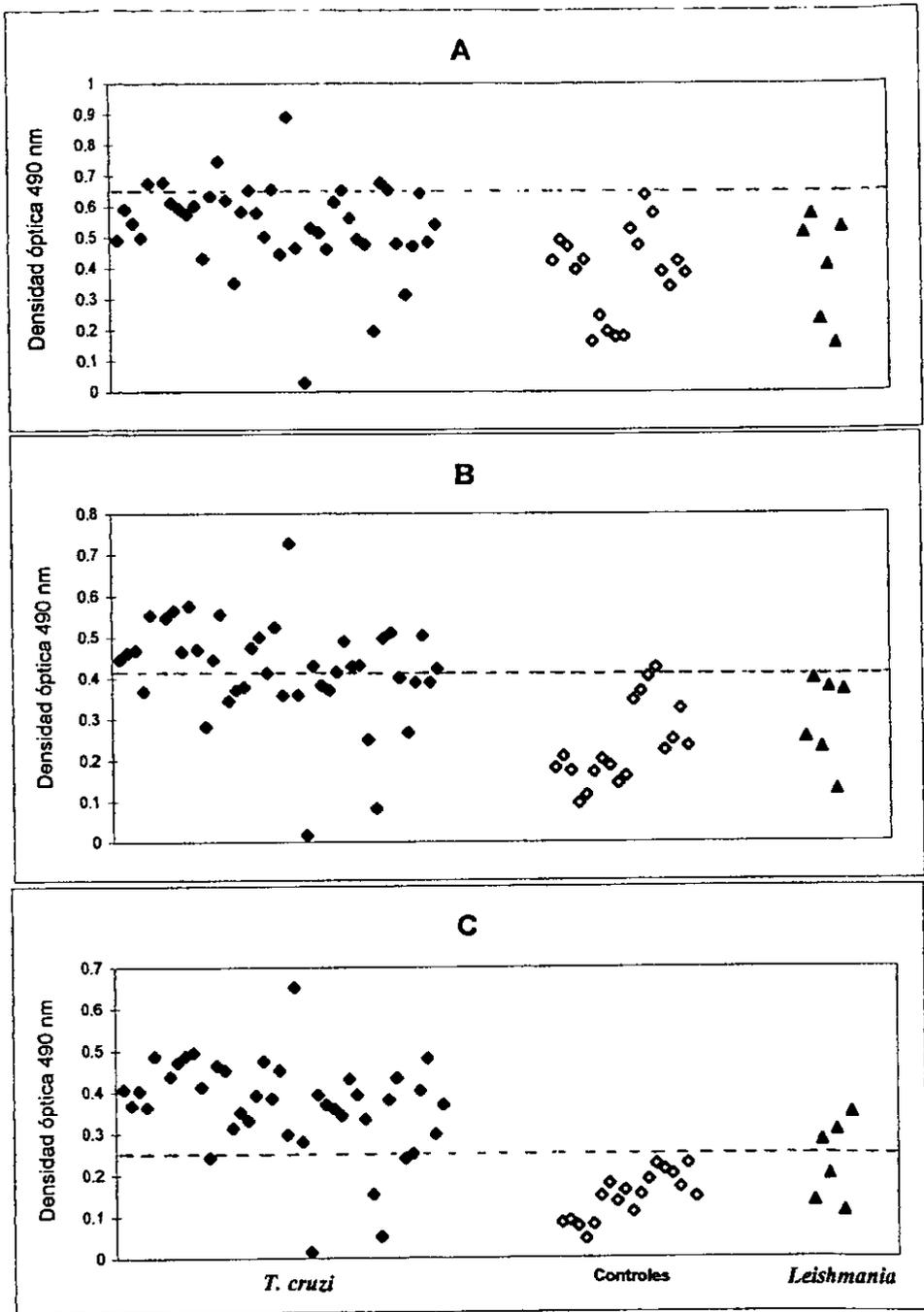


Figura 29. ELISA para la captura de antígenos en el plasma de ratones infectados. Plasmas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi* se sometieron al ELISA de captura de antígenos. Se utilizaron diferentes diluciones del plasma en A 1:25 en B 1:50 y en C 1:100. La línea punteada dada por el promedio de D. O. de los plasmas de los ratones normales mas dos desviaciones estándar determina el punto de corte en este ensayo de captura. ◆ plasmas de ratones infectados con *T. cruzi*, ◊ plasmas de ratones controles. ▲ plasmas de ratones infectados con *Leishmania* sp.

V.7. Detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* en suero humano.

Dado que se encontró que el ELISA para la captura de antígenos utilizando el AcMc B106E dió buenos resultados en el caso de la infección por *T. cruzi* en ratones. Se decidió evaluar el ensayo en muestras humanas. Para ello, se utilizó el ELISA ya estandarizado. Se analizaron 24 sueros de individuos mexicanos con doble serología positiva (ELISA y Western blot positivos) de los cuales 9 tenían hemocultivo positivo. También se utilizaron 22 sueros de individuos chagásicos brasileños y 22 sueros de individuos negativos a la serología. En el apéndice I, se muestran los valores de las densidades ópticas, obtenidas de los sueros de individuos chagásicos mexicanos (M) brasileños (B) y del grupo control (C) al ser evaluados en el ELISA de captura de antígenos.

Los resultados del ELISA de captura de antígenos se muestran en la figura 30 donde los sueros se utilizaron en tres diferentes diluciones (1:10, 1:20 y 1:40) Se observó que el ELISA no detectó antígenos en los sueros humanos ya que los valores de densidad óptica fueron muy semejantes tanto en las muestras de pacientes chagásicos como en las del grupo control. El promedio de los controles negativos fue de 0.183 mientras que el de los chagásicos fue de 0.198 en la dilución 1:10 no existiendo diferencias significativas entre estos valores. Los promedios obtenidos en las diluciones 1:20 y 1:40 de los sueros de individuos chagásicos fueron 1.6 y 1.6 respectivamente por lo que tampoco hubo diferencias significativas al ser comparados con el grupo control.

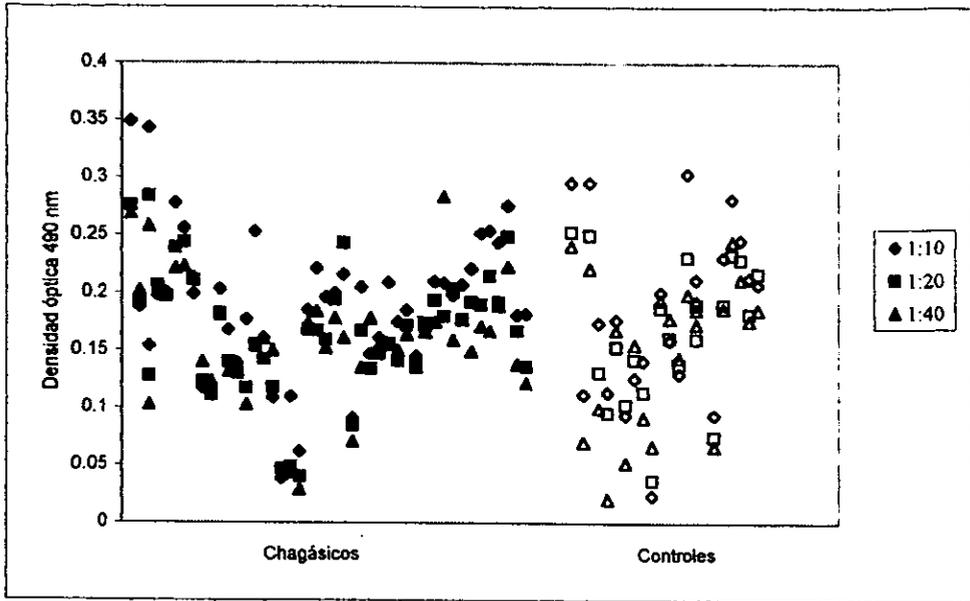


Figura 30. Detección de antígenos de *T. cruzi* en sueros humanos. Se evaluaron sueros de individuos mexicanos y brasileños chagásicos (figuras negras) y sueros de individuos controles (figuras blancas) diluidos 1:10, 1:20 y 1:40.

