



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de un extracto antigénico para su empleo en el diagnóstico de la infección por *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:

Mariana Citlalli De Alba Alvarado



DIRECTORA DE TESIS:
M en C. Martha Irene Bucio Torres

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
De Alba
Alvarado
Mariana Citlalli
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
302096190
2. Datos del tutor
M en C
Martha Irene
Bucio
Torres
3. Datos del sinodal 1
Dra
Paz Maria Silvia
Salazar
Schettino
4. Datos del sinodal 2
M en C
Adela Luisa
Ruiz
Hernandez
5. Datos del sinodal 3
M en C
Margarita
Cabrera
Bravo
6. Datos del sinodal 4
M en C
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de un extracto antigénico para su empleo en el diagnóstico de la infección por
Trypanosoma cruzi
95p
2010

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, con el apoyo parcial de PAPIIT IN201608

DEDICATORIA

A mi madre, por su apoyo incondicional y confianza en mí; por quererme tanto, darme ánimos, un espacio. Gracias!!

A mis hermanos que siempre han sido un ejemplo para mí, Kin y Alfredo, a sus familias el Chamo y Magaly, Leonardo y Katia.

A Papá gracias por las lecciones.

A mis primas: Moni (gracias por todas las pláticas y tu amistad también), Sonia y toda la familia Ayala, a Chintis y sus bebés y toda su familia, Pau y Adi y toda su familia. A mi primo Gabriel, y toda su familia. Los quiero.

A la familia De Alba: Alis (que fue de mucha ayuda en muchos momentos, gracias) a toda su familia, a Meche, a toda su familia y todos mis queridos primos de Torreón.

A las personas que han sido fundamentales en mi vida: Mary Carmen y Linus, Elisa, Ricardo Guillen, Alfa, Irving, Érica Hagman, David Alfredo, Carlos Francisco, Elia Torres, Arturo Roldan, Asdrúbal, Anet, Lalo (El Yobas), Hugo Físico (Tío), Lucía y su bebé, Rodrigo (Lutito), Avelino, a los de Querétaro (Juanito, Goyo y Dieguito con sus respectivas), Adam y Lenin. A los rumis: Joaquín, Alfredo y Rafa. A todos ellos, Gracias compartir su camino con el mío, en diferentes momentos, cada uno ha influido en mí, sus consejos, experiencias, amor y buena vibra me han hecho una mejor persona, más feliz, gracias por todo su apoyo, los quiero muchísimo a todos.

A mis cuates del Taller: Elia Torres (colega que sabe mucho de mí, su amistad recomendaciones y experiencia, ha sido de gran ayuda), Aarón, Laurita Vallejos, Any Laura, gracias por todo.

A mis Profesores de Pediatría Martha Ponce y Mario.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Paz María Salazar, por ser una gran mujer, ejemplo para muchas, darme el espacio para desarrollar este trabajo, darme oportunidades confianza, transmitirme toda una gama de conocimiento en todos los aspectos de la parasitología, y seguir siendo un trasmisor de conocimiento efectivo para las siguientes generaciones.

A la M. en C. Martha Bucio por la experiencia que me ha dado, todo el conocimiento transmitido y las lecciones, su confianza en mí, todo su apoyo, por la guía y revisión de esta tesis.

A la M. en C. Margarita Cabrera por su apoyo, carisma y su revisión fundamental en la tesis, asesoría en el análisis estadístico, y extracción antigénica.

A la M. en C. Yolanda Guevara por su apoyo con los medios de cultivo y manejo de los parásitos, y confirmación el panel de sueros con la prueba de IFI

A la M. en C. Gloria Rojas por la asesoría en todo lo relacionado con el vector, ciclos de vida y distribución de estos.

A la M. en C Adela Ruiz por sus valiosas recomendaciones.

A la Pas. M en C Elia Torres por el apoyo y asesoría en la técnica de ELISA, determinaciones proteicas, Electroforesis y Western Blot

A la Técnico de Lab. Evangelina Anaya por su dedicación al laboratorio, especialmente en preparación de todos los reactivos necesarios para el funcionamiento de todas las técnicas.

A la M. en C. Cristina por sus valiosas recomendaciones en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por los sueros proporcionados.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2 Ciclo Biológico Natural	8
1.3 Mecanismos de Transmisión y de Infección	9
1.4 Vectores	11
1.5 Cuadro Clínico	13
1.6 Respuesta Inmune, Patogenia y Patología	15
1.7 Antígenos de <i>T. cruzi</i>	17
1.8 Diagnóstico	21
1.9 Generalidades del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	23
1.10 Técnica de ELISA indirecta en microplaca	24
1.11 Ensayo inmunoenzimático sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA)	26
1.12 Iniciativas para el control de la enfermedad de Chagas	27
2 JUSTIFICACIÓN	30
3 HIPÓTESIS	32
4 OBJETIVO GENERAL	33
5 OBJETIVOS PARTICULARES	33
6 METODOLOGÍA	34
6.1 Microorganismos	34
6.2 Extracción Antigénica	35
6.3 Cuantificación de proteínas totales	35
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
6.5 Electroinmunotransferencia (Western-blot)	37
6.6 Paneles de sueros humanos	38
6.7 Inmunoensayo con el reactivo comercial "CHAGATEK ELISA"	39
6.8 Estandarización del procedimiento de la Técnica de ELISA en microplaca	39
6.9 Evaluación de ELISA indirecta en microplaca con el panel de sueros	41
6.10 Estandarización del procedimiento de la Técnica de Dot-ELISA	41
6.11 Evaluación de Dot-ELISA con el panel de sueros	42
6.12 Análisis estadístico	43
6.13 Prueba de concordancia Kappa	44
6.14 Análisis de costos	45
7 RESULTADOS	46
7.1 Rendimiento parasitario y proteico	46
7.2 Electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)	47
7.3 Electroinmunotransferencia	48
7.4 Determinación de la reactividad de los sueros con el reactivo comercial	49
7.5 Evaluación con la técnica de ELISA indirecta en microplaca	51
7.6 Evaluación con la técnica de ELISA con sueros reactivos a <i>Leishmania mexicana</i>	52
7.7 Evaluación con la técnica de Dot ELISA	53
7.8 Evaluación con la técnica de Dot ELISA con sueros reactivos a <i>L. mexicana</i>	55
7.9 Análisis estadístico	56
7.10 Análisis de costos de los procedimientos de ELISA en microplaca y Dot-ELISA	58
8 DISCUSIÓN	60
9 CONCLUSIONES	65
10 PERSPECTIVAS	66

11	ANEXO 1	67
13	ANEXO 2	68
14	ANEXO 3	71
15	ANEXO 4	74
16	ANEXO 4.1	75
17	ANEXO 5	76
18	ANEXO 6	78
19	ANEXO 7	80
20	ANEXO 8	81
21	BIBLIOGRAFÍA	82

RESUMEN

En el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, la OMS señala como necesidades de investigación continuar la evaluación de pruebas serológicas especialmente de la prueba de ELISA por su alta sensibilidad y especificidad. La técnica de Dot-ELISA es una modificación de la ELISA convencional, que se realiza en soportes de nitrocelulosa; ha sido utilizada en estudios seroepidemiológicos desde 1988 con buena eficacia al ser comparada respecto a las técnicas convencionales de HAI, IFI y ELISA donde se concluye que puede ser una alternativa práctica para detectar la infección por *Trypanosoma cruzi*. En este trabajo se evalúa un extracto antigénico de origen mexicano para su empleo en las técnicas de ELISA y Dot-ELISA. La metodología consistió en obtener un extracto antigénico de 4 aislados de *T. cruzi*. Después de estandarizar las técnicas de ELISA y Dot-ELISA, se realizó la evaluación con un panel de sueros de individuos mexicanos (88 reactivos y 88 no reactivos, previamente caracterizados). Para el análisis estadístico se consideraron como estándar de oro los resultados del reactivo comercial CHAGATEK. Los cálculos para la técnica de ELISA en microplaca mostraron lo siguiente: sensibilidad (S) 97.78 %, especificidad (E) 100, valor predictivo positivo (VPP) 100 y valor predictivo negativo (VPN) 97 y para Dot-ELISA: (S) 100%, (E) 100%, (VPP) 100%, (VPN) 100%. Se concluye que el extracto antigénico es adecuado como herramienta serológica y puede ser utilizado para tamizaje en estudios epidemiológicos o confirmación aunada a Inmuno fluorescencia (IFI) o hemaglutinación (HAI). Se recalca la importancia de evaluar procedimientos serodiagnósticos como alternativas a los reactivos comerciales, los que debido a su alto costo son inaccesibles a nivel masivo en Latinoamérica.

Con base en los resultados de este trabajo, se propone el uso de la técnica de Dot-ELISA, como otra alternativa para el serodiagnóstico en centros de diagnóstico que no cuentan con

la infraestructura para realizar la serología convencional utilizada en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, debido a que es un procedimiento sencillo y de bajo costo.

1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja, ya que en ella se llevan a cabo continuas infecciones que involucran la interacción entre especies de transmisores y mamíferos silvestres, peridomésticos y domésticos con una gran diversidad de formas de transmisión y que en el humano, la evolución de la enfermedad se puede presentar con diversas manifestaciones clínicas (UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006).

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana; es un protozooario flagelado que en forma natural se transmite por insectos hematófagos llamados triatominos; este parásito fue descubierto en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil; quien describe gran parte del ciclo biológico al relacionar el parásito con el triatomo transmisor (*Panstrongylus megistus*) del cual aísla al parásito, además reproduce la infección en mamíferos de laboratorio y describe los aspectos principales de la patología en el humano sus manifestaciones clínicas y complicaciones generadas. Por otro lado, refiere las condiciones de vivienda rurales que se requieren para la propagación del vector (Chagas, 1909); condiciones que aún prevalecen en nuestros días al ser considerada como una enfermedad de la pobreza y por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009 incorpora a la enfermedad de Chagas dentro de la clasificación de enfermedades tropicales desatendidas con el fin de fomentar acciones de promoción así como medidas de control sinérgicas (OMS/A62/17/2009).
http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_17-sp.pdf

Distribución de la Enfermedad de Chagas

En el humano, la infección natural se distribuye geográficamente, en el Continente Americano (desde el sur de los Estados Unidos hasta el Sur de Argentina y Chile). La OMS en 2006, estimó que la enfermedad afecta 8 millones de personas y en 2008 se registraron 11 000 muertes mundiales por esta causa (OMS/A62/17/2009). También, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en una estimación de 2005 señala que aproximadamente 108 millones de personas se encuentran expuestas a esta enfermedad lo que representa aproximadamente el 20% de la población de América (OP5/HDM/CD/425-0G).

(<http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf>).

Actualmente la enfermedad de Chagas está dejando de ser una enfermedad exclusiva del Centro y Sur del continente americano, ya que en países como Canadá, Estados Unidos de América, algunos de Europa e inclusive Japón y Australia, se han reportado cada vez más casos, relacionados con otras vías de transmisión diferentes al ciclo natural y que son por transfusión sanguínea, vertical de la madre al producto y por trasplantes de órganos (OMS/A62/17/2009).

Antecedentes en México

En México en el año de 1940, Luis Mazzottii reportó los 2 primeros casos humanos y los dos primeros vertebrados infectados por el parásito (Mazzoti, 1940) y posteriormente a partir de los 50's Biagi, Tay en los 60's y Salazar en los 70's, realizan una serie de encuestas epidemiológicas en diversas regiones del país. En 1965, Biagi realizó el reporte de 2 miocarditis chagásicas con base en diagnósticos *post-mortem* (Biagi, 1965) y en 1979, Salazar-Schettino reporta el tercer caso de miocardiopatía chagásica comprobado parasitológicamente en un paciente vivo (Salazar, 1979) y en 1984 informa el primer caso de megaesófago con serología positiva (Salazar-Schettino, 1984) y Tay en 1986 el primero

de megacolon (Tay, 1986). A la fecha, únicamente existe un caso comprobado de infección por transfusión sanguínea (Salazar, 1989). A la fecha, se han incrementado los estudios en diversas regiones del país encaminados hacia diversos aspectos de la enfermedad; los estados de Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Jalisco han realizado un considerable número de encuestas epidemiológicas con reportes de casos en humanos (Cruz-Reyes, 2006); Respecto a Bancos de Sangre, el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, a partir del año 2000, incrementa las acciones de tamizaje en donadores, relacionadas principalmente con el mejoramiento de la infraestructura y capacitación del personal y se establecen acciones interinstitucionales con la UNAM y que a la fecha refieren como cobertura a junio de 2009, 81.17% de un total de aproximadamente 1 150 000 donaciones que se realizan por año en el país y refieren la detección de 1, 467 donadores reactivos (Rojo, 2009). Otros investigadores están realizando estudios en vectores respecto a taxonomía, distribución, control y ecología (Martínez-Ibarra, 2003), de citogenética (Panzera, 2007) y respecto al parásito, caracterizaciones de aislados (Espinoza, 1998). En la UNAM, se están realizando estudios conjuntamente con el Instituto Nacional de Cardiología para determinar el perfil clínico cardiológico en niños con miocardiopatía chagásica así como la detección de componentes específicos de fase clínica (Nivardo, 2009, Salazar 2009, Torres, 2009).

1.1 Biología de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un microorganismo eucarionte que se encuentra dentro del reino protista en la familia Trypanosomatidae dentro del orden Kinetoplastida; este se define por presentar un corpúsculo llamado cinetoplasto ubicado dentro de la mitocondria.

Presenta un flagelo único que recorre el cuerpo del parásito (De Haro, 1995). Este parásito se divide por fisión binaria longitudinal.

UBICACIÓN TAXONÓMICA DE *T. cruzi*

REINO PROTISTA(Levine, 1980)
SUB REINO PROTOZOA
PHYLUM SARCOMASTIGOPHORA
SUB PHYLUM MASTIGOPHORA
ORDEN KINETOPLASTIDA
GENERO TRYPANOSOMA
ESPECIE - *T. cruzi* (Chagas 1909)

Este parásito es polimórfico y presenta principalmente cuatro estadios. En las heces del vector, se encuentra como tripomastigote metacíclico, mide de 18 a 21 μm de largo y con tinción de Giemsa, se observa en la parte media del cuerpo del parásito un núcleo y en la parte posterior del parásito el cinetoplasto, un flagelo y una membrana ondulante que recorre al parásito a lo largo. En la sangre del huésped vertebrado, existe otra forma flagelar morfológicamente similar al tripomastigote metacíclico llamado tripomastigote sanguíneo que mide de 18 a 21 μm de longitud. En el intestino medio del insecto y en los medios de cultivo convencionales se encuentra una forma que se conoce como epimastigote de 16 a 18 μm de largo, presenta forma de huso que con tinción de Giemsa, permite observar el cinetoplasto cercano al núcleo, ambos en la parte media del cuerpo del parásito, el flagelo emerge a la altura del cinetoplasto, formando una pequeña membrana ondulante y finalizando en la parte posterior del cuerpo del parásito. En los tejidos del huésped vertebrado, existe la forma replicativa intracelular que recibe el nombre de amastigote que mide de 2 a 4 μm de ancho, presenta forma esférica o subesférica que teñido con Giemsa, permite observar el núcleo y a un lado del mismo, el cinetoplasto en forma de bastoncillo (De Haro, 1995).

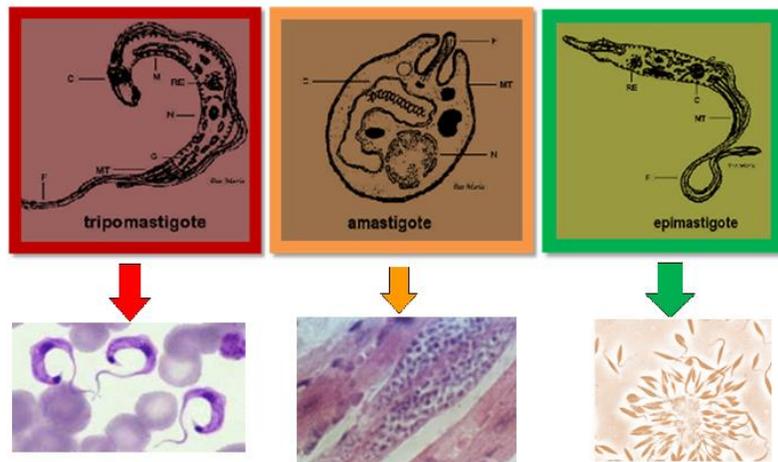


Figura 1- Morfología de *T. cruzi*.

C-cinetoplasto, **M**-Mitocondria, **RE**-Retículo endoplásmico, **N**-Núcleo, **F**- Flagelo

Inferior izquierda: tripomastigotes sanguíneos teñidos con Giemsa

Inferior centro: nido de amastigotes en células de miocardio de ratón

Inferior derecha: Epimastigotes en medio de cultivo LIT

(Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM)

Actualmente se han encontrado 2 grupos principales de poblaciones de este parásito, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, el primero, más homogéneo, asociado al ciclo silvestre, provoca infecciones leves y con menor morbilidad en seres humanos; el segundo grupo es más heterogéneo y a su vez se ha dividido en cinco sub-grupos del II- a al II-e y se relaciona con transmisión y ciclo de vida doméstico, además de presentar alta morbilidad en seres humanos (OMS/TDR/GTC/06,2007).

Existen diversas propuestas de clasificación de *T. cruzi* como se señala a continuación:

Clasificación actual	Otras propuestas de clasificación			
<i>T. cruzi</i> I	Zimodema 1	DTU 1 (Unidad taxonómica discreta)	Linaje 2	Ribodema II/III
<i>T. cruzi</i> II	Zimodema 2 Zimodema A	DTU 2 (Unidad taxonómica discreta 2)	Linaje 1	Ribodema 1

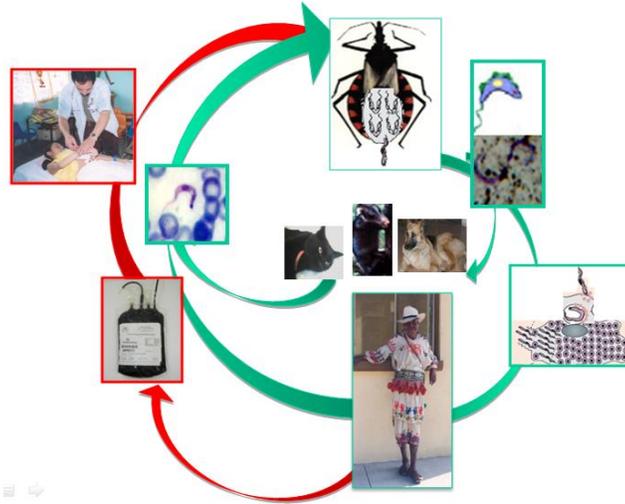
Modificado de OMS/TDR/GTC/06,2007 (http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf).