VI. DISCUSIÓN

La comprobación de la infección por *T. cruzi* constituye uno de los elementos importantes para conocer con certeza la distribución de la infección y así ayudar al control de la transmisión del parásito por transfusión de sangre, transplantes de órganos y el monitoreo del tratamiento quimioterapéutico. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda se basa en la detección de tripomastigotes por microscopía en muestras de sangre fresca. En la fase crónica, se emplean técnicas serológicas, las cuales se basan en la demostración de anticuerpos específicos en el suero, que a pesar de ser sensibles presentan reacción cruzada con otras infecciones parasitarias (OMS, 1991). Aunque los métodos serológicos han sido útiles, la presencia de anticuerpos específicos no siempre está relacionada a una parasitosis activa, la cual puede ser puesta en evidencia directamente por ensayos que detecten antígenos parasitarios. Los antígenos de secreción de *T. cruzi*, productos de su metabolismo son de gran importancia ya que su detección proporcionaría nuevas herramientas para conocer la patología provocada en el hospedero, explicar los posibles mecanismos que le permiten al parásito *in vivo* evadir la acción de los anticuerpos y de las células sensibilizadas y podría ser utilizada como una herramienta para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Petray y cols., 1992).

Una característica de las infecciones parasitarias es la presencia de una gran variedad de antígenos en la circulación de humanos y de otros hospederos infectados. En el caso de *T. cruzi*, los antígenos han sido detectados tanto en fluidos humanos como en infecciones experimentales (Corral y cols., 1989). En el presente estudio, se estandarizó y evaluó un ELISA de doble captura para la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* utilizando dos anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de un extracto total del parásito. Los resultados presentados en este trabajo mostraron que de las ocho combinaciones de anticuerpos probadas, la más sensible fue aquella donde se utilizó el AcMc B106E como anticuerpo de captura y este mismo anticuerpo biotinilado como anticuerpo de revelado. Con esta combinación se detectó hasta 125 ng de antígeno total del parásito de la cepa Querétaro. Esta concentración es comparable a los ensayos de otros estudios donde han reportado sensibilidades desde 200 ng (Freilij y cols., 1987) a 170 ng de proteína de un lisado de *T. cruzi* (Araujo, 1982). Con el método DOT-IBA se detectaron picogramos de antígeno disuelto en PBS o en medio de cultivo pero cuando se diluyó el antígeno en suero normal de ratón se detectaron 6 ng de antígeno (Corral y cols., 1991).

El trabajo de Corral y colaboradores en 1991, demostró una buena especificidad ya que no hubo reconocimiento de lisados antigénicos de *Toxoplasma gondii* y *Leishmania sp* utilizando un antisuero policlonal en DOT-IBA.

Los ensayos de estandarización en este trabajo demostraron que este anticuerpo no reconoce antígenos de *Leishmania sp.*, fluido vesicular de cisticerco de *Taenia crassiceps*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* ni de *Entamoeba histolytica* por lo que fue específico para *T. cruzi*. Esta especificidad del anticuerpo ya había sido reportada por López en 1999 quien demostró que el anticuerpo B106E no reconoce proteínas de otros parásitos pero si reacciona con un antígeno de aproximadamente 100 kDa de extractos de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes haciéndolo muy interesante para estudiar la función del antígeno reconocido por B106E en la interacción hospedero-parásito.

En cuanto a la detección de antígenos circulantes del parásito en el suero de ratones infectados, no se encontró una correlación entre la presencia de antígenos y el número de parásitos en la sangre ni con la densidad óptica. Este hallazgo ha sido observado antes en ratones con infección aguda cuando los parásitos aún no se observan por microscopía pero si se detectaron antígenos circulantes en estos ratones (Moretti y cols., 1985).

En este trabajo, los plasmas de los ratones, se obtuvieron en la fase aguda de la infección donde la parasitemia fue variable dependiendo de la cepa del parásito con que se infectaron los ratones. Los resultados mostraron que el ELISA de captura utilizando el AcMc B106E detectó antígenos en el 80% de los plasmas de los ratones infectados, en este aspecto existen controversias en cuanto a la detección de antígenos en el plasma de los organismos infectados ya que el estudio realizado por Araujo en 1976, indicó la presencia de antígenos circulantes en animales con alta parasitemia, no encontrando antígenos circulantes en el plasma de los ratones con infección crónica, por lo tanto no se descartó la posibilidad de que los antígenos circulantes detectados no se estuvieran secretando continuamente *in vivo*. También, Araujo en 1982, reportó que la detección de antígenos, por ELISA, no necesariamente depende de la parasitemia ya que en su trabajo encontró antígenos circulantes al tercer día de infección en ratones cuando la parasitemia es aún baja, mientras que, los anticuerpos se detectaron al décimo día.

Cuando el ELISA de captura de antígenos se probó con sueros de pacientes humanos en fase crónica sintomática y asintomática de la enfermedad no se observó sensibilidad alguna en comparación con el 100 % obtenida al determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en las mismas muestras con ensayos serológicos. De esta forma, los resultados presentados en este trabajo indicaron que no fue posible detectar antígenos en

estos sueros sugiere que la detección de antígenos de secreción/excreción del parásito en el suero de estos individuos infectados parece ser un método complejo de diagnóstico menos confiable debido a varias posibles causas como la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, lo que puede causar una reducción en la exposición de los determinantes antigénicos que pudieran ser reconocidos por los anticuerpos específicos, dando como resultado la baja sensibilidad del ELISA en el caso de los sueros humanos (Dierk y cols., 1999). En este aspecto se ha reportado la presencia de antígenos en 5 de 32 muestras de individuos infectados (Dzbenksi, 1974). Esta baja sensibilidad pudiera deberse también a la variación antigénica dentro del hospedero, o a la falta de sensibilidad del ensayo. Además, las diferencias en el hospedero en cuanto a la respuesta inmune ante el antígeno podrían ser importantes en su liberación a la sangre u otros fluidos (Gottlieb, 1977). El estudio reportado por Ouassi y colaboradores en 1991 para la detección de antígenos de *T. cruzi* basado en el uso del anticuerpo monoclonal V63/61, detectó antígenos en un 84% de los sueros de pacientes en fase aguda. La razón por la que el epitopo sea reconocido por este anticuerpo puede deberse a que el mismo epitopo está presente varias veces en la misma molécula o diferentes proteínas del parásito. Otro de los estudios realizados para detectar antígenos en el suero de pacientes chagásicos crónicos fue el de Petray y cols en 1992, donde encontraron en un 58 % antígeno libre y en un 62% complejos inmunes en su población estudiada. La presencia de los complejos inmunes en los fluidos orgánicos representa un problema para la determinación de antígenos ya que se ha sugerido que los anticuerpos utilizados en un ensayo de captura de antígenos deben estar dirigidos contra antígenos que no sean inmunodominantes para el hospedero. Sin embargo, es posible desarrollar un método de diagnóstico sensible basado en la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* menos inmunogénicos que no formen complejos inmunes y que se encuentren en mayor concentración en el suero de los animales infectados con *T. cruzi*.