El genoma de *T. cruzi*, es diploide que tiene un tamaño de 106,4-110,7 Mb caracterizado a partir de la cepa CL Brener, híbrido de *T. cruzi* I y II, organizado en 28 cromosomas diploides

en casi todas las cepas de *T. cruzi*, codifica aproximadamente 12,000 genes (Cano,1995), con gran número de genes repetidos en tándem (Agüero, 2000). En la actualidad se sigue debatiendo sobre la filogenia de *T. cruzi* para realizar una clasificación homogénea.

1.2 Ciclo Biológico Natural

En el ciclo biológico de *T. cruzi* están involucrados el artrópodo transmisor (triatomino) y un gran número de reservorios mamíferos (ardilla, tlacuache, armadillo, ratón de campo, rata, burro, cerdo, perro y gato, entre otros), además del humano. Cuando un triatomino ingiere sangre de un mamífero infectado, introduce al parásito en su sistema, en la luz del intestino del insecto, se desarrollarán los epimastigotes que se dividirán por fisión binaria y a partir de aproximadamente 15 a 30 días, se formara la fase de tripomastigote metacíclico que es la forma infectante, la cual sale junto con las deyecciones del triatomino. En el momento en que un triatomino infectado con el parásito se alimenta de nuevo de un mamífero sano, su estómago se llena a repleción y emite deyecciones con tripomastigotes metacíclicos, los cuales atraviesan la piel o las mucosas y pueden ser fagocitados por las células del sistema inmune fagocítico mononuclear transformándose en amastigotes; estos últimos se multiplicarán por división binaria longitudinal para finalmente transformarse en tripomastigotes sanguíneos, los cuales al lizar las células de huésped que han invadido, se liberarán al torrente circulatorio, para infectar nuevas células del como macrófagos o musculares para finalmente, en el momento que un triatomino se alimente de la sangre del vertebrado con tripomastigotes sanguíneos iniciara el ciclo de nuevo (Fig. 2) (UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006).



**Figura 2- Ciclo biológico de *T. cruzi*.
Transmisiones rural y urbana**

(Modificado de: UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006.

http://www.mex.ops-oms.org/documentos/publicaciones/pub_manualtrypanosoma.pdf

1.3 Mecanismos de Transmisión y de Infección

En el ser humano, la infección por *T. cruzi* es adquirida por varios mecanismos; la primera forma de infección es la natural, esta se lleva a cabo por medio de un triatómido infectado; esta forma de transmisión es muy común en áreas rurales, donde las características de la vivienda facilitan la proliferación de los insectos en el nicho doméstico. En las zonas urbanas, se presenta la segunda forma de transmisión, relacionada con la transmisión sanguínea y que se origina por la migración de población rural a las ciudades (más 70% de la población de zonas urbanas está compuesta por inmigrantes de zonas con alta prevalencia para Chagas (OMS/TDR/GTC/06, 2007). Las tasas de infección en Bancos de Sangre de algunas ciudades del Continente Americano se encuentran entre el 3% y el 53%, dependiendo del país y de la normatividad en el mismo (OMS/ A62/17/2009). La tercera vía de transmisión, es conocida como connatal y se presenta tanto en zonas rurales como urbanas; esta vía, involucra mujeres infectadas en edad reproductiva, que infectan a

sus productos durante la gestación y nacimiento. La transmisión transplacentaria al feto en formación, se puede producir en cualquier etapa de la infección materna, en embarazos sucesivos, gemelares y puede, produce fetopatías. Se conocen otros mecanismos de transmisión menos frecuentes como son los trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio y la transmisión oral. La transmisión por trasplantes de órganos en hospitales se origina cuando un receptor no infectado recibe algún órgano de un donador infectado; esta infección puede exacerbarse debido a la inmunosupresión requerida para el trasplante. Los accidentes de laboratorio se han reportado tanto en países endémicos como no endémicos en personal involucrado con estas acciones. La transmisión oral, se produce por ingerir alimentos contaminados con el parásito o por la ingesta de reservorios naturales con alta parasitemia, así como, del vector (OMS/ A62/17/2009).

En 2005 la OPS realizó un análisis estadístico sobre los mecanismos de transmisión y de infección en América (Tabla 1); para México reportan lo siguiente:

Tabla 1
Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en México

Datos	No
Población (2005)*	107,029,000
Número de infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> *	1,100, 000
Nuevos casos anuales por transmisión vectorial*	7,700
Casos de Chagas congénito (anual)*	1,100
Mujeres positivas entre 15 y 44 años*	243,000
Tasa de prevalencia*	1,028
Incidencia de Chagas congénito*	0,051
Población expuesta en zonas endémicas*	29,500 000
Prevalencia donantes en bancos de sangre*	0,60

*OPS/HDM/CD/425-06.

<http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf>

1.4 Vectores

El transmisor o vector es conocido comúnmente en México según la región donde se encuentre; en un estudio realizado por Salazar y col en 2005 destacan chinche besucona, chinche de trompuda, chinche voladora, chiche chupasangre, chinche con pistola, talaje, turicata, pito, pick, entre otros.

Este vector es un artrópodo hematófago que pertenece a la clase Insecta, orden Hemíptera, familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae (Galvão, 2003).

Estos insectos presentan dimensiones variables pero en general miden de 1.5 a 3.5 cm, son de hábitos principalmente nocturnos, aunque algunas especies pueden encontrarse picando en pleno día. En la Republica Mexicana han sido reportados ocho géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Meccus* y *Triatoma* con 19 especies. Las especies de mayor importancia médica pertenecen al género *Triatoma* el cual tiene reportadas 24 especies ampliamente distribuidas en el país (Salazar, 2005). Los triatominos son hemimetábolos y su ciclo de vida incluye el huevo, cinco estadios ninfales, adulto (hembra y macho), su periodo de reproducción es variable según la especie, humedad, temperatura y disponibilidad de alimento. Existen factores que contribuyen a la colonización, proliferación y mantenimiento en la naturaleza de los triatominos relacionados con las condiciones de edificación de las viviendas que crean micro hábitats apropiados (viviendas con hendiduras, grietas, paredes y techos de barro, cemento y hojas de palmeras), así como el apilamiento de maderas (Vargas, 2004) piedras y tejas.

(http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=83).

La transmisión natural de *T. cruzi* se lleva a cabo en tres ciclos, doméstico, en el cual el vector coloniza solo la vivienda humana en áreas rurales y suburbanas, el peridoméstico,

donde se mantienen alrededor de núcleos de población humana, y el silvestre que se presenta alejado de asentamientos humanos y con participación exclusiva de reservorios silvestres y ecotopos naturales (Molina, 2007); en México, existen tres especies relacionadas con la vivienda humana que son *T. barberi*, *M. pallidipennis* y *T. dimidiata*, motivo de un estudio realizado por Salazar y colaboradores en 2005, donde se documentó su importancia como vectores. En este estudio, se determinaron los porcentajes de metaciclología encontrándose en *T. barberi* 76.6%, en *T. pallidipennis* 15% y en *T. dimidiata* 26%, la especie que funge como mejor transmisor es *T. barberi* por presentar mayor porcentaje de tripomastigotes metacíclicos (metaciclología) y menor tiempo entre alimentación y defecación (Salazar, 2005).

Tabla 2
Algunas características de las tres especies

Especie	Ciclo	Sitio donde prevalece (dentro del domicilio)	Tiempo que transcurre entre la alimentación y la defecación
<i>Triatoma barberi</i>	Intradomiciliado y Peridomiciliado*	Camas	10 min
<i>Meccus pallidipennis</i>	Peridomiciliado, Intradomiciliado y Silvestre**	Pisos y ropa	10 a 15 minutos
<i>Triatoma dimidiata</i>	Intradomiciliada y Peridomiciliada*	Pisos, debajo de las camas, ángulo entre la pared y el piso	10 a 30

(Modificado de: Salazar y cols., 2005).

* Estas especies son predominantemente intradomiciliadas; en el caso de *T. dimidiata*, sin embargo, en la península de Yucatán su hábitat es principalmente peridomiciliario.

** Reportada con comportamiento intradomiciliado por Bautista et al, en el estado de Morelos.

1.5 Cuadro Clínico

La enfermedad de Chagas puede presentar 3 fases, aguda, crónica asintomática o indeterminada y crónica sintomática. Aproximadamente el 70% de los individuos infectados en fase aguda son asintomáticos y una cantidad menor al 5% manifiesta el signo de Romaña (edema bipalpebral unilateral) (Fig. 3), chagoma de inoculación (nódulo que corresponde al sitio de entrada del parásito), adenitis y linfangitis. Entre los 10 días después de la infección, aparecen las manifestaciones sistémicas descritas: fiebre por las mañanas (38°C), taquicardia y cefaleas. La fase crónica asintomática puede tener una duración entre 10 a 20 años y se caracteriza por la ausencia de signos y síntomas.



Figura 3- Signo de Romaña. Paciente del estado de San Luis Potosí
Cortesía: Salazar, Bucio y Sánchez Utrera.

La fase crónica sintomática se presenta después del período asintomático donde se pueden encontrar afectados órganos como corazón y órganos del aparato digestivo, el 30% de los individuos cursando esta fase presentaran algún daño cardiaco, digestivo o neurológico. *T.cruzi* puede infectar cualquier célula nucleada, pero existen cepas con un tropismo marcado por las células miocárdicas y las células musculares lisas del sistema digestivo, macrófagos y fibroblastos, entre otros. Las manifestaciones cardiacas, se encuentra el corazón agrandado (cardiomegalia) (Fig.4), con insuficiencia cardíaca y con trazos electrocardiográficos que muestran trastornos del ritmo con bloqueos completos o incompletos de la rama derecha del haz de His (UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006).

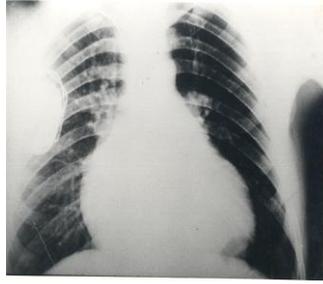


Figura 4- Miocardiopatía chagásica.-Paciente masculino de 47 años de edad)
Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM

Los trastornos digestivos también fueron relacionados por Chagas en 1916 aun cuando anteriormente ya había sido descrita esta afección por Kidder y Fletcher en 1857 a lo cual denominaron “mal del engasgo” que significa mal que provoca disfagia (citado por, Carod-Artal, 2006). La afección esofágica se caracteriza por presentar megaesófago con trastornos que implican demora en el tránsito esofágico, dolor y dificultad en la deglución. En el caso de afección en colon, se presenta megacolon con la consecuente constipación que le caracteriza (Fig 5).

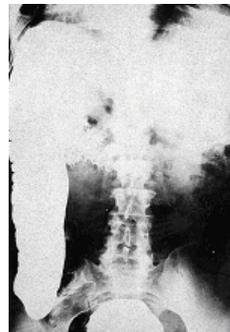
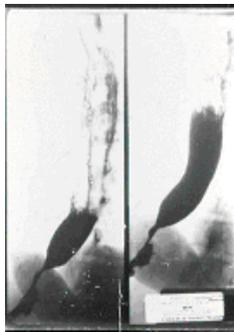


Figura5 - Megas digestivos en México
Izquierda: Megaesófago (paciente femenino de 26 años). **Derecha:** Megacolon (paciente masculino de 51años).
(Cortesía: Laboratorio de Biología de Parásitos UNAM)

1.6 Respuesta Inmune, Patogenia y Patología

El mecanismo de invasión celular del *T.cruzi*, inicia cuando el tripomastigote se pone en contacto con la célula huésped; tanto la célula como el parásito sufren un incremento en el nivel de calcio, este incremento facilitará la formación de la vacuola endocítica, con la cual posteriormente, el tripomastigote es internado a la célula. El ingreso del *T.cruzi* es facilitado por un proceso denominado reclutamiento de lisosomas, mismos con los que el parásito se funde formando el fagolisosoma, aproximadamente 2 horas después, el tripomastigote destruye la vacuola y se interna en el citoplasma donde se diferenciará a amastigote se multiplicará y llevará a la célula a la lisis (<http://www.fiocruz.br>).

Los mecanismos de invasión, multiplicación y lisis celular inducen una respuesta inmune en las células del huésped, esto implica la producción de anticuerpos específicos y la activación de células fagocíticas por medio del Interferón Gama. En fase aguda de la enfermedad se producen anticuerpos tipo IgM; con el transcurso de la enfermedad se incrementa la producción de anticuerpos de tipo IgG e IgA; por lo anterior, se sugiere una estimulación antigénica constante durante las fases indeterminada y crónica (Montiel, 2002).

La inmunopatogenia de la cardiopatía chágasica se puede dividir en diferentes fases:

I-Multiplicación de *T. cruzi* que acarrea a la destrucción de cardiomiocitos. II Activación de la respuesta inmune específica contra *T.cruzi* y liberación de componentes de la célula, que generarán autoinmunidad. Esta activación pasiva molecular entre parásito y huésped (II y III) generan auto anticuerpos y células T reactivas (IV). Los auto-anticuerpos pueden generar lesiones mediante la vía del complemento (II) y opsonisar tejidos que activaran a los macrófagos (III).Las células TCD8+ autorreactivas reconocen autoantígenos (IV). Los linfocitos T citolíticos no solo destruyen las células infectadas, sino también contribuyen a la destrucción de las células adyacentes (VI). Se produce una lesión tisular que lleva a la

producción de $TNF-\alpha$, que resulta en la producción de óxido nítrico. La infección por *T.cruzi* también induce la producción de óxido nítrico directamente, que es responsable de la generar daño cardíaco extenso por estrés oxidativo (V). El proceso inmunopatológico continúa durante la fase crónica de la infección. A pesar la reducción de los niveles de parásitos se siguen desarrollando pequeños focos inflamatorios que continúan desarrollando daño tisular finalizando en la fibrosis con el desarrollo de miocardiopatía dilatada a través de los años (Fig. 6) (Traducido de 2009 Blackwell Publishing Ltd, Parasite Immunology, 31, 673-685, citado por: Gutiérrez, 2009).

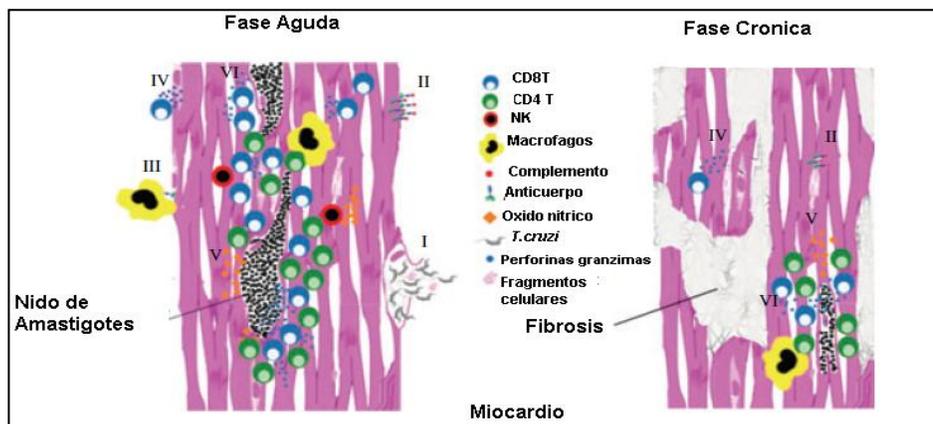


Figura 6- Inmunopatogenia de la cardiopatía Chagásica.

La multiplicación intracelular del parásito genera dos tipos de lesiones inflamatoria y neuronal, originando la destrucción de las células del huésped, también pueden ocurrir alteraciones degenerativas en células no parasitadas con trastornos isquémicos y metabólicos inducido por los procesos de inflamación y autoinmunidad lo que condiciona en la etapa crónica de la enfermedad fibrosis y reducción en el numero de neuronas con la consecuente alteración funcional y orgánica de los órganos afectados. (UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006).

1.7 Antígenos de *T.cruzi*

T. cruzi es un organismo altamente inmunogénico para el huésped vertebrado, contribuye con una gran gama de antígenos, estos se encuentran generalmente en las proteínas periféricas de la membrana, como abundantes glicoproteínas de superficie, como mucinas, proteínas asociadas a mucinas (MASP), transialidasas, entre otras (Huete, 2007), la presencia de estos antígenos es variable en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito (De Lima, 2001). Las transialidasas son enzimas que catalizan la transferencia de residuos de ácido siálico de glicoproteínas y glicolípidos del hospedero a la superficie de los tripomasgote. Su actividad enzimática es muy alta en tripomastigotes, baja en epimastigotes y no se detecta en amastigotes; su función radica principalmente en el proceso de internalización del parásito en la célula del hospedero vertebrado (Zingales, 1987). Las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP) son proteínas O-glicosiladas, tienen la función de proteger al parásito dentro del vector y en el mamífero tienen un papel fundamental en los procesos de reconocimiento e invasión celular, además de ayudar en la resistencia a la lisis mediada por anticuerpos (Buscaglia, 2004). La cruzipaina es una glicoproteína (gp57/51) que tiene una función de cisteín-proteasa lisosomal (aunque se puede encontrar en menor proporción en la membrana plasmática); interviene en la penetración e invasión del tripomastigote en la célula hospedadora así como en el desarrollo y la supervivencia del parásito dentro de las células del hospedero (McKerrow, 1997). En la siguiente Tabla se muestran algunas glicoproteínas de superficie que intervienen en el proceso de internalización e invasión de la célula huésped.

Tabla 3
Algunas glicoproteínas implicadas en los procesos de invasión celular

PM (kDa)	Función	Autor
83, 58 y 68 kDa	Constituyen receptores para el colágeno y fibronectina. La proteína 58/68 inhibe el factor C3, como mecanismo de evasión de la lisis por complemento en humano.	Fisher, 1988
85 kDa	Glicosilada contiene ácido siálico y se identificó como un receptor a fibronectina.	Pereira, 1981, Andrews, 1984
82 kDa	Interviene en la unión con las células del mamífero por medio de un mecanismo mediado por receptores en la fase aguda de la enfermedad.	Yoshida, 2006
35 kDa	Se identificó en tripomastigotes con actividad inmunogénica.	Ruiz, 1993

Existen varias glicoproteínas importantes en el serodiagnóstico dentro de las cuales destacan las siguientes:

- 90 kDa (GP90), descrita inicialmente por Snary en 1979 para el diagnóstico diferencial entre *T cruzi*, *T rangeli* y *Leshmania* sp., posteriormente se le comprobaron junto con la 75 kDa propiedades antifagocíticas y protectoras ante la infección en fase aguda en conejo (Snary, 1979, Nogueira 1981, Scott, 1979).
- 72 kDa (GP72), descrita inicialmente por Araujo en la superficie de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. Schechter en 1986 describe que durante la fase aguda existe elevación de los anti-GP72 IgM, a diferencia de los anti-GP72 IgG y no encontró diferencias entre estos dos en fase crónica.
- 67 kDa (LLGP-67), Silber la describe en epimastigotes y tripomastigotes con importancia en el reconocimiento de receptores celulares del huésped vertebrado (Silber, 2002); fue propuesta para su empleo en el diagnóstico, al probarse contra sueros de pacientes chagásicos, con buena sensibilidad y especificidad (Marcipar, 2003).
- 25 kDa, Scharfstein la describe presente en todos los estadios del parásito así como

en diferentes aislados y posteriormente identifica como su producto primario, una glicoproteína de 57 kDa que mostro reactividad en el 97.8% sueros de pacientes sintomáticos y asintomáticos (Scharfstein, 1985).