Con este sistema de diagnóstico se pueden encontrar falsos negativos debido a la presencia de bajas cantidades de antígeno en la sangre periférica en diferentes tiempos de la infección. Esto podría ocurrir porque durante la multiplicación del parásito se producen bajos niveles de antígenos estructurales debido a la escasa destrucción del parásito por la respuesta inmune del hospedero (Dierk y cols., 1999).

Los aspectos a considerar en futuras investigaciones de detección antigénica son la purificación de antígenos circulantes de *T. cruzi* reconocidos por los anticuerpos monoclonales presentes no solo en el plasma o suero sino en otros fluidos del cuerpo (por ejemplo la orina) que indicaran una infección activa del parásito tanto para diagnosticar la infección como para cuantificar su intensidad y determinar la prognosis. A este respecto existen evidencias de la

presencia de antígenos solubles del parásito en la orina de pacientes infectados cuyo diagnóstico ha resultado ser efectivo para llevar a cabo pruebas precisas para detectar la infección en niños con enfermedad de Chagas aguda y congénita (Katzin y cols. , 1989; Umezawa y cols. , 1993; Bertot y cols. , 1998). Por otro lado, se ha incrementado el interés por los antígenos circulantes por su probable participación en la inducción de la respuesta inmune patogénica (Gruppi y cols., 1997) y la evasión de la respuesta inmune.

VII. CONCLUSIONES

El ELISA de doble captura mostró una alta sensibilidad ya que fue capaz de detectar hasta 125 ng de antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

El ELISA de doble captura fue específico para *T. cruzi* debido a que el anticuerpo B106E utilizado en este ensayo no reconoció antígeno total de otros parásitos como *Leishmania* sp, fluido vesicular de *Taenia Crassiceps*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica* y *Toxoplasma gondii*.

El ELISA de captura utilizando el AcMc B106E detecta antígenos de *T. cruzi* en el modelo experimental (ratones Balbc) ya que fue posible detectar antígenos en 80% de plasmas de los ratones infectados con el parásito y no hubo resultados falsos positivos.

La detección de antígenos por el ELISA en el suero de ratones infectados con *T. cruzi* no correlaciona con la cantidad de parásitos circulantes.

La evaluación del ensayo utilizando los sueros humanos resultó negativa posiblemente debido a los bajos niveles de antígenos circulantes en las muestras probadas.

Se sugiere realizar este ELISA de doble captura utilizando otros fluidos como la orina y el plasma y así evaluar su efectividad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J. 1995. Inmunología Celular y Molecular. Interamericana. España. 517 pp.
- Affranchino, J. L., Ibañez, C., Luquetti, R. A., Reyes, M., Macina, R. A., Aslund, L., Pettersson, U. and Frasch, A. C. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* Antigen that is Shed During the Acute Phase of Chagas' Disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:221-228.
- Allen, L. y Push, M. 1983. Diagnóstico Clínico. Salvat. España. 486 pp.
- Almeida, E., Krieger, M. A., Carvakgi, M. R., Oelemann, W. and Goldenberg, S. 1990. Use of Recombinant Antigens for the Diagnosis of Chagas Disease and Blood Bank Screening. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:513-517.
- Araujo, F. 1976. Immunology of Chagas Disease I. Circulating Antigens in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 18:433-439.
- Araujo, F. 1982. Detection of Circulating Antigens of *Trypanosoma cruzi* by Enzyme Immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76:25-36.
- Araujo, F., Chiari E. and Días J. C. 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* Antigen in Serum from Patients with Chagas Disease. *Lancet.* 31:246-249.
- Araujo, F., Sharma, S. D., Tsai, V., Cox, P. and Remington, J. 1982. Monoclonal Antibodies to Stages of *Trypanosoma cruzi*: Characterization and Use for Antigen Detection. *Infect. Immun.* 37:344-349.
- Atias, A. y Apt, W. 1994. Parasitología Clínica. Interamericana, Chile. pp 255-288.
- Bautista L. N. 1993. Estudios de Transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el Estado de Morelos. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 98 pp.
- Barrera, H., Ortiz, R., Rojas, A. y Reséndez, D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Ciencia y Desarrollo.* 108: 50-60.
- Beauvery, E., Rossum, T., Lauwers, S. and Coignau, M. 1979. Comparison of Counterimmunoelectrophoresis and ELISA for Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Lancet.* 27:28.
- Bertot, G., Corral, R., Fresno, M., Rodríguez, C., Katzin, A. and Grinstein, S. 1998. *Trypanosoma cruzi* Tubulin Eliminated in the Urine of the Infected Host. *J. Parasitol.* 84:608-614.
- Bongertz, V. and Carvalho, P. 1992. Production of Monoclonal Antibodies for the Identification of a Strain of *Trypanosoma cruzi*. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46:435-439.
- Brabin, L. 1992. The Epidemiological Significance of Chagas Disease in Women. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87:73-79.