También se han mencionado otros componentes como son 4 proteínas citosólicas de 59, 80, 86 y 110 kDa las cuales fueron reactivas con sueros de pacientes chagásicos (de Tito, 1987). Bucio y cols., determinan 11 componentes en tres aislados mexicanos (epimastigotes, tripomastigotes y esferomastigotes) entre 212 y 25 kDa, de los cuales 5 fueron específicos para *T. cruzi* de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa al ser reconocidos por sueros de pacientes chagásicos y sin cruce inmunológico con *Leishmania mexicana* (Bucio, 1999). También han sido propuestos para el diagnóstico los denominados Antígenos Totales de Secreción Excreción de Tripomastigote (TESA) con la caracterización de componentes entre 130 y 200 kDa con buenos resultados en sueros de pacientes crónicos y con infección congénita (Umezawa, 1996).

Se han realizado estudios con los llamados uroantígenos; al respecto, Bongertz en 1981 describe en animales de experimentación la presencia de antígenos de *T. cruzi* en orina, posteriormente en 1984 Corral lo refiere en niños en fase aguda, Katzin en 1989 en pacientes crónicos (citado por Búa, 1990) y Umezawa en 1993 estudia un antígeno excretado en orina en el 60% de pacientes en fase crónica, cuyo peso molecular se localiza entre 150 y 160 kDa (Umezawa, 1996).

A partir de la década de los 90 sobresalen estudios con los denominados antígenos recombinantes para el diagnóstico de la enfermedad. Almeida realiza estudios al respecto en bancos de sangre; Krieger durante la fase aguda de la enfermedad y Lorca en pacientes sintomáticos, asintomáticos y crónicos (Citado por UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006).

Da Silveira y Umezawa en realizan una revisión del serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi*, según se señala en la Tabla 4:

Tabla 4
Antígenos recombinantes empleados en el serodiagnóstico

ANTÍGENO*	PROTEÍNA NATIVA (kDa)**	LOCALIZACIÓN/FUNCIÓN	DIAGNÓSTICO
CRA	225	Antígeno citoplásmico	F.C.
Ag 30	180-255	Antígenos citoplásmicos	F.C.
JL8	>170	Antígenos citoplásmicos	F.C.
TCLR27	150-200	Antígenos citoplásmicos	F.C.
FRA	>300	Proteína asociada al citoesqueleto	F.C.
Ag1	205	Proteína asociada al citoesqueleto	F.C.
JL7	>170	Proteína asociada al citoesqueleto	F.C.
H49	>300	Proteína asociada al citoesqueleto	F.C.
B13	116-140	Proteína de superficie de Tripomastigote	F.C.
Ag2	85	Proteína de superficie de Tripomastigote	F.C.
TCR39	82	Proteína de superficie de Tripomastigote	F.C.
PEP-2	-	Proteína de superficie de Tripomastigote	F.C.
Ag 36	85	Proteína asociada a Microtúbulos	F.A. y F.C.
JL9	110	Proteína asociada a Microtúbulos	F.A. y F.C.
MAP		Proteína asociada a Microtúbulos	F.A. y F.C.
SAPA	105-205	Antígeno de superficie (transialidasa, familia TS)	F.A. y I.C.
TCNA	-	Antígeno de superficie (transialidasa de actividad neuraminidasa)	F.A. y I.C.
TS		Antígeno de superficie (transialidasa)	F.A y I.C.
Ag13	85	Antígeno de superficie (transialidasa)	F.C y F.A.
TcD	260	Antígeno de superficie (transialidasa)	F.C y F.A.
B12	200-230	Antígeno de superficie	F.C.
TcE	35	Proteína ribosómica	F.C.
JL5	38	Proteína P ribosómica	F.C.C.
A13	230	Proteína de choque térmico	F.C.
FCABP	24	Proteína flagelar de unión (Ca ²⁺)	F.C. y M.C
1F8	24	Proteína flagelar de unión (Ca ²⁺)	F.C.
Tc-24	24	Proteína flagelar de unión (Ca ²⁺)	F.C.
Tc-28	28	Proteína flagelar de unión (Ca ²⁺)	F.C.
Tc-40	38-100	Proteína de Choque térmico	F.C.
cy-hsp70	70	Proteína de Choque térmico	F.C. y M.C
mt-hsp70	70	Proteína de Choque térmico	F.C.
Grp-hsp78	78	Proteína de Choque térmico	F.C.
FL-160	160	Proteína de superficie asociada al flagelo (tipo TS)	F.C. y M.C.
CEA	160	Proteína de superficie asociada al flagelo (tipo TS)	F.C.
CRP	160	Proteína de superficie asociada al flagelo (tipo TS)	F.C.
SA-85-1.1	85	Proteína de superficie en Tripomastigote (tipo TS)	F.C.
Ubiquitina	-	Proteínas de marcaje para la destrucción de otras proteínas	F.C.

F.A: Fase aguda; **F.C:** Fase crónica; **I.C:** Infección congénita; **TS:** transialidasa. **F.C.C:** Formas clínicas cardíacas; **M.C:** Monitoreo de cura. * Han sido dados diferentes nombres a péptidos idénticos o similares, agrupados juntos.

** El peso de algunas proteínas nativas puede diferir dependiendo del aislado.

(Modificado de: da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 2001 Jun; 17(6):286-91).

En el caso del empleo de la PCR en el serodiagnóstico, se han propuesto numerosos segmentos de DNA del núcleo (nDNA) y de cinetoplasto (kDNA) de *Trypanosoma cruzi*; en ambos casos, se han elegido las secuencias más repetitivas o en *tándem*. Algunos de

estos *primers* generados contra el nDNA son los denominados Tcz1/Tcz2 y Diaz1/Diaz2 que no amplifican para DNA de otros tripanosomátidos. Con respecto a los *primers* utilizados para DNA del cinetoplasto, se han propuesto aquellos que amplifican contra dominios muy conservados de los microcírculos de kDNA, como son lo llamados: S35/S36, CV1/CV2 y TC1/TC2, entre otros; o bien, se han utilizado secuencias repetidas flagelares BP1/BP2 (Virreira, 2003); al respecto, la OMS plantea el uso de la PCR para el diagnóstico con ciertas limitaciones como son el caso de seguimiento de paciente tratado y de transmisión transparentaria donde en ambos casos se requiere utilizar 2 pruebas (http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf).

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es necesario para la detección, confirmación y monitoreo de individuos infectados o enfermos (UNAM-SSA-OPS-OMS, 2006). Debido al comportamiento del parásito y la reacción inmunológica que genera en el hombre, los métodos para diagnosticar la enfermedad se dividen en parasitológicos e inmunológicos. El método se deberá seleccionar según la fase clínica de la enfermedad.

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Son empleados ante la sospecha de fase aguda.

Tabla 5
Métodos Parasitológicos

Método	Forma Diagnóstica	Fase Clínica	Reactivos
Examen directo, gota gruesa y frote sanguíneo	Tripomastigotes sanguíneos	Aguda	Giemsa
Xenodiagnóstico	Tripomastigotes, Epimastigotes	Aguda	Triatomino libre de infección
Hemocultivo	Epimastigotes	Aguda, Crónica	Medio de cultivo (NNN y LIT)
Histopatológico	Amastigotes	Crónico	Corte histológico

(Modificado de CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra, 2002).

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Se utilizan para evidenciar la presencia de anticuerpos generados por el huésped, producto de la respuesta inmune o bien, la presencia de antígenos parasitarios. Están indicados para el diagnóstico durante las fases indeterminada y crónica. La OPS/OMS los clasifica en convencionales y no convencionales.

Tabla 6
Métodos Convencionales

Prueba	Utilidad	Componente	Antígeno utilizado	Características
HAI	Confirmación, investigación epidemiológica, seguimiento	Ig	Fracciones antigénicas de lisado parasitario	Lectura visual Subjetiva
IFI	Confirmación y seguimiento	Ig	Parásito completo	Lectura visual subjetiva
ELISA	Confirmación, control de sangre a trasfudir investigación epidemiológica y seguimiento	Ig o Ag. parasitarios	Fracciones antigénicas de lisado parasitario	Lectura en espectrofotómetro (DO).Lectura Cuantitativa

(Modificado de: CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra, 2002).

NO CONVENCIONALES

Tabla 7
Métodos no convencionales

Prueba	Utilidad	Componente	Antígeno	Sensibilidad y especificidad
ELISA	Investigación epidemiológica, Seguimiento, Confirmación	Ig	Recombinantes, péptidos, sintéticos	Buena especificidad con posibilidad de pérdida de sensibilidad
PCR	Investigación epidemiológica, Seguimiento	ADN	Utilizan <i>primers</i>	Buena especificidad con posibilidad de pérdida de sensibilidad
Western-blot	Investigación epidemiológica, Seguimiento	Ig	Lisado, Proteínas purificadas.	Buena especificidad con posibilidad de pérdida de sensibilidad

(Modificado de: CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra, 2002).

1.9 Generalidades del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

Algunos inmunoensayos están basados en la reacción selectiva de un anticuerpo con un Antígeno (AG-AC), esta unión puede evidenciarse por medio de reacciones enzima-sustrato, que permiten obtener un producto coloreado cuantificable (Voller, 1975). Estos inmunoensayos se pueden dividir en heterogéneos y homogéneos. En los heterogéneos uno de los agentes antígeno o anticuerpo es inmovilizado en un soporte sólido (placas de poliestireno por ejemplo); debido a la naturaleza del soporte, requieren en su metodología de lavados para impedir reacciones inespecíficas. En un ensayo homogéneo, la inmunoreacción se lleva a cabo en un líquido o solución; es decir, ni el antígeno ni el anticuerpo se encuentran fijos por lo que no se requieren lavados; sin embargo, esta reacción es más propensa a uniones inespecíficas. Por lo tanto los ensayos heterogéneos tienen una mayor aplicación y uno de los más usados es la técnica de ELISA. La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas es utilizado para demostrar la presencia o ausencia de un antígeno o un

anticuerpo. Esta metodología tiene varios fundamentos de los cuales destaca la capacidad de las proteínas para adherirse a polímeros sólidos y en la unión covalente de los anticuerpos a enzimas. Esta técnica, actualmente es considerada una herramienta primordial en el serodiagnóstico de las enfermedades infecciosas. En la tabla 8 se muestran los antecedentes y principales modificaciones de la técnica de ELISA.

Tabla 8
Antecedentes, modificaciones y aplicaciones de la técnica de ELISA

1960 Solomons Rosalyn	y	Desarrollan el radioinmunoanálisis (RIA) por medio del Iodine 123 para cuantificar insulina en plasma.
1966 Wide y Porath		Implementan la inmunoadsorción. Eliminan los excesos de antígeno y anticuerpo con lavados; establecen la necesidad de fijar alguno de estos a un soporte.
1966-1969 Avrameas y Pierce		Por el riesgo a la salud que implica manejar compuestos radioactivos, buscan un componente señal no radioactivo como donador colorimétrico; para esto realizan el acoplamiento entre antígeno-anticuerpo en un sistema enzima sustrato (fosfatasa alcalina, EC 3.1.3.).
1971 Perlmann y Engvall		En Suecia desarrollan la metodología y procedimiento de ELISA, realizaron la primera medición cuantitativa de IgG en suero de conejo con fosfatasa alcalina.
1971 van Weemen y Schuurs		Con técnica de EIA cuantifican gonadotropina coriónica en orina con peroxidasa de rábano, EC.1.11.17.
1971-1975 Voller		Se estandariza la técnica para la detección de metabolitos y microorganismos patógenos (amibiasis, esquistosomiasis y malaria).
1975 Voller		Utiliza por primera vez la técnica de ELISA para la búsqueda de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en pacientes de Bahía en Brasil.

(Modificado de:Lequin, 2005).

1.10 Técnica de ELISA indirecta en microplaca

En esta técnica el antígeno o el anticuerpo se fija en un soporte solido, debido a que ambos tienen la capacidad de realizar una adsorción pasiva a distintos materiales como pueden ser tubos, perlas, discos, peines o microplacas, ya sea de nylon, nitrocelulosa, polivinilo,

polipropileno o poliestireno; esta adsorción pasiva se da por medio de una interacción hidrofóbica entre regiones no polares de la proteína y la matriz plástica no polar. La siguiente fase consiste en la adición del primer anticuerpo que en este caso se refiere a la incubación de los sueros problema para propiciar la reacción antígeno-anticuerpo y posteriormente se incuba el segundo anticuerpo o el conjugado que es una enzima unida covalentemente a un anticuerpo específico; al respecto, han sido probadas varias enzimas dentro de las que destacan principalmente aquellas con elevada actividad enzimática, que se puedan obtener en forma pura y posean una reacción con un sustrato fácilmente medible; las más utilizadas han sido la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la glucosa oxidasa y la betagalactosidasa.

El sustrato se elige dependiendo de la enzima y consta de dos agentes importantes: un oxidante que es el agente a reducir con pérdida de oxígeno y ganancia de electrones y un reductor que al oxidarse pierde electrones. El agente oxidante que se emplea puede ser peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o peróxido de urea.

Respecto al agente reductor, existen diversos cromógenos, los que más se emplean son el OPD (Ortofenilendiamina), ABTS (Sustrato de azidobenzotiazolidina), TMB (Tetrametilbencidina) y 4-Cl-1-Naftol (Cloronaftol).

Los sustratos deben ser compuestos aromáticos por la capacidad que tienen éstos de generar reacciones coloreadas; deben ser estables y solubles antes y después de la reacción. El sustrato-cromógeno debe ser inicialmente incoloro y fuertemente coloreado tras la reacción; esta coloración podrá ser medida en espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda (densidad óptica) dependiendo del cromógeno empleado, en el caso de la reacción con OPD se lee a 492 nm y con TMB a 450 nm.

1.11 Ensayo inmunoenzimático sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA)

La técnica de Dot ELISA es una técnica que ha sido utilizada durante los últimos 25 años; se ha descrito con gran importancia en el serodiagnóstico de algunas parasitosis, en la tabla 9 presenta algunos de los antecedentes y modificaciones de la técnica.

Tabla 9
Antecedentes, modificaciones y aplicaciones de la técnica de Dot-ELISA

1979	Towbin, reporta la transferencia de proteínas de geles de poliacrilamida a nitrocelulosa (Towbin, 1979)
1982	Hawkes, realiza una modificación a la ELISA utilizando nitrocelulosa con el segundo anticuerpo marcado con un isótopo radioactivo "Dot-Immunobinding"
1984	Papas estandariza la técnica de Dot-ELISA para el diagnóstico de Leshmaniasis visceral en humanos
1984	Flint, implementa esta técnica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas
1985	Araujo, emplea la técnica también para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas
1988, 1989	Hubsch, estandariza y propone la prueba de Dot-ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en estudios epidemiológicos en Venezuela.
1994	Lissaldo, utiliza antígenos solubles alcalinos, en la técnica de Dot-ELISA, para el diagnóstico en pacientes chagásicos

(Modificado de Hubsch, 1988).

La técnica de Dot-Elisa es una modificación de la técnica de ELISA convencional; a diferencia de ésta, se lleva a cabo en un soporte de nitrocelulosa. La diferencia más importante radica en el revelado del procedimiento donde, si se utiliza DAB (Diamino benzidina), al oxidarse forma un precipitado coloreado marrón. La intensidad de esta la coloración es proporcional a la reacción antígeno-anticuerpo, la interpretación de esta técnica es visual y cualitativa.

La Dot-ELISA, al ser comparada con otros procedimientos diagnósticos (HAI e IFI) presenta buena sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*; por otro lado, se enfatiza además su fácil ejecución, tiempos cortos de ejecución y bajo costo (Hubsch, 1988).

1.12 Iniciativas para el control de la enfermedad de Chagas.

Las iniciativas planteadas por la OMS a partir de 1991 para el control y la eliminación de la enfermedad de Chagas, según la 62ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD A62/17 2009 son las siguientes:

1- Iniciativa del Cono Sur. Inicia en 1991 con la participación de Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Bolivia y Paraguay; se realizó con el fin de mejorar el control de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, en el control de los vectores y el tratamiento de casos.

2- Iniciativa de los Países Andinos. Inicia en 1997 con la participación de Colombia, Ecuador, Perú y República Bolivariana de Venezuela; el objetivo de esta iniciativa fue atacar e interrumpir las vías de transmisión vectorial (*T. dimidiata*, *R. pallescens*, y erradicación del *R. prolixus*) y transfusional de la enfermedad de Chagas.

3- Iniciativa de los Países de Centroamérica. Inicia también en 1997, conformada por Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá con los mismos objetivos que la de los países andinos.

4- Iniciativa de los Países Amazónicos. Inicia en 2004 con la participación de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana (Guyana Inglesa), Perú y la República Bolivariana de Venezuela y Surinam (Guyana Holandesa).

A partir de 2005, la OMS clasifica a la enfermedad de Chagas, como parte de las enfermedades tropicales desatendidas; esto con el fin de fomentar acciones de promoción y medidas de control y a partir de 2007, crea una Red Mundial para la Eliminación de la

Enfermedad de Chagas conteniendo todas las iniciativas latinoamericanas existentes con la incorporación de varios países europeos (Bélgica, España, Francia, Italia, el Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte y Suiza), los Estados Unidos de América y el Japón.

Al respecto, México, ha adquirido compromisos Nacionales ante la OMS/OPS, con estrategias que se señalan en la 51ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD DEL 16 DE MAYO DE 1998 al declarar el compromiso para la “Eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas” para el final del año 2010 y en el 41^{er} CONSEJO DIRECTIVO DE LA 51ª SESIÓN DEL COMITÉ REGIONAL (RESOLUCIÓN CD41.R15) de octubre de 1999 respecto al "FORTALECIMIENTO DE LOS BANCOS DE SANGRE EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS", donde se insta a los Estados miembros a dar mayor prioridad a la seguridad de la sangre a transfundir, fortalecer la infraestructura de los bancos de sangre, garantizar la capacitación de los proveedores de servicios de salud y pide al Director cooperar con los Estados Miembros en fortalecer los programas de sangre, establecer las pautas para los requerimientos de la calidad de los bancos de sangre y de los componentes sanguíneos y además, de promover el tamizaje universal preciso y eficiente de las unidades de sangre (ANEXO 7).

Por otro lado, respecto al tamizaje de la enfermedad de Chagas, los Comités de Expertos de la OMS en 2006 señalan lo siguiente:

“A partir de diciembre de 2002, se recomendó el uso de una sola prueba de alta sensibilidad (ELISA). Las técnicas de ELISA representan una herramienta adecuada para el tamizaje de donantes, pero al mismo tiempo es importante considerar algunos puntos para mejorar la calidad del tamizaje: la mayoría de las pruebas ELISA utilizadas en Latinoamérica para el tamizaje de donantes pertenece a dos categorías: las que usan fracciones antigénicas del lisado parasitario y las que utilizan antígenos recombinantes o

péptidos sintéticos (en separado o mezclados). Hace falta establecer, a través de estudios multicéntricos, si el comportamiento de esas dos categorías de pruebas ELISA es semejante o si es preferible una asociación entre ellas para obtener mejores resultados en el tamizaje. Sin duda, las pruebas de HAI y de IFI, también son adecuadas para el tamizaje o como pruebas confirmatorias del ELISA. Existe una amplia gama de pruebas diagnósticas para detectar la infección por *T. cruzi*; sin embargo, no existen cifras confiables de la incidencia y prevalencia de la infección y la enfermedad". "Evaluar la conveniencia de utilizar una prueba rápida (inmunocromatografía) como tamizaje previo en situaciones de urgencia o en áreas donde la prevalencia serológica es alta y la donación es familiar o por reposición" (http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf).

2 JUSTIFICACIÓN

En México la problemática de la enfermedad de Chagas se concentra básicamente en la incapacidad financiera por parte del Sector Salud para establecer la cobertura en todos los centros de diagnóstico.

La OMS recomienda como primera elección la prueba de ELISA para su empleo en los diferentes centros de diagnóstico y propone evaluar el comportamiento de los antígenos empleados (fracciones antigénicas del lisado parasitario, recombinantes, péptidos sintéticos), ya que se ha demostrado que existen variaciones en los valores de sensibilidad y especificidad en estas técnicas según la región geográfica (Camargo, 1987, Umezawa, 1999, Verani, 2009). Esta variación de la sensibilidad y especificidad es atribuida principalmente a las características de heterogeneidad genética y fenotípica de los aislados, dependiendo de la región geográfica (Verani, 2009).

Las pruebas comerciales que utilizan antígenos recombinantes, anticuerpos monoclonales o péptidos sintéticos, tienen el inconveniente de aumentar los costos de producción y si bien incrementan la especificidad, presentan el riesgo de disminuir la sensibilidad, ya que se disminuye la oferta antigénica frente a sueros de pacientes que muestran un mayor repertorio de anticuerpos contra el parásito (De Lima, 2007).

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se evalúa un extracto antigénico a partir de cuatro aislados de diferentes transmisores del país con la finalidad de incrementar la versatilidad antigénica, para ser empleado en la Técnica de ELISA en microplaca y comparar a su vez, este reactivo antigénico para ser empleado en un sistema de Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-T.

cruzi en México con la finalidad primordial de reducir costos en producción y generar técnicas con buena sensibilidad y especificidad, utilizando un reactivo CHAGATEK, avalado por varios centros diagnóstico, por lo cual fue utilizado como “estándar de oro.

3 HIPÓTESIS

Si con el empleo de antígenos extraídos de un aislado regional se obtienen sensibilidad y especificidad adecuadas; entonces el empleo de una mezcla de antígenos, puede incrementar estos parámetros y ofrecer mejores resultados para su aplicación masiva en el serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar con técnicas de Dot-ELISA y ELISA un extracto antigénico soluble obtenido de cuatro aislados de *T. cruzi* de origen mexicano, para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* con fines diagnósticos y de reducción de costos.

5 OBJETIVOS PARTICULARES.

Obtener una mezcla de 4 extractos antigénicos a partir de aislados de *T. cruzi*, provenientes de diferentes regiones y transmisores del país.

- Identificar los componentes proteicos de los extractos antigénicos por peso molecular (SDS-PAGE).
- Evaluar la reactividad inmune de las fracciones proteicas con sueros testigo con anticuerpos anti-*T. cruzi* y normales (Western-blot).
- Evaluar la reactividad del extracto antigénico hacia pánenes de sueros de individuos con anticuerpos anti-*T. cruzi*, *L. mexicana* y normales con las técnicas de ELISA indirecta y Dot-ELISA para evaluar reactividad y cruce inmunológico.
- Determinar sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las técnicas de ELISA y Dot- ELISA, con ambos procedimientos.
- Evaluación de costos de ELISA, Dot- ELISA y CHAGATEK

6 METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos

Se emplearon cuatro aislados de *T. cruzi* los cuales pertenecen al cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM

Tabla 10
Características del extracto antigénico Ag: 4C-may-08.

Aislamiento	Aislada de	Procedencia	Código Internacional ¹
1986	<i>T. barberi</i>	La Cueva, Querétaro	ITRI/MX/1986/QRO
1991	<i>T. pallidipennis</i>	Tequesquitengo, Morelos	ITRI/MX/1991/TQ
2003	<i>T. dimidiata</i>	Xalapa, Veracruz	ITRI/MX/2003/XAL
2007	Humano	Tanchahuil, SLP	MHOM/MX/2007/Cristi

¹ CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. OMS, Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra, 2002. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf.

Se realizó el inóculo de los cuatro aislados de *T. cruzi* en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Triptose Medium) enriquecido (SFB 5%) en matraces Erlenmeyer; después de la siembra parasitaria, se incubaron en estufa a 28°C. Se determinó el momento de la cosecha, al final de la fase de crecimiento que se presentó al 7^a día después del inóculo. (ANEXO 1). Para la extracción antigénica, los parásitos se cosecharon después del tercer repique de cada aislado (Tabla 11):

Tabla 11
Expansión parasitaria en medio LIT

Inoculo (ml)	Volumen de LIT	Volumen final
25	75 ml	100ml
100	400 ml	500 ml
500	1 500ml	2 000ml

6.2 Extracción Antigénica

La extracción antigénica se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente por Bucio en 1999 con algunas modificaciones como se señala a continuación:

1- Después de la cosecha parasitaria, se realizaron cuatro lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 3500 (RPM) a 4° C durante 20 minutos en centrífuga de mesa refrigerada (Sorvall ® modelo RT 6000 D); se cuantificó la masa parasitaria pesada y se mezclaron los aislados en forma proporcional.

2- La masa parasitaria se re suspendió en una solución de TrisHCL 50 mM pH 7.4 (1/5) y se agregaron los inhibidores de proteasas (Roche ® No de catalogo 11836153001) en concentración de 500 µl/10 ml de muestra.

3-La lisis y fraccionamiento parasitario se realizó por sonicación mediante un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50); se aplicaron 7 pulsos a 40 watts en baño frío con hielo/etanol. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a 10 000 (RPM) por 30 min a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC 26 Plus)

4-El extracto antigénico se conservó en un tubo de 50ml a -40°C hasta posteriormente realizar la caracterización proteica.

5-La mezcla del extracto antigénico se denominó Ag: 4C-may-08, para su empleo en las técnicas de ELISA y Dot-ELISA.

6.3 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó con un reactivo comercial Pierce BCA (Pierce ® BCA Protein Assay Kit, Termo Cientific. Cat No. 23225), cuyo principio para la medición de concentración proteica (colorante/proteína),

cuantificada en espectrofotómetro se basa en el método del ácido bicinconínico (compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} previamente unidos a enlaces peptídicos en medio alcalino). (Tabla 12).

Tabla 12
Curva patrón con albumina sérica bovina (BSA)

REACTIVOS	DILUCIÓN								
	A*	B	C	D	E	F	G	H	I
PBS (µl)	-	125	175	325	325	325	325	400	400
BSA** (µl)	300	375	325	175 de B	325 de C	325 de E	325 de F	100 de G	-
Concentración final BSA (µg/ml)	2 000	1 500	1000	750	500	250	125	25	0

* - A-I: diluciones

** - BSA: 2 mg/ml

La concentración proteica de la muestra problema (Ag: 4C-may-08) se realizó en dilución 1:4, 1:5, 1:6 y 1:7. El procedimiento se determinó por triplicado en microplaca de poliestireno de 96 pozos. La lectura para cuantificar densidad óptica (DO) se midió en un espectrofotómetro para microplaca con filtro de 580 nm (Microplate reader Bio Rad * modelo 550). Las concentraciones finales se calcularon por regresión lineal con base en los valores (DO) obtenidos en la curva patrón.

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación por peso molecular de los componentes de los extractos antigénicos se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador al 12.5% con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% siguiendo en términos generales la metodología originalmente descrita por Laemmli en 1970, en un equipo de electroforesis (Mini Protean III®, Cell-Bio-Rad*) a una diferencia de

potencial constante de 150 Volts por 60 min aproximadamente, con una fuente de poder Bio-Rad* Modelo 200/2.0. Se usó amortiguador de corrimiento constituido o por 0.025 M Trizma-base (Tris hidroximetil aminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3.

Al realizar la corrida electroforética, el volumen de muestra se ajustó para contener aproximadamente 30 µg de proteína por carril en un amortiguador de muestra comercial (Bio-Rad* No. cat 161-0737). Se emplearon marcadores de peso molecular comerciales con rango entre 15 y 250 kDa (Bio-Rad*). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R -250 (Sigma*) (ANEXO 2).

6.5 Electroinmunotransferencia (Western-blot)

Se realizó siguiendo en términos generales el procedimiento descrito por Towbin en 1979. Después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial constante de 15 volts durante 30 minutos. Una vez concluida la transferencia, la nitrocelulosa fue bloqueada con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 3 lavados y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi* y normales en dilución 1:200 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG humana unido a peroxidasa (Zymed, Cat. No. 62-8420) en dilución 1:20 000, durante 2 hrs a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 5 lavados y se reveló la reacción con el sustrato correspondiente DAB (3,3' Diaminobenzidina) (Bio-rad *, Cat. No. 170-6535) en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se frenó

con agua destilada, las membranas fueron secadas y guardadas a temperatura ambiente (ANEXO 3). Los sueros testigo utilizados en la estandarización del procedimiento fueron un reactivo alto (R+++), elaborado con una mezcla de sueros reactivos a *T. cruzi* con D.O. alta previamente titulados y otro no reactivo (NR) proveniente de un solo suero no reactivo a *T. cruzi* con 3 procedimientos diagnósticos diferentes.

6.6 Paneles de sueros humanos

Para la evaluación de los procedimientos se utilizó un panel que forma parte de la seroteca del Laboratorio de Biología de Parásitos, integrado por 88 sueros reactivos y 88 sueros no reactivos de individuos procedentes de diferentes áreas geográficas del país, constituyendo así una muestra representativa nacional. Estos sueros fueron caracterizados al presentar concordancia entre el Instituto “Dr. Mario Fatała Chaben” de Argentina (Centro de Referencia OPS/OMS) y por el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM con las técnicas de ELISA, HAI e IFI y posteriormente además con un reactivo comercial “CHAGATEK” ELISA, el cual, para realizar el análisis estadístico en el presente trabajo, fue considerado como estándar de oro. Para evaluar cruce inmunológico se utilizaron sueros de individuos con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.7 Inmunoensayo con el reactivo comercial “CHAGATEK ELISA”

Se determinó la reactividad del panel de sueros con el reactivo comercial CHAGATEK microELISA (CHAGATEK BIOMÉRIEUX ARGENTINA S.A).

Siguiendo las instrucciones señaladas por el fabricante.

Se determinó el título de corte (cut-off) con base en las lecturas (DO) del control negativo de la siguiente forma:

Título de corte= promedio densidad optica (DO) de los controles negativos
+.100.

El valor de fue de: 0.130 y 0.179 (DO).

Para determinar la reactividad o no reactividad de una muestra de suero fue considerado lo siguiente:

No reactiva si su DO es inferior al valor del título de corte.

Reactiva si su DO es igual o superior al valor del título de corte.

*CHAGATEK ELISA presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad superior al 99%, según lo señala el fabricante.

6.8 Estandarización del procedimiento de la Técnica de ELISA en microplaca

Se siguió, en términos generales el procedimiento inicialmente propuesto por Voller en 1975 con algunas adaptaciones y modificaciones (ANEXO 4). Se utilizaron los sueros testigo descritos previamente como reactivo alto (R+++), reactivo bajo (R+) y no reactivo (NR) en dilución 1:200. Cada dilución fue colocada por cuadruplicado. Se realizó la técnica siguiendo el procedimiento como se señala en el (ANEXO 4).

Titulación antigénica: El extracto antigénico se preparó sobre microplacas en diluciones de 1:300 a 1:800 como se muestra en la Fig.7:

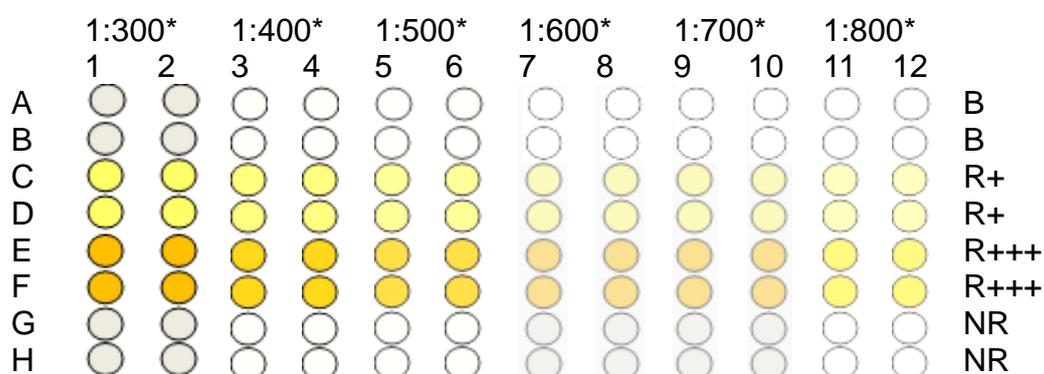


Figura 7 - Titulación antigénica.

*- Dilución antigénica (4C-may-08)

B-Blanco, Sueros

R+, Reactivo bajo a *T.cruzi*, R+++ , Reactivo alto a *T.cruzi*, NR-Negativo a *T.cruzi*

Titulación del conjugado (segundo anticuerpo):

Se realizaron dos titulaciones del conjugado; inicialmente una titulación gruesa tomando en consideración la recomendación del proveedor comercial y posteriormente una segunda titulación fina como se muestra en la Fig.8:

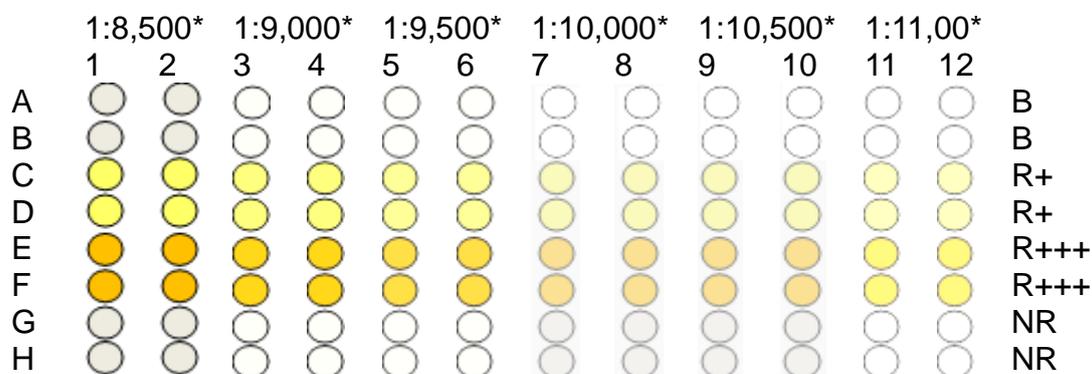


Figura.8 - Titulación del segundo anticuerpo

*- Dilución del segundo anticuerpo

B-Blanco, R+- Suero Reactivo bajo a *T.cruzi*, R+++ - Reactivo alto, NR-No Reactivo a *T.cruzi*

Para estandarizar el procedimiento, se seleccionaron las diluciones que mostraron valores para sueros con reactividad alta en el rango de densidad óptica

(DO) comprendido entre 0.400 y 0.700, para sueros de reactividad baja entre $0.200 \pm 10\%$ y para sueros no reactivos menores a 0.050.

Se corroboró el título de corte con el valor promedio de los valores obtenidos con sueros reactivos y normales + 2 y 3 desviaciones estándar (S_n-1) (Cura, 1994), para posteriormente realizar la técnica con las muestras del panel para la evaluación correspondiente.

6.9 Evaluación de ELISA indirecta en microplaca con el panel de sueros

Se utilizaron los sueros testigo descritos previamente como reactivo alto (R+++), reactivo bajo (R+) y no reactivo (NR) en dilución 1:200.

La titulación del extracto antigénico se definió para ser empleado en dilución 1:600 y el conjugado en 1:9 500. Los títulos de corte para determinar sueros reactivos, se consideró en valores mayores o iguales a 0.180 (D.O.); la zona gris o dudosa se estableció en valores comprendidos entre 0.179 y 0.160 (D.O.) y lecturas menores o iguales a 0.159 (D.O.) se consideraron como no reactivas; en estas condiciones se realizó la evaluación de los procedimientos con el panel de sueros correspondientes. También se evaluó cruce antigénico con sueros reactivos a *Leishmania mexicana*.

6.10 Estandarización del procedimiento de la Técnica de Dot-ELISA

La técnica se realizó siguiendo la metodología originalmente planteada por Flint en 1984 y Araujo en 1986 con algunas modificaciones (ANEXO 5).

Se utilizaron los sueros testigo descritos previamente en la técnica de ELISA definidos como reactivo alto, (R+++), reactivo bajo (R+) y no reactivo (NR) en

dilución 1:200. La técnica de Dot-ELISA, se realizó con membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL nitrocellulose membrane ® RPN303D), con poro de 0.45 µm cortadas con sacabocado de 6 mm de diámetro. Para evitar contaminación, el procedimiento se realizó colocando los discos en placas de poliestireno de 48 pozos de fondo plano con tapa (Costar ® 3548) (ANEXO 5).

Titulación antigénica

Las membranas de nitrocelulosa fueron sensibilizadas con el extracto antigénico en concentración de 4, 2 y 1 mg/ml.

Se definió la dilución de sueros y antígeno que mostró la mejor reactividad con base en diferencia de color entre muestras reactivas y no reactivas.