- Brener, Z. 1992. *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, Morphology and Life Cycle. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo M. E and Rassi, A. (Eds.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. p. 13-27.
- Caballero, M. L. 1996. Respuesta Inmune Humoral de *Trypanosoma cruzi* en modelo Murino. Tesis Prof. Fac de Ciencias, UNAM. 96 pp.
- Camargo, M., Segura, E., Kagan, I., Souza J., Cavalheiro, J., Yanovsky, J. and Guimaraes, C. 1986. Three Years of Collaboration of the Standardization of Chagas' Disease Serodiagnosis in the Americas. *An Appraisal. Sal. Pan. Am. Health Org. Bull.* 20:233-244.
- Carbonetto, C. H., Malchiodi, E.L., Chiaramonte, E., Durante de Isola, C.A., Fossati and Margni, R.A. 1992. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* Antigen by Affinity Chromatography with a Monoclonal Antibody. Preliminary Evaluation of its Possible Applications in Serological Test. *Clin. Exp. Immunol.* 82:93-96.
- Cartier, Y., Santoro, F., Bout, D. et Capron, A. 1976. Caractérisation d' antigens parasites circulants dans la bilharzoïse humaine. Mise en évidence dans l' urine et le lait. *Ann. Immunol. (Inst Pasteur)*. 128:35.
- Carpenter, B. 1990. Enzyme-Linked Immunoassay. In: Rose, N., Conway, E., Fahey, J., Friedman, H. and Penn, G. (Eds.). Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washinton, D. C. 1590 pp.
- Corral, S. R., Anders O., Freilij, H. L., Bergman, T. and Grinstein, S. 1989. Purification and Characterization of an 80-kilodalton *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigen. *J. Clin. Microbiol.* 221:145-151.
- Corral, S. R., Anders, O. and Grinstein, S. 1992. Detection of Soluble Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a Dot- Immunobinding Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:31-38.
- Corral, S. R., Altcheh, J., Alexandre, S., Grinstein, S., Freilij, H. and Katzin, A. 1996. Detection and Characterization of Antigens in Urine of Patients with Acute, Congenital and Chronic Chagas Disease. *J. Clin. Microbiol.* 8:1957-1962.
- Corral, S. R., Altcheh, J. M. and Freilij, H. L. 1998. Presence of IgM antibodies to *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigens in Sera from Patients with Acute Chagas' Disease. *Int. J. Parasitol.* 28:589-594.
- Chagas, C. 1909. Nova Tripanozomíaze Humana. Estudos Sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de Nova Entidade Morbida do Homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218.
- Chavez, J., Ferri, R.G. Kliemann, T. A. and Uruleguilon, S. 1979. Complexos Imunes Circulantes na Doença de Chagas. Experimental. Identificao de Antigenos Parasitários nos Complexos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 21:77-81.
- Chiari, E. 1994. Diagnostic Test for Chagas Disease. In: Wendel S., Brener, Z., Camargo, M. and Rassi, A., editores. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. pp. 153-163.

- Cheng, T. C. 1986. General Parasitology. Academic Press College. New York. USA. 827 pp.
- Day Jr, R. A. y Underwood, A. 1989. Química Analítica Cuantitativa. Hispanoamericana, México. 329 pp.
- Deelder, A. VanDam, G. Korneliss, D., Fillie, Y. & Vanzey, L. 1996. *Schistosoma*: Analysis of Monoclonal Antibodies Reactive with the Circulating Antigens CAA and CCA. *Parasitol.* 112:21-35.
- Degrave, W. M. 1994. Molecular Diagnosis of Chagas Disease. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. & Rassi, A. (Eds.). Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. 271 pp.
- Dierk, E., Rebeski, D., Winger, E., Van Rooij, E., Schochl, R., Schuffer, W., Dwinger, R., Crowther, J. and Wrighth, P. 1999. Pitfalls in the Application of Enzyme Linked Immunoassay for the Detection of Circulating Trypanosomal Antigens in Serum Samples. *Parasitol Res.* 85:550-556.
- Docampo, R. and Schmuñis. 1997. Sterol Biosynthesis Inhibitors: Potential Chemotherapeutics Against Chagas Disease. *Parasitol Today* 13:129-130.
- Dusanic, G. D. 1991. *Trypanosoma cruzi (Schistotrypanum cruzi)*. In: Parasitic Protozoa. Academic Press, London. Vol 1. p 137-194.
- Ferreira, A. 1994. Serological Diagnosis. Tests for Chagas Disease Serodiagnosis: A Review en Enfermedad de Chagas. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. and Rassi, A. (Eds.). Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. 271 pp.
- Figuerêdo-Silva, J., Kaneda, Y., Tachibana, H., Furushima, R., Tateno, S., Correia-Lima, F. G. and Bento, D. N. 1991. Epidemiological Survey of *Trypanosoma cruzi* Infection in North-Eastern Brazil Using Different Diagnostic Methods. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 33:193-198.
- Franco da Silveira. 1994. Serological Diagnosis. *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigens for Serodiagnosis. In: Wendel, S., Brener, Camargo and Rassi, A. (Eds.) Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. 271 pp.
- Freilij, H. y Storino, R. 1994. Diagnóstico de Laboratorio. In: Storino, R. and Mile, L. (Eds.) Enfermedad de Chagas. Mosby, Argentina. p 343-357.
- Freilij, H.L. Corral, S.R., Katzin, M.A. and Grinstein S. 1987. Antigenuria in Infants with Acute and Congenital Chagas Disease. *J. Clin. Microbiol.* 420:133-137.
- Goldsmith, R. S., Zárate, T., Kagan, L. G. Cedeño, F.J., Galindo, V. M. y Paz, E. A., 1978. El Potencial de la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea: Hallazgos Serológicos Entre Donadores en el Estado de Oaxaca. *Sal. Pùb. Mex.* 20:439-444.
- Gottlieb, M. 1977. A Carbohydrate-Containing Antigen from *Trypanosoma cruzi* and its Detection in the Circulation of Infected Mice. *J. Immunol.* 2:465-470.

Grimaldi Jr. G. and McMahon-Pratt D. 1996. Monoclonal Antibodies for the Identification of New World *Leishmania* Species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97:37-42.

Gruppi, A. Cerbán F. and Vottero-Cima, E. 1997. Exoantigen from *Trypanosoma cruzi* Contain Cruzipaina. *Acta Trop.* 63:141-149.

Guardia, J., Fraiha, M. y Miles, M. 1989. Enfermedades Infecciosas. Doyma, España. p. 410-414.

Guhl, F. 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* Specific Glycoprotein for Discriminative Serological Diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:531-532.

Guzmán-Bracho, C., García, L., Floriani, J., Guerrero, S., Torres, M., Ramirez, C. y Velasco-Castrejón. 1998. Riesgo de Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por Transfusión de Sangre en México. *Rev. Pan. Salud Pública.* 4:94-98.

Gürtler, R., Cécere, M., Petersen, R., Rubel, D. N. and Schweigmann, N. 1993. Chagas Disease in North-West Argentina: Association Between *Trypanosoma cruzi* parasitemia in Dogs and Cats and Infection Rates in Domestic *Triatoma infestans*.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbour Laboratory. USA. 726 pp.

Katz, M., Despommier, D. D. and Gwadz, R. 1989. Parasitic Diseases. Springer-Verlag, U. S. A. 301 p.

Katzin, A. M., Mancipar, A., Freilij, H., Corral, R. and Yanovsky, J.F. 1989. Rapid Determination of *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigens in Human Chronic Chagas Disease by Agglutination Test. *Exp. Parasitol.* 68:208-215.

Katzin, A. and Umezawa, E. 1991. Detection of Urinary in Human Chronic Chagasic Patients. *Mem Inst, Oswaldo Cruz.* Suppl 1. 86:69-70

Kirchhoff, L. 1993. American Trypanosomiasis (Chagas Disease)- a Tropical Disease Now in the United States. *New Engl. J. Med.* 9:639-644.

Kirchhoff, L. and Neva, F. 1983. Chagas Disease in Latin American Immigrants. *JAWA.* 254:3058-3060.

Kuhn, R. 1981. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. En *Parasitic Diseases*. Ed. Mansfield, J.M. Marcel Decker, U. S. A. p. 137-166.

Laemmli, O. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lemesre, J. L., Afchain, D., Orozco, O., Loyens, M. Breniere, F., Carlier, Y., Martin, U., Nogueira, A., Le Ray D., and Capron, A. 1986. Specific and Sensitive Immunological Diagnosis of Chagas Disease by Competitive Antibody Enzyme Immunoassay Using a *Trypanosoma cruzi* -Specific Monoclonal Antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:86-93.

Levine, N. D., Corliss, J.O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loedic, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, E. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F. G. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27:37-58.

Levy, A., Pereira, V. and Boainain, L. 1988. Avaliação da Técnica de Lise Mediada por Complemento em Pacientes Chagásicos Crônicos Tratados com Drogas Trypanosomicidas. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* 36:32-39.

Lewinsohn, R. 1981. Carlos Chagas and the Discovery of Chagas Disease (American Trypanosomiasis). *J. Roy. Soc. Med.* 74:451-455.

Li, Y., Song, W., Han, J. and Ruppel, A. 1994. Detection of *Schistosoma japonicum* Antigen (Sj31/32) in Chinese Patients Using a Sandwich ELISA Based on Monoclonal Antibody. *Trop. Med. Parasitol.* 45:115-118.

López, O. M. V. 1999. Identificación y Caracterización de Epitopos Proteicos de una Cepa Mexicana de *Trypanosoma cruzi* a través del Uso de Anticuerpos Monoclonales. Tesis de Maestría, UACPyP CCH. UNAM. 127 pp.

Luquetti, A. O. 1990. Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for Diagnosis Multicentre Trial. Serological and Technical Aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:497-505.

Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Robertson, B.D. and Selkir, R. 1991. Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press, Sidney. 223 pp.

Malchiodi, L. E., Chiamonte, M. G., Taranti, N. J., Zwirner, N. W. and Margni, R. A. 1994. Cross-Reactivity Studies and Diferencial Serodiagnosis of Human Infections Caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp Use of Immunoblotting and ELISA with a purified Antigen (Ag16B6). *Exp. Immunol.* 44:417-423.

Markel, A., Voge, M. y David, S. 1990. Parasitología Médica. Interamericana, México. 395 pp.

Mancipar, A., Barnes, S., Lentwoi E. and Broun G. 1982. Immunoenzimatic Determination of Antibody-Bound Soluble Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *App. Biochem. Biotech.* 7:459-462.

Mehlron, H. and Waldorf, V. 1988. Life Cicles. In: Heinz, M. and Springer, V., editores. *Parasitology in Focus. Facts and Trends.* N. Y. pp. 1-147.

Mendes, R. P., Hoshino-S. S., Moura da Silva A., Heredia R., Luquetti, A.O. and Paulo, G. L. 1997. Serological Diagnosis of Chagas Disease: A Potential confirmatory Assay Using Preserved Protein Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1829-1834.

Moncayo A. 1992. Chagas Disease: Epidemiology and Prospects for Interruption of Transmission in the Americas. *Rapp. Trimesst. Statist Sanit. Mond.* 45:276-279.

Monteón P. V., Negrete G. C. y Reyes L. P. 1996. Chronic Chagasic with Parasitemic State (Preliminary Report). *Arch. Med. Res.* 27:335-337.

- Moretti, E., Basso, B. and Vottero-Cima, E. 1985. Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* I. Conditions for their Detection and Immunogenic Properties in Experimental Infections. *J. Protozool.* 32:150-153.
- Murray, P. R., Kobayashi, P., Pfaller, M. and Rosenthal, K. S. 1990. Medical Microbiology. Mosby, St. Louis Missouri. 755 pp.
- National Health Foundation of Brasil. 1997. Etiological Treatment for Chagas Disease. *Parasitol. Today* 13:127-129.
- OMS. 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Informes técnicos Num. 811. Ginebra. 106 pp.
- Ouassi, M.A., Taibi, A., Loyens, M., Martin, U., Afchain, D., Maidana, C., Caudioti, C., Cornette, J., Marteleur, A., Velge, P., Marty, B. and Capron A. 1991. *Trypanosoma cruzi*: a Carbohydrate Epitope Defined by a Monoclonal Antibody as a Possible Marker of the Acute Phase of Human Chagas Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:214-225.
- Peña, B. A. 1999. Enfermedad de Chagas: Una Revisión Monográfica Sobre su Tratamiento. Trabajo Monográfico de Actualización. Fac. Química, UNAM. 101 pp.
- Peralta, J.M., Teixeira, G. M., Shreffler, W. G., Pereira, J. B., Burns, J. M., Sleath, P. R. and Reed, S. G. 1994. Serodiagnosis of Chagas' Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Two Peptides as Antigen. *J. Clin. Microbiol.* 32:971-974.
- Pereira, M., Levy, M. and Boainain. 1989. Xenodiagnóstico, Hemocultura e Teste de Lise Mediada pelo Complemento, Como Criterios de Selecao de Pacientes Chagásicos Crônicos para Quimioterapia. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 5:301-307.
- Pereira, M. 1990. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Wyler, D., editor. Modern Parasite Biology. Freeman-Company, N. Y. 560 pp.
- Petray, P.N., Bonardello, N., Clark, R., Agranatti, M., Corral, R. and Grinstein, S. 1992. Evaluación del Método de ELISA para Detección de Antígenos y Complejos Inmunes Circulantes de *Trypanosoma cruzi* a través de un Estudio de Campo en una Zona Endémica de Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 34:141-147.
- Pinto, D.J. 1984. Enfermedad de Chagas: Epidemiología-Clinica-Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina. 106 pp.
- Pinto, D.J. 1990. Cardiopatía Chagásica: Mito y Desafío. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 60:119-120.
- Pinto D. J. 1992. Epidemiology of Chagas Disease. In: Wendel, S., Brener, Z. Camargo M. E and Rassi, A. (Eds). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. 49-80 pp.
- Primavera, K., Umezawa, E., Peres, B., Camargo, M. and Hoshino-Shimizu. 1990. Chagas Disease: IgA, IgM and IgG Antibodies to *T. cruzi* Amastigote, Trypomastigote and Epimastigote Antigens in Acute and in Different Chronic Forms of the Disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 32:172-180.

Ramos-Echevarría, A. Monteón-Padilla, V. y Reyes-López, P. 1993. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Donadores de Sangre. *Sal. Pub. Méx.* 35:56-64.

Rassi, A., Luquetti, A., Rassi, A. Jr., Rassi, S. G. and Rassi, A. G. 1992. Chagas Disease Clinical Features. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. and Rassi, A., (Eds). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil. p. 81-101.

Rueggsegger, L., Monteón, V., Marcuschamer, J. y Reyes, P. 1993. Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). Encuesta Clínico-Serológica en Municipio Rural Oaxaqueño. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 63:145-148.

Reyes, P., Mendoza C., Marcuschamer, J. y García, C. 1983. Miocardiopatía Congestiva y Tripanosomiasis Americana. Estudio Clínico y Serológico. *Sal. Pub. Méx.* 25:139-144.

Rodas, A., Toro, S., Ramos, A., Monteón, V. y Reyes, P. 1992. La incidencia de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en Pacientes con Miocardiopatía Dilatada en el Instituto Nacional de Cardiología. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 62:541-545.