Finalmente, la titulación antigénica fue de 2mg/ml. El conjugado inicialmente se utilizó en dilución 1:20 000 con base en su empleo previo en la electroinmunotransferencia.

Titulación de sueros y conjugado

La titulación del conjugado se realizó con base en la reactividad mostrada en las diluciones 1:10 000, 1: 7 500 y 1:5 000 y de los sueros en las diluciones entre 1:100 y 1:500 con intervalos de 100 en 100.

6.11 Evaluación de Dot-ELISA con el panel de sueros

El procedimiento finalmente, se estandarizó para ser empleado con el antígeno en concentración de 2mg/ml y los sueros y conjugado en dilución 1:200 y 1:5 000, respectivamente.

La evaluación de reactividad o no reactividad de las muestras del panel, mediante la técnica de Dot-Elisa, se determinó con la concordancia de 2 observadores. También se evaluó cruce inmunológico con sueros reactivos a *Leishmania*

mexicana.

6.12 Análisis estadístico

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (Cura y Wendel, 1994), los cuales se definen como:

Sensibilidad (S): Proporción de muestras positivas (reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada.

Especificidad (E): Proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada.

El cálculo de los valores predictivos positivo y negativo se realizó con Intervalos de Confianza de 95% y se definen como:

Valor Predictivo Positivo (VPP): Probabilidad de estar infectado que tiene un individuo, cuando el resultado de la prueba ha resultado reactivo.

Valor Predictivo Negativo (VPN)= Probabilidad que tiene un individuo de no tener la infección cuando el resultado de la prueba es no reactivo.

Para realizar el análisis de estos valores se construyó una matriz de contingencia según se muestra a continuación:

		ESTÁNDAR DE ORO (EO)	
		+	-
PRUEBA A EVALUAR (PE)	+	VP a	FP b
	-	FN c	VN d

Donde:
VP (a): Verdaderos positivos (Reactivo con ambas pruebas)
FP (b): Falsos positivos (No reactivo con EO y Reactivo con PE)
FN (c): Falsos negativos (Reactivo con EO y No Reactivo con PE)
VN (d): Verdaderos negativos (No Reactivo con ambas pruebas)

Con las reactividades mostradas del panel de sueros con el estándar de oro (CHAGATEK) y las pruebas a evaluar (ELISA en microplaca y Dot-ELISA), se realizaron los cálculos de los siguientes parámetros:

- **Sensibilidad = $\frac{VP}{VP + FN} \times 100$**
- **Especificidad = $\frac{VN}{FP + VN} \times 100$**
- **VPP = $\frac{VP}{VP + FP} \times 100$**
- **VPN = $\frac{VN}{FN + VN} \times 100$**

6.13 Prueba de concordancia *Kappa*

Para medir la concordancia de resultados entre los resultados de las pruebas, se calculó el Índice Kappa por medio del programa estadístico “EPIDAT” (Epidat 3.1: Análisis epidemiológico de datos tabulados).

Para evaluar las pruebas ELISA y DOT-ELISA frente a CHAGATEK (estándar de oro) se valoró la concordancia de resultados usando el mismo panel de sueros.

Prueba	Prueba de referencia		Total
	+	-	
+	A	b	a+b
-	C	d	c+d

El índice *Kappa* (*k*) se valora de la siguiente forma: (Cura, 1999).

Tabla 13
Clasificación del índice *Kappa*

Valor de <i>k</i>	Concordancia:
< 0.20	Deficiente
0.21-0.40	Regular
0.41-0.60	Moderada
0.61-0.80	Buena
0.81-1.00	Muy buena

6.14 Análisis de costos

Se compararon los costos de los reactivos y materiales empleados en las técnicas de ELISA, Dot-ELISA y CHAGATEK mediante cotización en moneda nacional a partir de noviembre del 2009 hasta marzo del 2010. No se incluyeron costos y mantenimiento de los equipos requeridos así como tampoco los salarios del personal capacitado para realizar los procedimientos.

*Bio-Rad Hercules, C.A. USA.

*Sigma-Aldrich, Co. 3050 Supre Street, St. Louis, M.O.USA

*Zymed, Invitrogen Co. 1600 Faraday Avenue.Carlsbad C.A. USA

*CHAGATEK microELISA: CHAGATEK BIOMÉRIEUX ARGENTINA S.A. Av. Congreso 1745 C1428
Buenos Aires-Argentina.

7 RESULTADOS

7.1 Rendimiento parasitario y proteico

A partir del volumen final de 8 000 ml de medio de cultivo LIT, se obtuvo la masa parasitaria para realizar la extracción antigénica. Al extracto antigénico obtenido se le determinó la concentración de proteínas totales para determinar finalmente el rendimiento proteico:

Tabla 14

Rendimiento parasitario y proteico

Cultivo (ml)	Masa parasitaria (g)	Vol. de Ag. (ml)	Concentración proteica (mg/ml)	Rendimiento Proteico (mg)
8 000 ml	7.75	45.5	8.337	379.333

7.2 Electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)

En la corrida electroforética, se determinaron los componentes proteicos con mayor relevancia identificando un total de 10 proteínas con pesos moleculares de 90, 85, 65, 46, 43, 38, 34, 32, 27, 25 y 18 kDa según se muestra a continuación (Figura. 9)

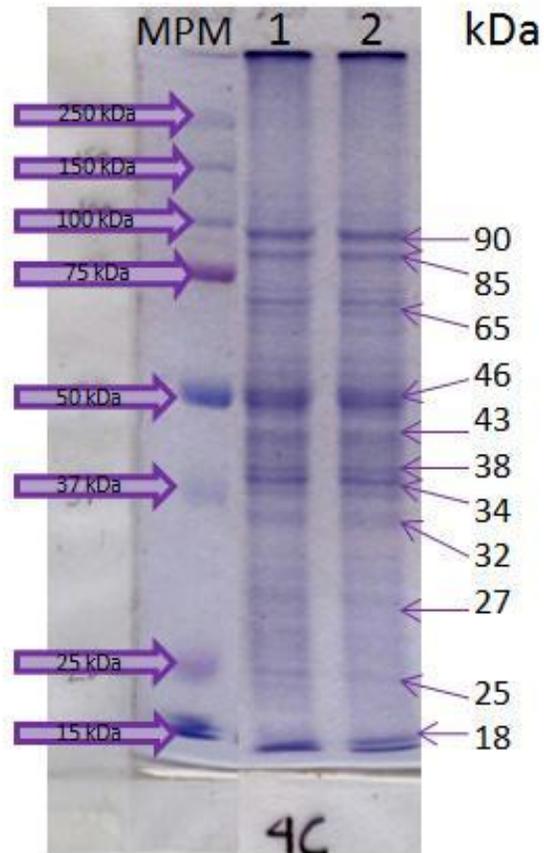


Figura 9 - Electroforesis del extracto antigénico (SDS-PAGE 12.5%)

MPM - Marcador de pesos moleculares

Carriles 1 y 2 - muestra por duplicado del extracto antigénico (30 µg/carril)

Tinción con azul de Coomassie

7.3 Electroinmunotransferencia

Después de la corrida electroforética, se determinó la reactividad inmune del extracto antigénico. Respecto al suero testigo reactivo alto a *T.cruzi*, se aprecia mayor relevancia en 11 componentes con pesos moleculares de 250, 212, 72, 64, 34, 31, 30, 29, 28, 27, 25, y 18 kDa. El suero testigo no reactivo, no mostro reactividad ante ningún componente (Figura. 10.).

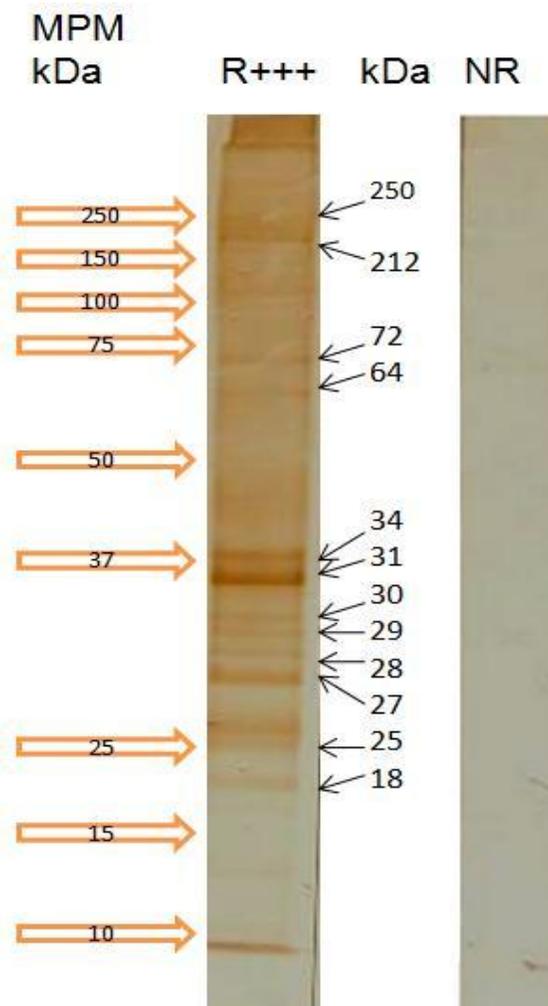


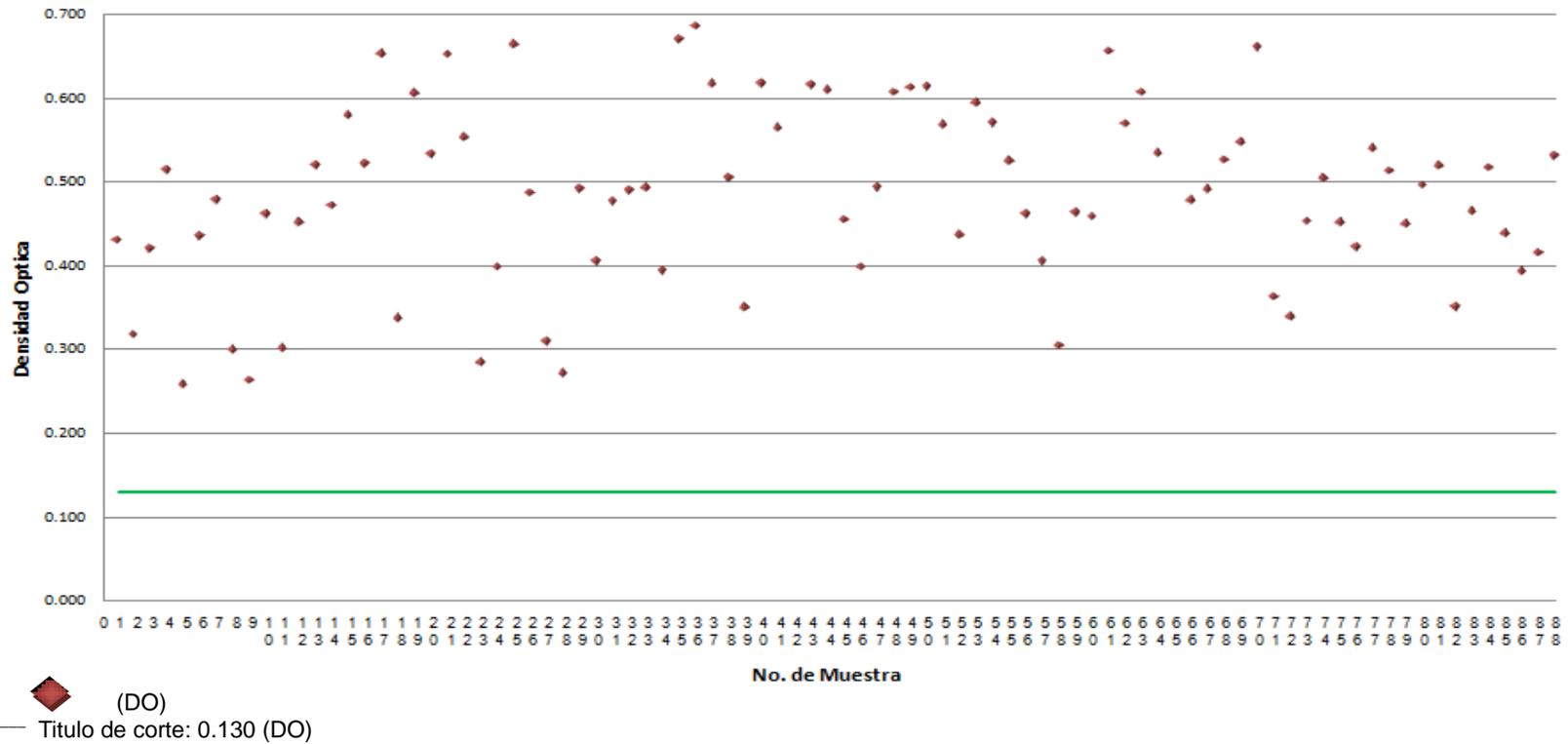
Figura10 - Electroinmunotransferencia del extracto antigénico

MPM - Marcador de pesos moleculares
R+++ - Suero testigo reactivo alto
NR - Suero testigo no reactivo
Revelado con DAB

7.4 Determinación de la reactividad de los sueros con el reactivo comercial

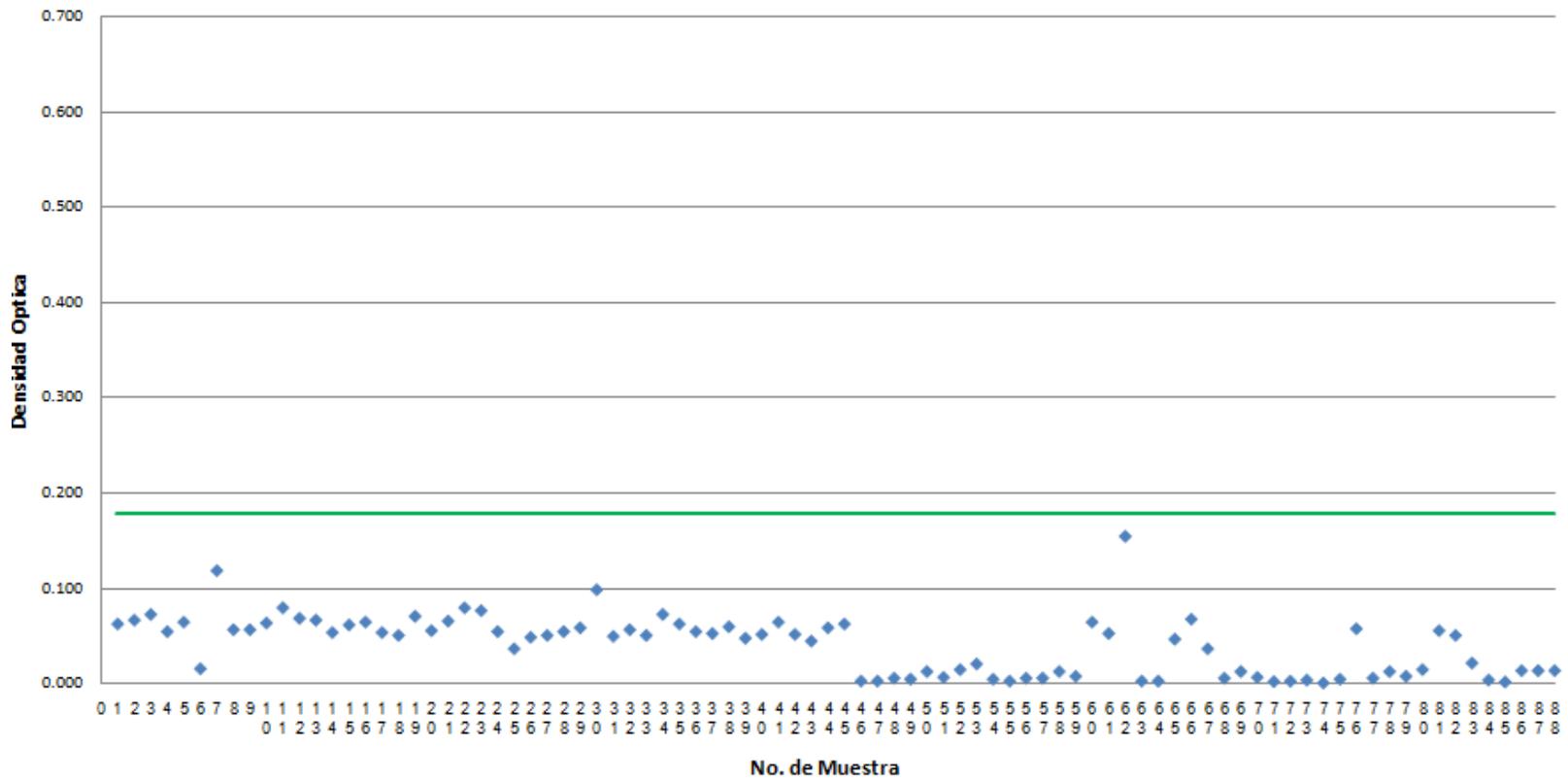
Se determinó la reactividad del panel con el reactivo CHAGATEK. Se realizaron dos ensayos; en el primer ensayo se caracterizaron los 88 sueros reactivos (DO igual o mayor de 0.130) los cuales presentaron concordancia con la caracterización previa (Argentina- UNAM), en todas las muestras (Grafica 1).

Grafica 1- Reactividad del panel de muestras positivas con el reactivo CHAGATEK



En el segundo ensayo se caracterizaron los 88 sueros no reactivos (DO menor a 0.179) los cuales presentaron concordancia con la caracterización previa (Argentina-UNAM) en todas las muestras (Grafica 2).