Romero C. R. 1993. Bases Biológicas de las Enfermedades Infecciosas. Panamericana, México. p. 543-549.

Ruiz, A., Búa, J. y Segura, E. 1994. Antígenos del *Trypanosoma cruzi*: Perspectivas Futuras. In: Storino, R. and Milei, editores. Enfermedad de Chagas. Mosby, Argentina. p 629-640.

Salazar, S. P. De Haro, A. and Uribarren, B. 1988. Chagas Disease in México. *Parasitol. Today*, 4:348-352.

Salazar, S. P., Bucio, M., Cabrera, M. and Bautista, N. 1997. First Case of Natural Infections in Pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92:499-502.

Sanchez, 1996. Uso de ELISA Western Blot y Hemocultivo Para el Estudio de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Morelos. Tesis Prof. Escuela de Ciencias Químicas, UABJ. 66 pp.

Santos-Buch, A and Acosta, M. A. 1985. Pathology of Chagas Disease. In: Immunology and Pathogenesis of Tripanosomiasis. CRC Press, Inc. Boca Raron, Florida. p. 145-184.

Scharfstein, J., Luquetti, A., Murta, A., Senna, M, Resende, J., Rassi, A. and Mendoza, L. 1985. Chagas Disease: Serodiagnosis with Purified Gp25 Antigen. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 34:1153-1160.

Schechter, M., Voller, A., Marinkelle C. J., Filint, J. E., Guhl, F. and Miles, M. A. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* Specific Glicoprotein for Discriminative Serological Diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). *The Lancet.* 22:939-941.

Schenone, H., Carrasco J., De Dios, F., Oyarzum, E., Gazavu, A., Madariaga, L. y Ercilla, A. 1961. Determinación del Límite Austral de Dispersión del Triatomino Domiciliario e Infección Tripanosómica en Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 16:59-62.

- Schenone, H. y Rojas, A. 1989. Algunos Datos y Observaciones Programáticas en Relación a la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.* 44: 66-86.
- Schofield C. J. and Dujardin, J. P. 1997. Chagas Disease Vector Control in Central América. *Parasitol. Today.* 13:141-146.
- Schmidh, G.D. and Roberts, L.S. 1989. Foundations of Parasitology. Timer Mirror/Mosby College Publishing, USA. 750 pp.
- Shikanai-Yasuda, M.A. Brisola C., Guedes L.A., Siqueira G.S., Barone A.A., J. Dias C.P, Amato Neto V., Tolezano J.E, Peres B. A., Arruda Jr. E. R., Lopes M.H., Shiroma, M. and Chapadeiro, E. 1991. Possible Oral Transmission of acute Chagas Disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 33:351-357.
- Siqueira, A., Ferriolli Filho, F. and Carvalheiro. 1966. Um Antígeno Solúvel Presente no Soro de Ratos Infetados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 8:148.
- Snary, D. and Hudson, L. 1979. *Trypanosoma cruzi* Cell Surface Protein: Identification of One Major Glycoprotein. *FEBS LETTERS.* 100:166-170.
- Solis, F. R. Romo, Z. J. and Martínez, I. J. 1997. Wild Reservorios Infected by *Trypanosoma cruzi* in the Ecological Park "El Zapotal", Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92:163-164.
- Szumlewicz, A. P. and Muller C. A. 1987. Studies in Searches of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Host with Chagas Disease. 2-Attempts to Upgrade the Reliability and the Efficacy of Xenodiagnosis in Chronic Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82:259-272.
- Tachibana, H., Nagakura, K. and Kaneda, Y. 1988. Serodiagnosis of Chagas' Disease Using Monoclonal Antibody Against *Trypanosoma cruzi* - Specific M25000 Antigen. *Parasitol Res.* 74:409-414.
- Tay, J. 1980. La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Sal. Pub. Méx.* 22:409-450.
- Tay, J., Salazar-Schettino P. M., Ontiveros, A., Jiménez, J., De Haro-Arteaga, I., García-Yañez., y Gutiérrez-Quiróz, M. 1987. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en una Población de Oaxaca, México. *Bol. Sanit. Panam.* 102:325-332.
- Tay, J. Schenone, H., Sanchez, J. y Robert, L. 1992. Estado Actual de los Conocimientos sobre la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* 47:43-53.
- Tay, J., Sánchez, J., Robert, L., Alonso, T. y Romero-Cabello, R. 1996. Nuevas Localidades con Triatominos infectados por *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* 51:49-53.
- Ternynck, T. and Avrameas, S. 1990. Immuno-Enzimatic Techniques. Elsevier. N. Y. 131 pp.
- Turunen, H. J. 1983. Detection of Soluble Antigens of *Toxoplasma gondii* by a Four-Layer Modification of Enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 17:768-773.

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- Umezawa, E., Shikanai, Y., Franco, S.J., Cotrim, P.C., Paranhos, G. AND Katzin, A. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Detection of a Circulating Antigen in Urine of Chagasic Patients Sharing Common Epitopes with an Immunodominant Repetitive Antigen. *Exp. Parasitol.* 76:352-357.
- Unkonen, P. Koistinen V. and Penttinen K. 1977. Enzyme-Immunoassay in the Detection of Hepatitis B Surface Antigen. *J. Immunol. Method.* 15:343-353.
- Ungar, B.L., Yoken R. and Quinn, T. 1985. Use of a Monoclonal Antibody in an Enzyme Immunoassay for the Detection of *Entamoeba Histolytica* in Fecal Specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:465-475.
- Velasco, C. O., Guzmán, C., Rodríguez, J., López, O. y González, F. 1991. La Enfermedad de Chagas. *Publicación Técnica del INDRE No. 8. México D. F.*
- Velasco, C. O., Valdespino, J. L., Tapia, C. R., Salvatierra, B., Guzmán, B. C., Magos, C., Llausas, A., Gutiérrez, G. and Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Sal. Pub. Méx.* 34:186-196.
- Velasco, C. O. and Guzman, B. G. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 28:275-283.
- Voller, A., Bidwell, D.E and Bartlett, A.1979. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. 125 pp.
- Voller, A, Bartlett, A. Bidwell, D., Clark, M. and Adams, A. 1976. The Detection of Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33:165-167.
- Weiland, G. 1988. Serology and Immunodiagnostic Methods. In: Heinz-Mehлом, editores. *Parasitology in Focus*. Springer-Verlag. p 671-683.
- Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M., Cardoso, M., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C. and Breniere, S. 1997. PCR-Based Diagnosis for Chagas Disease in Bolivian Children Living in an Active Transmission Area: Comparison with Conventional Serological and Parasitological Diagnosis. *Parasitology.* 114:367-373.
- Zárate, L. and Zárate, R. 1985. A Checklist of the Tratominae (Hemiptera, Reduviidae) of México. *Int. J. Entomol.* 60:257-271.
- Zicker, F., Smith, P. G., Luquetti, A. O. and Oliveira, O. S. 1990. Mass Screening for *Trypanosoma cruzi* Infections Using the Immunofluorescence, ELISA and Haemagglutination Test on Serum Samples and on Blood Eluates from Filter-Paper. *Bol. World Health Organization.* 68:465-471.
- Zingales, B., Gruber, A., Ramalho, C., Umezawa, E. and Colli. 1990. Use of Two Recombinant Proteins of *Trypanosoma cruzi* in the Serological Diagnosis of Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:519-522.

APÉNDICE A

El medio D-MEM (GIBCO) se encuentra disponible comercialmente. Para prepararlo, se disuelve un sobre de 13.4 g y 3.7 g de NaCO_3 en menos de 1000 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.1-7.3 y se afora a 1000 ml. Después se filtra con una membrana de 0.22 μ y se deja a temperatura ambiente al menos un día para la prueba de esterilidad. Al día siguiente se complementa con el porcentaje deseado de SFB (10%), glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no-esenciales y antibióticos.

Antibióticos. Da una protección básica contra la infección por bacterias.

Para preparar 250 ml se agrega 1.5 g de penicilina (1000 unidades) y 2.5 g de estreptomycinina (1000 unidades) se disuelven en PBS, se filtra con una membrana de 0.22 μ y se guarda a -20°C . Se agrega 10 ml de la solución a un litro de medio de cultivo.

L-Glutamina 2 mM. Es un nutriente esencial.

Para preparar 100 ml de L-glutamina se mezclan 2.92 g de glutamina. La solución se filtra con una membrana de 0.22 μ y se congela a -20°C . Se agregan 10 ml de la solución a 1 l de D-MEM.

De los aminoácidos no esenciales 10 mM (GIBCO), las vitaminas 100x (GIBCO) y del piruvato de sodio 100 mM (SIGMA) se agregan 10 ml de cada uno al medio de cultivo.

Congelamiento de hibridomas.

Para congelar las células productoras de anticuerpos se prepara 50 ml de SFB (GIBCO), el cual debe tener 10% de DMSO.

A 45 ml de SFB se le agrega 5 ml de DMSO.

APÉNDICE B

Las soluciones empleadas para la purificación de B106E son las siguientes:

Amortiguador de fosfatos 0.14 M pH 8 (PB).

Se utiliza para lavar la columna de proteína A

Se prepara a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach donde

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{ácido}}{\text{base}}$$

Para preparar un litro de amortiguador se pesan 17.03 g (Na_2HPO_4) y 2.75 g ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Glicina 0.2 M pH 2.8.

La glicina se utilizó para despegar a los anticuerpos unidos a la columna de proteína A.

Se pesan 2.75 g de glicina para preparar 250 ml. Se ajusta el pH con HCl concentrado.

Tris 1 M pH 8

Esta solución se utilizó para neutralizar el pH de la glicina

Se utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbach para preparar 250 ml de solución, se pesaron 22.2 g de tris-base y 13.25 g de tris-HCl.

PB al 0.02% de azida de sodio.

Se utilizó para guardar la columna a 4°C y evitar alguna contaminación.

A 100 ml de PB se le agrega 0.02 g de azida de sodio

APÉNDICE C

Soluciones utilizadas en la purificación de F14B.

Amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.2 NaCl 0.5 M (PB-NaCl).

De acuerdo con la ecuación de Henderson – Hasselback

Para esta solución se pesan 0.7 g de Na_2HPO_4 , 0.68 g de $\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 29.222 g de NaCl y se afora a un litro con agua destilada.

Glicina 0.1 M pH 2.4.

Se pesa 1.876 g de glicina, se afora a 250 ml con agua destilada y se ajusta el pH con NaCl concentrado.

Tris 1M PH 8

Se utiliza la misma solución que en el apéndice anterior.

PB-azida de sodio 0.02%

Se agrega a 100 ml de PB, 0.02 g de azida de sodio.

APÉNDICE D

Para el acoplamiento de biotina a los anticuerpos se utilizaron las siguientes soluciones:

Bicarbonato de sodio 0.1 M.

Este amortiguador se utiliza para dializar la muestra de anticuerpos antes de acoplar biotina

Mezclar 8.4 g de NaHCO_3 y aforar a 1L con H_2O bidestilada

Biotina 0.1M.

Se disuelve 1 mg de biotina en 30 μl de DMSO.

Amortiguador de Fosfato Salino pH 7.2 (PBS).

Se utiliza para dializar la muestra que contenía a los anticuerpos y quitar exceso de biotina.

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.36 g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 1.10 g

Cloruro de sodio (NaCl) 9.00 g

Aforar a 1 litro con agua destilada

APÉNDICE E

Soluciones para ELISA

Amortiguador de carbonatos pH 9.6.

Este amortiguador favorece el pegado del anticuerpo o el antígeno a la placa de ELISA.

Para preparar 100 ml se disuelven en agua bidestilada 0.159 g de Na_2CO_3 y 0.293 g de NaHCO_3 y 0.02 g de azida de sodio.

PBS-Tween 0.05%.

Amortiguador de lavado

A un litro de PBS se le agrega 0.5 ml de tween (SIGMA).

Gelatina 0.5%.

Solución bloqueadora. Se utiliza para bloquear sitios libres de la placa de ELISA donde no hay anticuerpos o antígenos y así evitar pegados inespecíficos.

Se disuelven 0.5 g de gelatina en 100 ml de PBS.

Amortiguador de Citrato-Fosfato.

Se utiliza para revelar la reacción

Se prepara ácido cítrico 0.1 M y

Fosfato de sodio dibásico 0.2 M

Se mezclan 2.43 ml y 2.57 ml aproximadamente de cada uno hasta obtener un pH de 5.0.

Acido sulfúrico 2.5 N

Es la solución para parar la reacción de ELISA

Para 50 ml se utilizan 3.3 ml de H_2SO_4 y se lleva a 50 ml con agua destilada.

APÉNDICE F

Soluciones y modo de preparar geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La separación de las proteínas tanto del extracto total de epimastigotes de la cepa QRO como de los anticuerpos monoclonales y policlonales se realiza en una cámara Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad).

Preparación de dos geles

a) Gel separador al 12%

Acrilamida al 30%- Bisacrilamida al 1%	4.0 ml
4X Tris-HCl 1.5 M/SDS 0.4% pH 8.8	2.5 ml
Agua bidestilada	3.5 ml

Degasificar al vacío con agitación continua 10 minutos antes de agregar los siguientes reactivos.

Persulfato de amonio al 10%	32 μ l
Temed	6.6 μ l

La mezcla se agrega entre los cristales montados, se agrega agua para que el gel polimerice de manera uniforme.

b) Gel concentrador al 5%

Acrilamida al 30%-Bisacrilamida al 0.8%	0.420 ml
4X Tris-HCl 0.5 M/SDS 0.4% pH 6.8 0	0.834 ml
Agua bidestilada	2.034 ml

Degasificar al vacío con agitación continua 5 minutos antes de agregarle los siguientes reactivos

Persulfato de amonio al 10%	16.6 μ l
Temed	3.2 μ l

Se desecha el agua que estaba sobre el gel separador para vaciar el concentrador, se colocan los peines de 0.75 mm.

c) Preparación de la muestra

La muestra a analizar se prepara 1:1 con el siguiente amortiguador:

Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	
Glicerol	20%

SDS 2%

2-B Mercaptoetanol 2%

Azul de bromofenol 1%

La muestra se hierve durante 5 minutos y se coloca en el gel con micropipetas.

d) Condiciones de corrida.