Grafica 2- Reactividad del panel de muestras negativas con el reactivo CHAGATEK

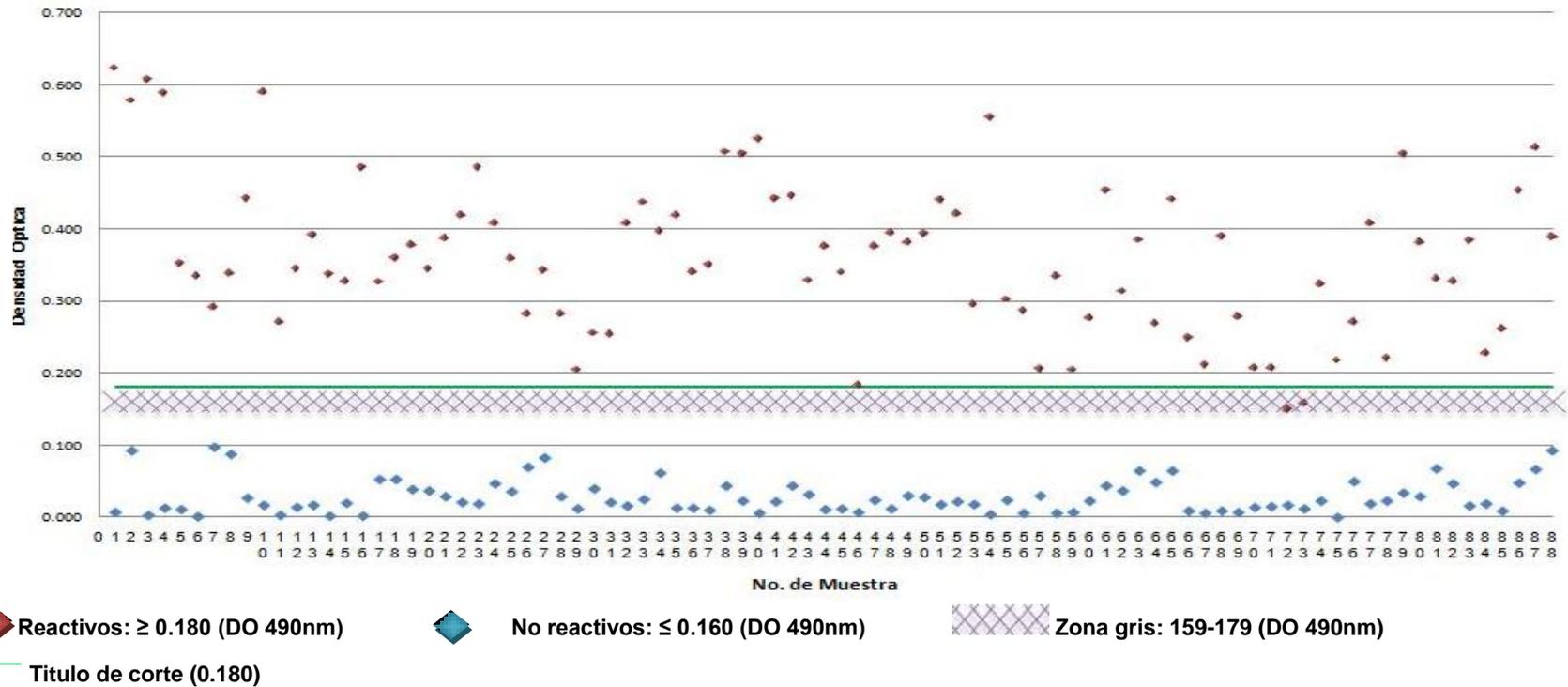


◆ (DO) — Título de corte: 0.179 (DO)

7.5 Evaluación con la técnica de ELISA indirecta en micro placa

Se evaluó la reactividad del panel de muestras positivas y negativas, con la técnica de ELISA indirecta; en la cual las densidades ópticas obtenidas se aprecia concordancia de reactividad en todas las muestras no reactivas, y en 76 de las reactiva. Cabe destacar que las muestras 71 y 72 pertenecientes al panel de positivos, se encuentran ubicadas en la zona gris (dudoso) (Grafica 3).

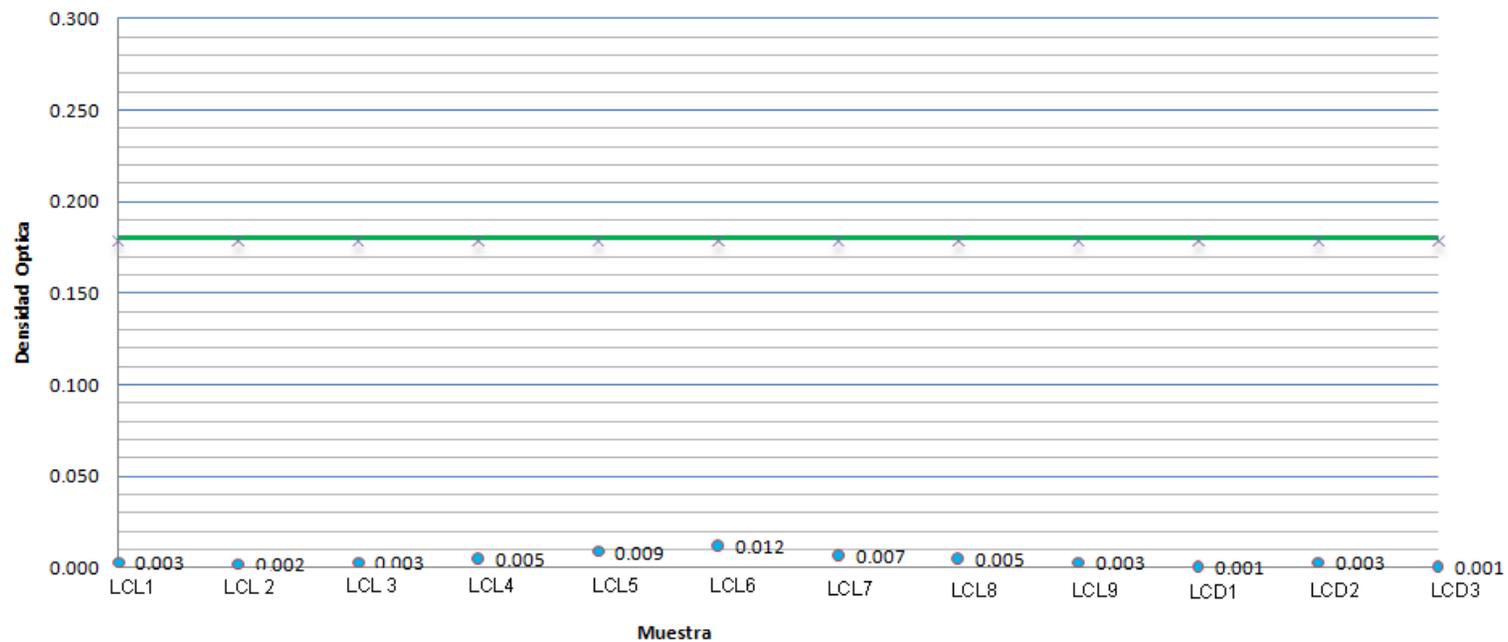
Grafica 3- ELISA indirecta en micro placa Ag: 4C-May-08.



7.6 Evaluación con la técnica de ELISA con sueros reactivos a *Leishmania mexicana*

Se evaluó la reactividad cruzada del antígeno Ag: 4C-May-08. Todos los sueros mostraron densidades ópticas dentro del rango considerado de no reactividad, con lo que se determina que no existe cruce inmunológico con *L. mexicana* en ninguno de los sueros (Grafica 4).

Grafica 4. ELISA indirecta (D.O.) con el panel de sueros reactivos a *L. mexicana*



No reactivos: ≤ 0.160 (DO 490nm) **Zona gris: 159-179 (DO 490nm)** **Titulo de corte (0.180)**

LCL 1-9: muestras de individuos con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea localizada
LCD 1-3: muestras de individuos con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea diseminada.

7.7 Evaluación con la técnica de Dot ELISA

Se evaluó la reactividad del panel de muestras positivas, por medio de la técnica de Dot-ELISA, considerándose positivo aquel que mostrara una intensidad de color similar al reactivo alto o bajo, todos los discos con excepción de los controles negativo y blanco presentaron coloración, esto fue corroborado por dos observadores, es importante destacar las muestras 71 y 72 se observó presencia de coloración a diferencia de los resultados con ELISA indirecta, las cuales las ubica en zona gris.

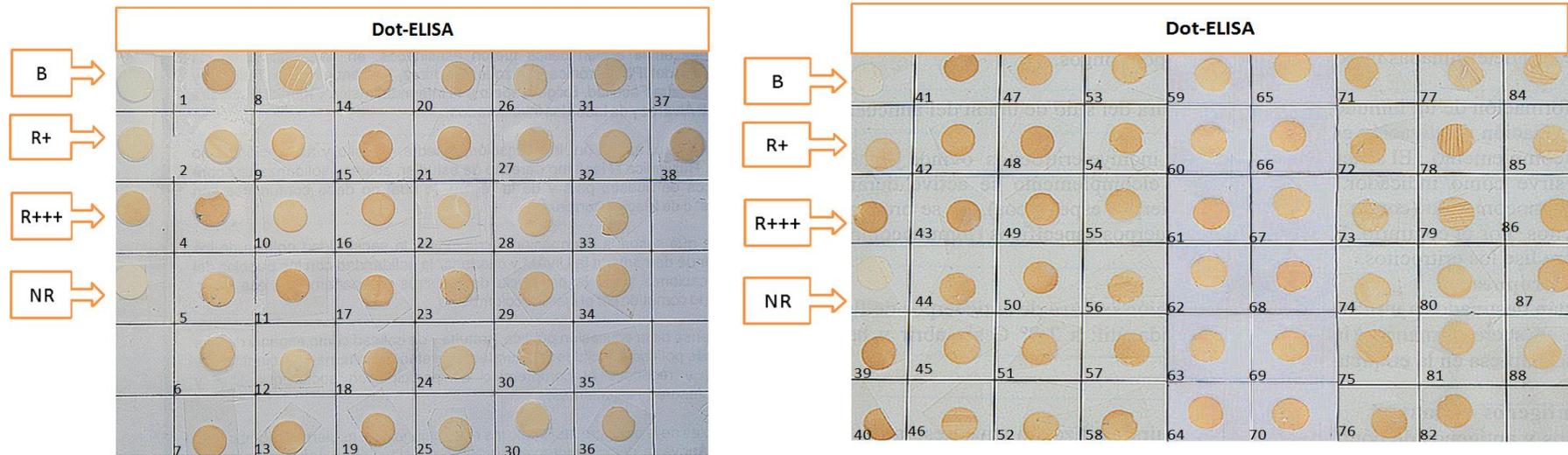


Figura 11 - Discos de nitrocelulosa con obtenidos con el panel de sueros positivos. B- Blanco, R+ Reactivo bajo, R+++- Reactivo alto, NR- No reactivo. Antígeno Ag: 4C-May-08: 2mg/ml, Conjugado 1:5000, Sueros 1:200. Revelado con DAB.

Se evaluó la reactividad del panel de muestras, por medio de la técnica de Dot-ELISA, considerándose positivo aquel que mostrara una intensidad de color similar al reactivo alto y bajo, ninguna muestra mostro coloración relevante en excepción de los controles alto y bajo. Esto fue corroborado por dos observadores, se observo una correlación total con los resultados obtenidos en ELISA indirecta.

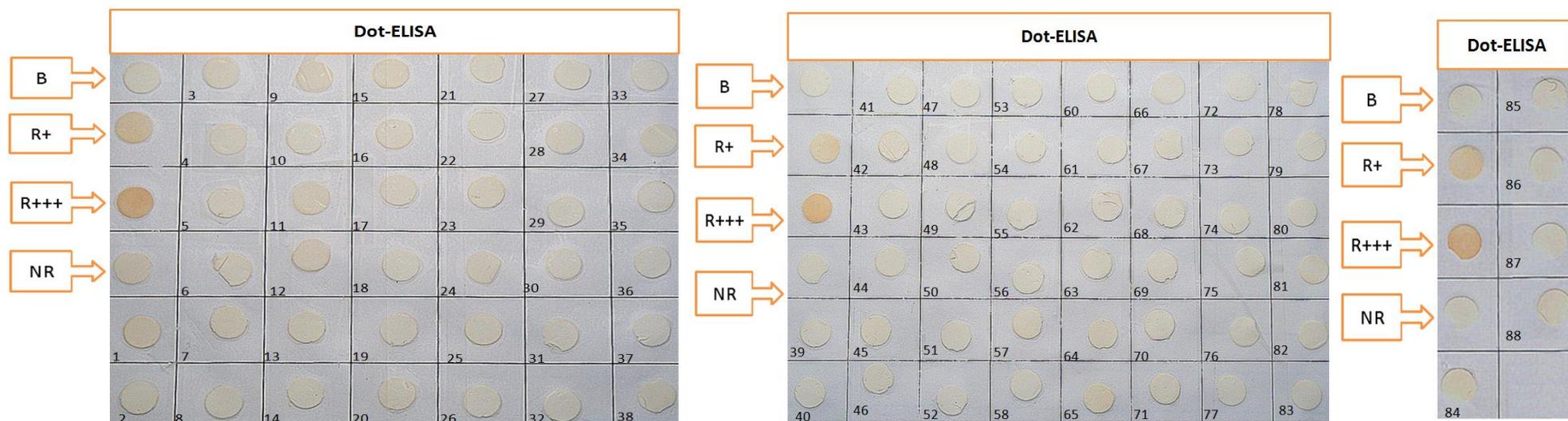


Figura.12 - Discos de nitrocelulosa con panel negativos.B- Blanco, R+ Reactivo bajo, R+++ Reactivo alto, NR- No reactivo. Antígeno Ag: 4C-May-08: 2mg/ml, Conjugado 1:5000, Sueros 1:200. Revelado con DAB.

7.8 Evaluación con la técnica de Dot ELISA con sueros reactivos a *L. mexicana*

Se evaluó la reactividad cruzada del antígeno 4C- por medio de la técnica de ELISA indirecta en la cual como se observa en la Figura 13, no hay coloración por lo que confirma al igual que en ELISA no hay reactividad cruzada con los antígenos de *L. mexicana*.

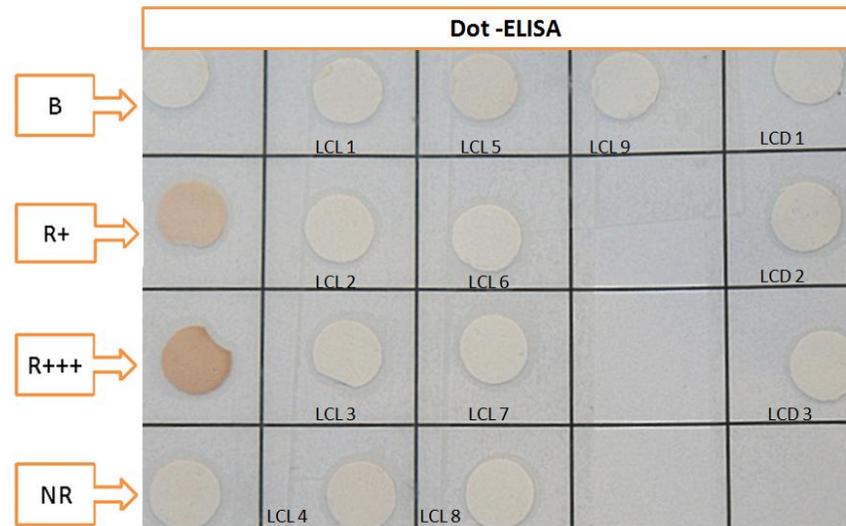


Figura.13 - Discos de nitrocelulosa con panel *Leishmania mexicana* .B- Blanco, R+ Reactivo bajo, R+++- Reactivo alto, NR- No reactivo a *T. cruzi*.LCL 1-9: muestras de individuos con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea localizada LCD 1-3: muestras de individuos con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea diseminada. Antígeno: 2mg/ml, conjugado: 1:5000, sueros 1:200, revelado con DAB.

7.9 Análisis estadístico

Se realizó una comparación entre el resultado serológico observado con el “estándar de oro” (CHAGATEK), para las pruebas de ELISA indirecta en microplaca y Dot-ELISA (Tabla 15a y 15b). La capacidad de ambas pruebas para clasificar a los individuos cuyos sueros son no reactivos que en realidad no están infectados por *T. cruzi* que corresponde a la especificidad fue del 100% para ambas pruebas. La capacidad de las pruebas de detectar a los individuo cuyos sueros son reactivos y que realmente estén infectados por *T. cruzi*, que corresponde a la sensibilidad fue de 100% para Dot- ELISA ligeramente mayor que la ELISA con 97.78%. Los valores predictivos, positivo y negativo que indican la probabilidad de que un individuo con resultado reactivo o no reactivo, realmente este infectado o no, mostraron que el VPP y VPN, en el caso de Dot-ELISA fueron de 100% y en el caso de la ELISA el VPP de 100% y el VPN de 97%.

Tablas 15a y 15 b
Matriz de contingencia para el análisis de las pruebas

Tabla 15a

ELISA	CHAGATEK	
	Positivos	Negativos
(Ag 4C-may-08)	86	0
	2	88
	Total 88	88

Tabla 15b

Dot-ELISA	CHAGATEK	
	Positivos	Negativos
(Ag 4C-may-08)	88	0
	0	88
	Total 88	88

Tabla 16
Cálculos de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos

ANTÍGENO (4C-may-08)	Dot-ELISA	ELISA
SENSIBILIDAD	100%	97.78 %
ESPECIFICIDAD	100%	100%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	100%	100%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	100%	97%

. I.C.

95%

Prueba de concordancia *Kappa*

Los valores obtenidos de concordancia entre pruebas, entre CHAGATEK/ELISA y Dot-ELISA muestran que ambas pruebas tiene concordancias muy buenas en el diagnostico con respecto al estándar de oro.

Tabla 17
Valores de concordancia entre Chagatek/ELISA indirecta y Chagatek/Dot-ELISA

CHAGATEK	
Dot ELISA	ELISA
1	0.97

7.10 Análisis de costos de los procedimientos de ELISA en microplaca y Dot-ELISA

Mediante la cotización de reactivos y materiales requeridos para realizar ambos procedimientos (ANEXO 6), se determinaron los requerimientos proteicos y de costos al considerar rendimiento proteico después de la extracción antigénica y a su vez la cantidad de proteína requerida para realizar cada procedimiento por prueba. Se presentan los costos por litro de medio de cultivo y por mg de proteína obtenida por litro y requerida por pozo/prueba y disco/prueba para realizar ambos procedimientos; al respecto, se puede apreciar que la técnica de ELISA convencional requiere aproximadamente de .00128 mg de proteína por prueba en comparación con la Dot-ELISA que requiere de .065 mg/prueba con costo de aproximadamente 2 centavos/prueba y 1.18 pesos/prueba respectivamente.

Tabla 18
Análisis de costos de producción del antígeno para ELISA y Dot-ELISA

	Proteína (mg)	Costo (\$ M.N.)
1 Litro de medio LIT	47.42	865.60
.021 de medio LIT	1	18.25
ELISA proteína/pozo	.00128	.0023
ELISA proteína/caja (96 pozos)	.122	2.20
Dot-ELISA proteína/disco	.065	1.18
Dot-ELISA proteína/44 discos	2.85	52.19

El análisis de costos (Anexo 6) según se muestra a continuación, señala un costo/prueba en, el reactivo comercial el cual resulta 5 veces más costoso en caso de realizarse 188 pruebas en una misma corrida, en comparación con la ELISA convencional; y tres veces más costosa para la Dot-ELISA, esta situación por lo general, no se presenta en la rutina cotidiana de la mayoría de los centros de diagnóstico, lo que implicaría realizar estas pruebas en diferentes tiempos con la necesidad de utilizar pozos para los sueros testigo en cada corrida, con el consecuente incremento en los costos señalados. (Tabla 19).

Tabla 19
Comparación de costos de las técnicas de ELISA, Dot-ELISA y CHAGATEK

	COSTO (\$ M.N.)					
	ELISA		Dot-ELISA		CHAGATEK	
	88 pruebas*	Pozo	44 pruebas**	Disco	188 pruebas***	Pozo
REACTIVOS	198.78	2.25	236.14	5.36	2 300.00	11.73
EXTRACTO ANTIGÉNICO	2.2	0.0023	52.19	1.186		
TOTAL (\$ M.N.)	200.98	2.26	288.33	6.54	2 300.00	11.73

* Placa de 96 pozos (8 pozos empleados para blanco y sueros testigo/duplicado)

** Placa de 48 pozos (4 pozos/disco empleados para blanco y sueros testigo)

*** 2 Placas de 96 pozos (4 pozos empleados para blanco y sueros testigo, en caso de realizarse el procedimiento en una sola corrida).

Nota: En este análisis, no se tomaron en consideración los salarios del personal involucrado en estas acciones

8 DISCUSIÓN

La problemática de la enfermedad de Chagas existe en gran parte del territorio nacional, tanto en zonas rurales como urbanas, y como en muchos países, aún no se han erradicado la transmisión vectorial, ni la transfusional. En laboratorios de diagnóstico clínico y bancos de sangre, los reactivos y procedimientos diagnósticos existentes para el diagnóstico de esta enfermedad, no siempre están disponibles. En la SSA, el tamizaje para la infección por *T. cruzi*, está contemplado normativamente, pero operativamente no ha sido de observancia obligatoria. Esta situación aunada a la historia natural de la enfermedad, donde se presenta una larga fase después de la infección con ausencia de síntomas específicos, hace que el diagnóstico donde se encuentra la mayor parte de individuos infectados, sea complicado, debido a que esta fase es clínicamente silenciosa, por lo que se requiere realizar detecciones oportunas.

Por lo anterior, se requiere en México realizar estudios epidemiológicos más amplios para detectar la infección por *T. cruzi*, no solo para determinar la magnitud de la prevalencia, sino para ofrecer un tratamiento oportuno y mejorar así la calidad y esperanza de vida de los individuos infectados.

Los grupos de expertos de la OPS/OMS, como producto de la experiencia de otros países, señalan la necesidad de continuar con estudios para evaluar los procedimientos diagnósticos, especialmente en cuanto al desempeño de los reactivos antigénicos.

Ante esta problemática, es necesario desarrollar estudios como el que se presenta en este trabajo, donde se evalúa el comportamiento de extractos

antigénicos y su uso en un sistema rápido y de bajo costo del tipo Dot-ELISA y ofrecer al país otra alternativa efectiva con fines de tamizaje y realizar la confirmación con los métodos convencionales.

T. cruzi es un organismo que presenta gran heterogeneidad genética y fenotípica (Verani, 2009), la cual puede ser la causa de las amplias variaciones observadas entre aislados y que básicamente se reflejan en cuanto a comportamiento en hospederos, perfil y composición antigénica (Andrade, 1981), crecimiento *in vitro*, cuadro clínico, susceptibilidad a fármacos (Miles, 1978) y patogenicidad y virulencia (Tafari, 1999, Tay, 1973, Salazar, 1975), variaciones en la concentración de carbohidratos totales que les otorgan propiedades inmunogénicas, (www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/018882-II/018882-II-19.pdf) y también variaciones regionales en cuanto a reactividad antigénica (Verani, 2009).

Por lo anterior en este trabajo se decidió utilizar una mezcla de 4 extractos antigénicos de lisados de epimastigotes de parásitos provenientes de 4 regiones geográficas del país y distintos vectores (Querétaro/*T. barberi*, Tequesquitengo/*T. pallidipennis*, Xalapa/*T. dimidiata* y un aislado de origen humano de un caso en fase aguda proveniente de San Luis Potosí), los aislados presentan variaciones en su composición porcentual de monosacáridos; en un trabajo realizado con los tres extractos obtenidos de vectores se encontró que Tequesquitengo presenta la cantidad más elevada de estos carbohidratos (González, 2008); esto se correlaciona a un trabajo previo donde se comprobó la concentración de carbohidratos totales con su capacidad inmunogénica (Bucio, 1999).

Los componentes inmunogénicos presentes en el extracto antigénico han sido reportados con anterioridad con importancia en el diagnóstico, la proteína de 72 kDa (GP72) presente en la superficie de epimastigotes, interviene en la diferenciación de estos en tripomastigotes metacíclicos (Araujo, 1986) en el transmisor, además ha sido propuesta como uno de los candidatos importantes para el diagnóstico con el inconveniente de presentar cruce inmunológico con *Leishmania* sp. Los componentes de 31, 25 y 18 kDa presentan también alta reactividad inmune especialmente el de 31 kDa previamente también habían sido descritos por nuestro laboratorio en los extractos antigénicos procedentes de Querétaro y Tequesquitengo, los cuales en este trabajo también se aprecian con reactividad inmune. La reactividad cruzada con *Leishmania* sp es muy común en los extractos antigénicos utilizados para el diagnóstico de esta enfermedad, el extracto antigénico utilizado en este trabajo no presenta este cruce inmunológico (Bucio, 1990) y de ahí que se haya obtenido la sensibilidad mostrada, esta característica es importante ya que en nuestro país existen áreas geográficas donde estos padecimientos son coendémicos.

Las evaluaciones de sensibilidad y especificidad para la técnica de Dot-ELISA han sido utilizadas desde 1988 en estudios seroepidemiológicos en Venezuela; en dicho estudio se comparó la eficiencia de la Dot-ELISA respecto a las técnicas de HAI e IFI y se concluyó que esta técnica puede ser una alternativa práctica para estudios seroepidemiológicos y determinar la infección por *T. cruzi* en países en desarrollo; además se plantea que la prueba de Dot-ELISA (con sensibilidad y especificidad adecuadas) puede ser útil en trabajos de campo por su practicidad, sencillez y facilidad de ejecución (Hubsh, 1988). En este trabajo, nuestros resultados son similares al comparar un mismo antígeno

con ambas técnicas (Dot-ELISA y ELISA) respecto al estándar de oro CHAGATEK.

La sensibilidad de las pruebas de Dot-ELISA e IFI, también fue comparada por Lissaldo en 1994, al utilizar soportes de celulosa donde plantea que la primera presenta mayor sensibilidad debido a que estos soportes se comportan con mayor rango de unión a proteínas (Lissaldo, 1994). En este trabajo, las variaciones en los valores de sensibilidad y valor predictivo negativo entre las pruebas de ELISA y Dot-ELISA, confirman lo anterior, debido a que el soporte de nitrocelulosa presenta mayor avidez por las proteínas que el poliestireno utilizado en la ELISA convencional; esta característica permitió confirmar la reactividad de las muestras 71 y 72, las cuales habían obtenido resultados en zona gris (dudosos) con la ELISA convencional.

Por otro lado, los resultados son cualitativos y dependen de la interpretación visual de un observador, lo cual podría considerarse la principal desventaja de estas pruebas de Dot-ELISA.

En el análisis de costos, se aprecia que el costo para realizar la prueba de Dot-ELISA es aproximadamente la mitad del costo del reactivo comercial y a su vez, del triple del ELISA convencional, por lo que se hace necesario valorar la conveniencia de utilizar estos procedimientos al considerar además del costo, el tiempo del procedimiento y si se cuenta con la infraestructura necesaria en el centro de diagnóstico ya que las técnicas de ELISA convencional y comerciales requieren de equipos costosos como son el espectrofotómetro para lectura de placas (Anexo 8).

Finalmente la comparación de los costos por prueba en las técnicas de Dot-ELISA, ELISA en microplaca y CHAGATEK, muestran la conveniencia de utilizar reactivos antigénicos nacionales.

9 CONCLUSIONES

1- El empleo del extracto antigénico regionales con las técnicas de Dot-ELISA como ELISA en microplaca, presento valores altos de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos, lo que le da a ambas, la característica de ser confiables para el serodiagnóstico.

2 - El extracto antigénico 4C-May-08 no presenta cruce inmunológico con sueros reactivos a *Leishmania mexicana*.

3- El análisis de costos mostró que ambas pruebas, tanto Dot -ELISA como ELISA, son factibles de realizar, la primera con fines de tamizaje y la segunda para tamizaje, detección y confirmación serológica.

4-El reactivo comercial CHAGATEK tiene un costo elevado para su empleo masivo, en comparación con las técnicas de ELISA convencional y Dot-ELISA.

5-La técnica de Dot-ELISA es económica, rápida y fácil de realizar ya que no requiere de personal altamente capacitado ni infraestructuras sofisticadas como es el caso de la ELISA en microplaca; por esta razón, puede ser propuesta como un candidato idóneo para su empleo en centros de diagnóstico con escasos recursos y con infraestructuras deficientes o para tamizaje en campo.

10 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados presentados, se hace factible proponer un análisis minucioso de costo-beneficio con estos reactivos nacionales, especialmente en bancos de sangre.

Realizar estudios con la técnica de Dot-ELISA en los cuales se utilice lectura cuantificada en soportes opacos como es el caso de la nitrocelulosa para cuantificar intensidad de color, con lo que se superaría el inconveniente respecto a la lectura subjetiva de un observador sin un sustento cuantificado, por lo que la evaluación de estas nuevas tecnologías podría dar continuidad a este trabajo de investigación.

ANEXO 1

PREPARACION DEL MEDIO LIT

Se pesan los siguientes reactivos:

	4 lt. (grs.)	1 lt. (grs)	800 ml (grs.)
NaCl	16	4	3.2
KCl	1.6	0.4	0.32
Na ₂ HPO ₄	16.8	4.2	3.36
Glucosa	8	2	1.6
Liver Infusion	20	5	4
Triptosa	20	5	4

Se adicionan al agua inyectable y se esteriliza a 121°C 45 min.

PREPARACION DEL MEDIO LIT COMPLEMENTADO

Añadir los siguientes reactivos:

- 10% de Suero Fetal de Bovino (GIBCO, No. de Catálogo 26140-079)
- Mezcla de antibióticos: 0.5% de Ampicilina-Estreptomicina (In Vitro No. de Catálogo A01. Stock: 10,000U/ug/ml en solución salina de NaCl al 0.85%)
- Hemina 1/200. (Merck, No. de catálogo H 2250)

PREPARACION DE LA HEMINA (5mg/ml)

-Pesar 0.5 grs de hemina y disolver en 100ml de NaOH 0.1N

-Esterilizar por filtración.

RESIEMBRA DE EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*

-A un tubo con 5 ml de medio de cultivo LIT complementado se adiciona 0.5 ml del cultivo stock.

-La resiembra y expansión se realiza cada 7 días.

ANEXO 2

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (GELES PEQUEÑOS)

(SDS-PAGE en Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD)

La muestra debe contener aproximadamente 30 µg de proteína.

GEL DE SEPARACIÓN:

CONCENTRACIÓN	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%
Acilamida / bis (ml)	2.5	3.75	5	6.25	7.5	10
Agua* (ml)	8.5	7.25	6	4.75	3.5	1
TRIS 1.5 M pH 8.8 (ml)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
SDS-10% (µl)	150	150	150	150	150	150

Mezclar y desgasificar 15 min al vacío o a 37°C / 10-15 min

PERS. AMON. 10% (µl)	1 75	2 75	3 75	4 75	5 75	6 75
TEMED (µl)	5	5	5	5	5	5

Mezclar suavemente

Añadir unas gotitas DE Alcohol iso-propilico en la superficie del gel y retirar con papel absorbente después de la polimerización.

El Persulfato de Amonio al 10% se prepara al momento.

GEL CONCENTRADOR (5%)

ACRILAMIDA / BIS	425 (µl)
AGUA*	2.275 (ml)
TRIS 0.5 M pH 6.8	400 (µl)
SDS-10%	31.25 (µl)

Mezclar y Desgasificar 15 min al vacío o a 37°C / 10-15 min

PERS. AMON. 10%	15.5 (µl)
TEMED	1.55 (µl)

La muestra se pone en ebullición durante 5 min con el amortiguador de muestra.

Realizar la corrida electroforética a 150 o 200 volts.

ANEXO 2.1

REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

ACRILAMIDA / BIS/ACRILAMIDA

- Pesar 29.2 g de acrilamida + 0.8 g de N'N'-Bis-Metil Acrilamida.
- Aforar a 100 ml con agua*, filtrar y cubrir con aluminio.
- Guardar a 4°C.

NOTA: La acrilamida sin polimerizar es neurotóxica por lo que se debe manejar con cuidado especialmente en piel.

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

- Pesar 13.61 g DE TRIS-BASE (TRIZMA BASE)
- Disolver en 40 ml de agua*
- AJUSTAR EL pH a 8.8 con 6N HCl
- Aforar a 75 ml
- Esterilizar y guardar a 4°C.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

- Pesar 6 g de tris-base
- Disolver en 80 ml de agua*
- Ajustar el pH a 6.8 con 6 n HCL
- Aforar a 100 ml con agua*
- Esterilizar y guardar a 4°C.

SDS-10%

- Pesar 1 g de SDS
- Disolver en agua estéril*
- Aforar el volumen a 10 ml.
- GUARDAR A 4°C.

BUFFER DE MUESTRA:

	2 x	8 x
- Agua (ml)	14.2	3.55
- Tris 0.5 m pH 6.8 (ml)	5	5
- Glicerol (ml)	10	10
- SDS 10% (ml)	8	8
- Azul de bromofenol 0.5% (ml)	0.8	0.8

β-mercaptoetanol: agregar 50 µl para cada 950 µl de muestra antes de usarse

Guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA 10X, pH 8.3

- Tris-base - 30.3 g
- Glicina -144 g
- SDS - 10 g
- Agua* -aforar a 1000 ml
- No ajustar pH con ácidos o bases
- Guardar a 4°C.

COLORANTE AZUL DE COOMASSIE

Azul de Coomassie (R-250)	0.1% en:
Ac. acético	10 ml
Metanol	40 ml
Agua*	50 ml

TEÑIR DURANTE 10 MIN.

SOLUCION. PARA DESTENIR EL GEL

Ac. Acético	- 10 ml
Etanol	- 15 ml
Agua *	- 75 ml

* AGUA DESIONIZADA ESTÉRIL

ANEXO 3

ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT en Trans-Blot Semi-Dry, BIO-RAD)

REALIZAR LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

Todo el procedimiento se realizará con cuidado de no tocar el gel ni la membrana de nitrocelulosa

EQUILIBRAR EN EL AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA A 4°C:

Geles de acrilamida durante 20-60 min.
Membranas y papeles filtro durante 5-10 min.

MONTAJE DEL "SANDWICH":

Desmontar el gel de la cámara de electroforesis y colocar las muestras cuidando de evitar la presencia de burbujas especialmente entre el gel y la nitrocelulosa:

Papel filtro
Gel
Membrana de nitrocelulosa
Papel filtro

TRANSFERENCIA:

Colocar las muestras en la cámara de transferencia con la membrana de Nitrocelulosa hacia la placa inferior y el gel hacia la superior.

Tapar la cámara y realizar la transferencia en un rango de 10 volts/30 min o 15 volts/15 min. Sin exceder de 25 volts (12 volts/22 min.)

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA pH 8.1-8.4*:

Tris base (25mM)	3.03 g
Glicina (192mM)	14.4
Metanol 20%(v/v)	200 ml
AFORAR A 1000 ml CON AGUA*	

* NO AJUSTAR EL pH CON ACIDOS NI BASES

Marcar la membrana y secarla entre 2 hojas de papel filtro.

BLOQUEO:

Con PBS/TWEEN 20 0.3% /leche descremada deshidratada 5% (DIFCO, 232100) durante 2 horas a t.a. en agitación ligera.

LAVADOS:

Realizar 2 lavados rápidos en agitación con pbs-tween 0.3%
Incubación de sueros:

INCUBAR A 4°C EN AGITACIÓN DURANTE LA NOCHE

Las diluciones se realizan en PBS/Tween 0.3%/leche 5%.

La dilución a emplear se definirá en diferentes concentraciones según el origen del suero a probarse.

en caso de tratarse de sueros humanos será en dilución entre 1:100-1:50 y en caso de sueros hiperinmunes (obtenidos en conejo o ratón) en dilución 1:500.

LAVADOS:

Lavados de 10 min. Cada uno con PBS-tween 0.3% A T.A. en agitación.

INCUBACION CON EL CONJUGADO

El conjugado se diluye en PBS-tween 0.3%.

La incubación se realiza durante 2 horas a t.a. en agitación ligera.

El conjugado deberá haber sido titulado previamente.

LAVADOS:

5 lavados de 5 min. Cada uno con PBS-Tween 0.3% A T.A. en agitación.

REVELADO DE LA PRUEBA CON EL SUSTRATO

CHLORO-1-NAPHTOL (4CN)

Tris HCl/NaCl 10 mM - 8.5 ml +
5.1 mg de chloronaphtol en 1.7 ml de METANOL FRIO
AGREGAR 5 µl de H₂O₂ al 30%

Tris HCl (10mM)/NaCl (0.14M) pH 7.5
Tris HCl 0.158 g
AGUA* 100 ml - ajustar pH a 7.5
NaCl 0.819 g
Esterilizar y guardar a 4°C

Colocar en oscuridad durante 15-30 min. En agitación ligera (T.A.).

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar.

Si se desea pueden conservarse en agua desionizada.

3,3, diaminobenzidina (dab) 50 - 25 mg

pbs ph 7.2 100 - 50 ml
h₂O₂ al 30% 50 - 25 µl

Colocar en oscuridad durante 15-30 min. En agitación ligera (t.a).

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar con agua desionizada estéril

ANEXO 4

TECNICA DE ELISA

ADSORCIÓN

La adsorción del antígeno se realiza sobre placas Costar, de fondo plano de alta densidad de poliestileno de 96 pozos. Se Incubó a 4 °C en cámara húmeda durante la noche.

A las 12 hrs, se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween.

BLOQUEO.

Se bloquearon los sitios inespecíficos de la placa con PBS-leche durante una hora
Se realizan 3 lavados.

ELISA INDIRECTA

Incubacion del primer anticuerpo

Se colocan los sueros controles positivos alto, bajo, negativo y sueros problema en dilución

Se incubó la caja 30 minutos a 37 °C.

Se lava tres veces

Incubación del segundo anticuerpo

Se agregó el conjugado Anti IGG Peroxidase Conjugate (ZIMED) en dilución en PBS Tween leche 30min a 37°C.

Se lavó 5 veces.

REVELADO

Al amortiguador de sustrato se le agregó o-Phenylenediamine (Sigma) OPD en Buffer citrato con 10 ul de peróxido.