Se coloca el amortiguador de corrida, Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1% a 200 volts durante 45 minutos aproximadamente.

e) Fijación.

Al término de la electroforesis el gel se coloca durante una hora en la siguiente solución:

Isopropanol 50%

Acido acético 7%

f) Tinción.

Después se coloca en una solución de azul de comasie durante una hora:

Metanol 50%

Acido acético 10%

Azul de comasie 0.05%

Agua desionizada 40%

Para aclarar y visualizar las proteínas se preparó la siguiente solución:

Metanol 20%

Acido acético 7%

Se realizan varios cambios hasta aclarar totalmente el gel.

APÉNDICE G

Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.

La preparación del gel para western blot se realiza de la misma manera como se explicó en el apéndice C, solo que el gel concentrador se forma con un peine para geles preparativos. En este caso, el gel se incuba con el amortiguador de transferencia en vez de fijar el gel.

El amortiguador de transferencia se preparó con los siguientes reactivos:

Tris 25 mM	3.0 3g
Glicina 192 mM	14.4g
Metanol 20%	200 ml

El papel de nitrocelulosa (8 x 6 cm), papel filtro y esponjas fueron hemedecidas en el amortiguador de transferencia antes de proceder a la transferencia. Después se coloca en un dispositivo de acrílico en forma de un emparedado: una esponja, un papel filtro, el gel de acrilamida, el papel de nitrocelulosa otro papel filtro y otra esponja. Todo esto debe quedar totalmente centrado en el casete y libre de burbujas para evitar resistencia de las proteínas a transferirse al papel de nitrocelulosa. El gel debe estar hacia el electrodo negativo y el papel de nitrocelulosa hacia el positivo.

El mismo amortiguador es utilizado para la transferencia dentro de la cámara debe colocarse una unidad de enfriamiento con agua desionizada congelada previamente. La transferencia se realiza durante 1 h a 100 volts. Para verificar la transferencia, una tira de nitrocelulosa se tiñe con amido black al 0.1%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10% durante 5 minutos, después se lava con solución destefidora de isopropanol al 25% y ácido acético al 10%.

APÉNDICE H

Parasitemia y densidad óptica en plasmas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*

CEPA	Millones de parásitos/ml	1:25	1:50	1:100
H5	2	0.491	0.446	0.407
	1	0.592	0.462	0.368
	1	0.546	0.468	0.404
	1	0.499	0.368	0.364
	1	0.675	0.554	0.487
	2	0.68	0.547	0.438
	2	0.613	0.565	0.472
	1	0.594	0.465	0.488
	1	0.576	0.576	0.496
	JBE	3	0.604	0.47
3		0.432	0.282	0.243
7		0.634	0.445	0.465
4		0.748	0.556	0.453
4		0.621	0.345	0.314
1		0.352	0.371	0.351
7		0.584	0.379	0.332
JRA	3	0.653	0.474	0.392
	1	0.58	0.5	0.475
	1	0.503	0.413	0.385
	4	0.656	0.524	0.453
	3	0.446	0.358	0.298
JFA	3	0.891	0.727	0.653
	2	0.465	0.359	0.28
	3	0.53	0.43	0.394
	1	0.516	0.383	0.37
	1	0.461	0.371	0.36
	2	0.615	0.415	0.344
	4	0.653	0.49	0.431
JJO	4	0.563	0.429	0.393
	3	0.495	0.431	0.335
	4.5	0.477	0.25	0.154
	11	0.677	0.497	0.381
	11	0.654	0.511	0.433
NINOA	1	0.48	0.401	0.24
	1	0.315	0.267	0.251
	1	0.472	0.39	0.403
	1	0.643	0.504	0.481
CONTROLES		0.424	0.182	0.084
		0.492	0.209	0.09

		0.471	0.175	0.076
		0.396	0.096	0.045
		0.428	0.116	0.08
		0.164	0.172	0.148
		0.248	0.202	0.179
		0.196	0.187	0.135
		0.178	0.144	0.162
		0.18	0.162	0.11
		0.526	0.346	0.152
		0.475	0.368	0.189
		0.638	0.404	0.225
		0.579	0.425	0.212
		0.389	0.224	0.201
		0.342	0.25	0.17
		0.424	0.326	0.227
Promedio		0.385	0.234	0.146

APÉNDICE I

Detección de antígenos circulantes en sueros de individuos chagásicos.

MUESTRA	DILUCIÓN		
	1:10	1:20	1:40
M1	0.349	0.276	0.269
M2	0.188	0.191	0.202
M3	0.343	0.284	0.258
M4	0.154	0.128	0.103
M5	0.198	0.206	0.201
M6	0.2	0.197	0.2
M7	0.278	0.239	0.221
M8	0.256	0.244	0.223
M9	0.199	0.211	0.213
M10	0.117	0.123	0.14
M11	0.112	0.111	0.123
M12	0.203	0.182	0.181
M13	0.168	0.14	0.132
M14	0.139	0.13	0.132
M15	0.177	0.117	0.103
M16	0.253	0.155	0.154
M17	0.161	0.142	0.16
M18	0.109	0.118	0.15
M19	0.039	0.047	0.042
M20	0.11	0.049	0.044
M21	0.062	0.04	0.029
M22	0.185	0.168	0.174
B1	0.221	0.167	0.184
B2	0.196	0.159	0.152
B3	0.2	0.194	0.178
B4	0.216	0.243	0.161
B5	0.091	0.085	0.071
B6	0.205	0.167	0.135
B7	0.147	0.134	0.178
B8	0.161	0.147	0.155
B9	0.209	0.156	0.155
B10	0.175	0.141	0.15
B11	0.185	0.172	0.164
B12	0.145	0.135	0.145
B13	0.168	0.174	0.166
B14	0.21	0.194	0.175
B15	0.209	0.18	0.284
B16	0.198	0.204	0.159
B17	0.207	0.177	0.177
B18	0.221	0.192	0.149
B19	0.252	0.19	0.171

B20	0.254	0.215	0.167
B21	0.244	0.192	0.189
B22	0.276	0.249	0.223
B23	0.181	0.167	0.138
B24	0.182	0.136	0.122
Promedio Experimentales	0.198	0.166	0.16
C1	0.296	0.253	0.241
C2	0.112	0.086	0.07
C3	0.296	0.25	0.221
C4	0.174	0.131	0.1
C5	0.114	0.096	0.021
C6	0.177	0.153	0.168
C7	0.094	0.103	0.052
C8	0.126	0.142	0.155
C9	0.141	0.114	0.092
C10	0.024	0.037	0.067
C11	0.201	0.187	0.194
C12	0.159	0.161	0.178
C13	0.13	0.138	0.144
C14	0.304	0.231	0.199
C15	0.212	0.16	0.186
C16	0.193	0.19	0.173
C17	0.094	0.075	0.067
C18	0.231	0.19	0.187
C19	0.282	0.233	0.245
C29	0.246	0.229	0.212
C21	0.213	0.182	0.176
C22	0.208	0.217	0.186
Promedio Controles	0.183	0.161	0.151