Se detuvo la reacción a los 15 minutos con 100 µl/por pozo de SO₄H₂ 2.5N.

Se utilizo un micro lector de ELISA (Microplate reader Bio Rad modelo 550) a 490 y 595 nm.

ANEXO 4.1

PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELISA Y DOT ELISA

PBS pH 7.2 1X

Fosfato di sódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4)	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Agua desionizada	aforar a 1000 ml
Esterilizar y guardar a 4°C hasta su uso.	
PBS-TWEEN 20 0.05%	
Tween 20 al 20% (con agua desionizada)	2.5 ml
PBS 1X pH 7.2	aforar a 1000 ml

PBS-Leche 5% y 1%

Se preparan con leche descremada y deshidratada (DIFCO, 232100)
El diluyente será PBS pH 7.2.

NOTA: Deberán ser de preparación reciente para el día.

AMORTIGUADOR DEL SUSTRATO pH-5

Fosfato di sódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	26.97 g
Acido cítrico	3.0 g
Agua desionizada	aforar a 100 ml

Ajustar pH, esterilizar y guardar en refrigeración a 4°C.

A partir de esta solución: tomar 8 ml que se llevan a 25 ml con agua desionizada, agregar una tableta de o-fenilendiamina (OPD) de 10 mg e inmediatamente antes de revelar la reacción se agregan 10 µl de PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2) al 30%.

ACIDO SULFÚRICO 1 N (SOLO PARA ELISA)

Ac. Sulfúrico (H_2SO_4) (98% de pureza)	55 ml
Agua bidestilada	aforar a 100 ml

ANEXO 5

TECNICA DE DOT- ELISA.

ADSORCION DEL ANTÍGENO

Descongelar el antígeno a temperatura ambiente.

El antígeno 4C se empleo 2mg/ml, diluido con PBS pH 7.2

Absorber la dilución:

Se utilizo una membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL nitrocellulose membrane ®), con 0.45 µm de poro. Se corto la membrana de nitrocelulosa en confetis con un sacabocados, posteriormente se agrego la dilución del antígeno, se coloco en agitación por 5 min.

Se coloco los confetis entre papel Wathman para secar.

BLOQUEO DE SITIOS INESPECÍFICOS

Se bloqueo con leche descremada deshidratada al 5% (Difco) en agitación por 15 minutos.

Secar la membrana y guardar libre de la humedad a temperatura ambiente entre dos hojas de papel filro.

INCUBACIÓN DE 1 ER ANTICUERPO

La incubación se realizo en agitación a temperatura ambiente.

La dilución de los sueros se estandarizo en 1:200 dilución con PBS leche al 1% (Difco).

LAVADOS

3 lavados con PBS-tween 0.3% a temperatura ambiente en agitación ligera durante 5 minutos cada uno.

INCUBACIÓN DEL SEGUNDO ANTICUERPO.

Incubación con el conjugado (anti-igg conjugada a peroxidasa) (2º anticuerpo)

El conjugado deberá titularse previamente.

El conjugado se diluye en PBS-tween 0.3%/leche5%.

La incubación se realiza a T.A. en agitación ligera durante 15 min.

LAVADOS

3 lavados según se describió previamente (4).

REVELADO

Revelado de la prueba con el sustrato correspondiente con 4-chloro-1-naphtol (4cn) o con 3,3, Diaminobenzidina (DAB).

4-chloro-1-naphtol (4CN)

Tris HCl/NaCl 10 mM - 8.5 ml +
5.1 mg de chloronaphtol en 1.7 ml de METANOL FRIO
AGREGAR 5 µl de H₂O₂ al 30%

Tris HCl (10mM)/NaCl (0.14M) pH 7.5
Tris HCl 0.158 g
AGUA* 100 ml - ajustar pH a 7.5
NaCl 0.819 g
Esterilizar y guardar a 4°C

Colocar en oscuridad a T.A. en agitación ligera durante 15-30 min.

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar.

3,3, Diaminobenzidina (DAB) 50 - 25 mg

PBS pH 7.2 100 - 50 ml
H₂O₂ al 30% 50 - 25 µl

Colocar en oscuridad a T.A. en agitación ligera durante 15-30 min.

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar.

ANEXO 6

COTIZACIÓN DE REACTIVOS Y MATERIALES PARA LOS PROCEDIMIENTOS DE ELISA Y Dot-ELISA.

Medio de cultivo (LIT)							
Reactivo	Presentación	Marca	Costo (\$ MX)	Cantidad/L		Costo/L	Costo/8L
Cloruro de Sodio	2.5KG	JT BAKER	\$477,00	4	g	\$0,76	\$6,11
cloruro de Potasio	1KG	MERCK	\$675,00	0,4	g	\$1,08	\$8,64
Fosfato di sódico Anhidro	500g	JT BAKER	\$217,00	8	g	\$3,47	\$27,78
Glucosa	1kg	ALDRICH	\$363,00	2	g	\$0,73	\$5,81
Triptosa	500g	DIFCO	\$2.897,00	5	g	\$28,97	\$231,76
LIB	500g	DIFCO	\$1.966,00	5	g	\$19,66	\$157,28
Hemina	10 g	USB	\$1.593,90	5	ml	\$0,39	\$3,12
SFB	500ML	PPA	\$4.050,00	100	ml	\$810,00	\$6.480,00
Antibióticos	100ML	GIBCO	\$310,00	0,1	ml	\$0,31	\$2,48
Antibiótico-antimicótico	20ML	GIBCO	\$310,00	0,1	ml	\$0,31	\$2,48
TOTAL						\$865,68	\$6.925,45

ANEXO 6

				ELISA		Dot-ELISA		
				96 pruebas	Costo	96 pruebas	Costo	
Puntas de micropipeta	1000 piezas		\$220,00	99	pzs	\$63,3600	99/pzas	\$22,00
Puntas de micropipeta capacidad 1000ul	1000piezas	CLP	\$270,00	4	pzs	\$14,8100	99/pzas	\$26,73
Leche descremada	500 g	DIFCO	\$370,00		5g	\$3,7000	10 ml-.5g	\$0,37
					1g	\$0,7400		\$0,74
TWEEN 20	500ml		\$1.044,00	0,00625	ml	\$0,0131		\$0,01
OPD	100 tab	SIGMA	\$4.975,00	1	tableta	\$49,7500		
Conjugado Igg	1ml	Zymed	\$2.318,00	5	ul	\$11,5900	5ul	\$11,59
Inhibidores de Proteasas	25 tab	Roche	\$1.848,00	1,5	tableta			
CHAPS, para electroforesis minimum 98% TLC	5g	SIGMA	\$3.210,00	25	ul			
Peróxido 30%	500ml	FERMONT	\$102,00	10	ul	\$0,0020		\$0,01
					8ML			
Fosfato di sódico docecahidratado	500g	JT BAKER	\$231,00	2,1576	g	\$0,9968		\$1,00
Acido cítrico	500g	SIGMA	\$802,00	0,38466	g	\$0,6170		\$0,62
Acido sulfúrico 98%	1L	BAKER	\$215,00	1,11	ml	\$0,2387		\$0,24
DAB-	5g	Bio rad	\$242,00	25	mg			\$1,21
HYBOND -ECL MEMBRANE	3m x 50 cm	Amersham	\$4.920,00	28	mm2	\$0,9100	.x Disco	\$87,36
Papel filtro	46 x57 cm	Whatman	\$2.543,00	30	cm2			\$29,00
BCA Tm PROTEIN ASSAY 500	Para 2500 muestras	Thermo scientific	\$1.760,00			\$25,3400		
Microplaca de poliestireno	100 piezas	CORNING	\$2.146,00		pieza	\$21,4600		
						\$192,6175		\$180,87
					PBS X 2L = 3.088	\$6,1750		\$3,08
						\$198,7925		\$183,95

Eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas

La 51ª Asamblea Mundial de la Salud,

Alentada por los considerables progresos realizados en muchos países, como la Argentina, el Brasil, Chile y el Uruguay, hacia la eliminación de la enfermedad de Chagas;

Reconociendo el apoyo prestado por las autoridades nacionales a las actividades nacionales de lucha;

Reconociendo la decisión adoptada en recientes reuniones subregionales de los Ministros de Salud de la región andina y de América Central, en Bogotá y en Tegucigalpa, de lanzar iniciativas en varios países para lograr la eliminación de la transmisión en esas subregiones;

Consciente de la necesidad de disponer de más datos entomológicos y epidemiológicos para apoyar esas iniciativas;

Consciente de que los países en cuestión han establecido objetivos nacionales para lograr la interrupción de la transmisión en el año 2010 a más tardar,

1. EXPRESA su satisfacción por los progresos realizados por los Estados Miembros en la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas;
2. DECLARA su compromiso con el objetivo de la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas para el final del año 2010, que considera técnicamente factible si se cuenta con el apoyo político, técnico y económico apropiado;
3. HACE SUYA una estrategia combinada de desinfestación de viviendas y análisis sistemático de los bancos de sangre para detectar la infección por *Trypanosoma cruzi*, vigilancia activa, educación sanitaria y movilización de la comunidad;
4. PIDE a todos los Estados Miembros con poblaciones todavía afectadas por la enfermedad de Chagas que determinen con precisión la extensión de la enfermedad, en particular la distribución y el comportamiento de los vectores y su sensibilidad a los insecticidas, y elaboren planes de acción; establezcan comisiones técnicas interpaíses para iniciar la certificación de la eliminación; coordinen las contribuciones de la comunidad internacional, incluidos los organismos multilaterales y bilaterales y las organizaciones no gubernamentales; y

estudien las posibilidades de movilizar recursos adicionales para eliminar la enfermedad en el contexto de la atención primaria de salud;

5. INVITA a los organismos bilaterales e internacionales de desarrollo, las organizaciones no gubernamentales, las organizaciones regionales apropiadas, las fundaciones y otros donantes a que ayuden a garantizar que se disponga de fondos para acelerar y sostener los esfuerzos de los países para eliminar la enfermedad;
6. INSTA al Director General:
 - 1) a que apoye los esfuerzos para eliminar la transmisión de la enfermedad de Chagas a más tardar en el año 2010 y vele por que la OMS certifique la eliminación país por país;
 - 2) a que preste apoyo a los Estados Miembros en la vigilancia y en el establecimiento y ejecución de programas;
 - 3) a que siga tratando de obtener recursos extrapresupuestarios con este fin;
 - 4) a que informe al Consejo Ejecutivo en su 105ª reunión sobre los progresos realizados.

Décima sesión plenaria, 16 de mayo de 1998
A51/VR/10

= = =

ANEXO 8



CDG Division

Bio-Rad, S.A.

Oficinas:
Eugenia N° 197-A piso 10
Col. Narvarte
Del. Benito Juárez
México, D.F., 03100
Conmutador: 11 07 72 46
Fax: ext. 1053

Planta:
Av. 11 de enero de 1861 N°
58
Col. Leyes de Reforma
Del. Iztapalapa, México, D.F.,

martes, 04 de mayo de 2010

Laboratorio de Biología de Parásitos
Fac. de Medicina, UNAM

Referencia

156

A quien corresponda:
Presente,

Sometemos a su amable consideración la siguiente cotización de equipos nuevos para el procesamiento de Microelisas:

			USD
			dolares
Cat.	Descripción	Cant.	P.U. x EQP.
85499	PW40: Lavador/aspirador de microplacas de 8 canales programables diseñado para el uso de microplacas de 96 pozos con fondo en U ó en V.	1 equipo	\$ 3.925,00
93200	PR3100 TSC: Lector de microplacas automático, diseñado para la medición de absorbancias de muestras en microplacas de 96 pozos con modo de lectura dual o sencilla. Filtros incluidos: 405, 450, 490 y 620 nm.	1 equipo	\$ 10.516,00
87530	IPS: Incubador seco de microplacas ajustable, con capacidad para 4 microplacas de 96 pozos.	1 equipo	\$ 2.820,00

21 Bibliografía

1. 62ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD A62/17. Punto 12.12 del orden del día provisional 20 de marzo de 2009. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. OMS/A62/17/2009.
2. Andrade SG, Andrade V, Rocha Filho FD, Barral Netto M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1981;(23):245-250.
3. Andrews NW, Katzin AM, Colli W. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. Eur J Biochem. 1984;(3):599-604.
4. Araujo F. Analysis of *Trypanosoma cruzi* Antigens Bound by Specific Antibodies and by Antibodies to Related Trypanosomatids. Infect Immun 1986;(53): 179-185.
5. Bautista NL, García de la Torre GS, De Haro I, Salazar PM. Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the state of Morelos, Mexico and possible ecotopes. J Med Entomol. 1999;(36): 233-235
6. Bautista NL, Rojas G, De Haro I, Bucio M, Salazar PM. Comportamiento biológico de *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) en el estado de Morelos, México. Bol. chil. Parasitol. 2001;(56): 3-4
7. Biagi F, Arce GE. Los primeros casos de miocarditis chagásica comprobados en México. Arch Inst Cardiol Mex 1965;(35):611-623.
8. Bua J. Antígenos en *Trypanosoma cruzi*. Arg Microbiol. 1.22:47-66, 1990.
9. Bucio M, Cabrera M, Segura E, Zenteno E, Salazar PM. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol Invest 1999;(4):257-268.
10. Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasch AC, Almeida IC. The Surface Coat of the Mammal-dwelling Infective Trypomastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* Is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins. J. Biol. Chem. 2004;(279): 15860-15869.
11. Cabrera M, Bucio M, Rojo J, Bonifaz R, Guevara Y, Salazar PM. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in the General hospital of Mexico City. Rev Patol Trop. 2004;(33): 71-80.
12. Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Souza JM, Pacheco S, Carvalheiro José da Rocha Carvalheiro, Jorge F Yanovsky, Maria Carolina S Guimarães. Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en las

Américas: evaluación de tres años de colaboración. Bol Of Sanit. Panam. 1987;(5):449-63.

13. Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin M, González A, Degrave W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez J, Alonso C, Requena J, da Silveira JF. Molecular karyotype of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener reference clone of the *T. cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;(71): 27-38.

14. Carod FJ. Enfermedad de Chagas e ictus. *Neurología* 2006;(21):135-49.

15. Carrasco HA, Palacios E, Dagert C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV. Clinical, histo-chemical and ultrastructural correlation in septal endo-myocardial biopsies from chronic chagasic patients. Detection of early myocardial damage. *Am Heart J* 1987;(113):716-24.

16. Carvallo R, Galindez-Giron J, Jurberg J, Lent G. Vol. III 747-792 Geographical distribution and altitudinal dispersion: "In: Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas (R U, Carcavallo, I Galindez-Giron, J Jurberg, H Lent eds.) Editora Rio de Janeiro. 1999.

17. Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;(1):159-128.

18. Cura E, Wendel S. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud; 1994.

19. Cruz RA, Pickering-López JM, CHAMEX [base de datos en línea]. UNIBIO, Instituto de Biología, México DF, UNAM; 2005.

20. da Silva CV, Kawashita SY, Probst CM, Dallagiovanna B, Cruz MC, Silva EA, Souto-Pradón T, Krieger MA, Goldenberg S, Briones S, Andrews NW, Mortara RA. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Mic Infect.* 2009;(11) 563-570.

21. de Haro I, Salazar PM, Cabrera M. Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis. Segunda edición.. Mexico. D. F. UNAM; 1995. pp 7-13.

22. De Lima AR, Farías MN, Tortolero E, Navarro MC, Contreras VT. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Científ Venezol.* 2001;(52):235-247.

23. De Lima AR, Patricia A, Bastidas V, Bolívar ML, Navarro MC, Contreras V. Efecto de las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. *SALUS.* 2007;(11):20-26.

24. De Titto EH, Moreno M, Braun M, Segura EL. Chagas' disease: humoral response to subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi* in symptomatic and asymptomatic patients. *Trop Med Parasitol.* 1987; (3)8: 163-166.
25. Espinoza B, Vera-Cruz, JM, González H, Ortega E, Hernández R. Genotypic and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica.* 1998;(70): 63-72
26. Ferguson M, Snary D, Allen AK. Comparative Compositions of Cell Surface Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochim Biophys Acta.* 1985;(842):39-44.
27. Flint JE, Schechter M, Chapman MD. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg.* 1984 (78):193-202.
28. Fisher E, Ouassi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchizine MD. gp 58/ 68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology.* 1988;(65): 299-303.
29. Galvão C, Carcavallo R, Da Silva D, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic studies notes. *Zootaxa.* 2003;(202):1-36.
30. Gutierrez F, Guedes P, Gazzinelli R, Silva J. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009;(11):673-85.
31. Gonzalez L. 2008, Caracterización bioquímica de tres componentes glicoproteicos de tres aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. D.F. pp 88
32. Hubsch RM, Chichie N, Comach G, Aldao RR, Da Gusmao R. El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: II. Estudio seroepidemiológico en cuatro comunidades rurales de Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1989;(84):401-408.
33. Hubsch RM, Chichie N, Comach G, Aldao RR, Da Gusmao R. El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas: I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1988;(83):277-285.
34. Huete PJ. Genómica del *Trypanosoma cruzi*: Nuevas oportunidades para tratar el mal de Chagas : Primer Congreso Interdisciplinario de Investigación. Por la consolidación de una cultura de investigación. Universidad Centroamericana. Managua, 9 y 10 de mayo 2007. Memorias. Pp 20.

35. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clin Chem. 2005;(51):2415–2418.
36. Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980;(27): 37-58.
37. Lissaldo AM, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES, Stolf AM. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to Dot-ELISA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1994;(2):163- 166.
38. Marcipar IS, Welchen E, Roodveldt C, Marcipar A J, Silber A M. Purification of the 67-kDa lectin-like glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, LLGP-67, and its evaluation as a relevant antigen for the diagnosis of human infection. FEMS Microbiol.Lett. 2003;(220):149-154.
39. Martínez JA, Bárcenas NM, Noguera B, Alexandre AR, Lino RM, Magallón GE. Role of two Triatoma Hemiptera: Reduviidae: Triatominae species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplastida: Trypanosomatidae to man in the west coast of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;(96):141-144.
40. Mazzotti L. Dos casos de Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac Med Méx. 1940;(70):417-420.
41. McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. Bio Org Med Chem. 1999;(76):39-44
42. Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. Nat .1978;(272):819-821
43. Molina ZJ, Rosales JL, Silva L, Molina D. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomos silvestres de Nuevo León. Sal Pub Méx. 2007;(1):37-44.
44. Montiel G, Diaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños Cost Ric. 2002;(37):57-63.
45. Nivardo S, Jimenez AL, Bialostozky D, Vazquez C, Martinez I, Salazar PM, Bucio M, Ruiz A, Cabrera M. Evaluación de la función y sincronía de la contracción ventricular en pacientes con enfermedad de Chagas en estadio de latencia. Arch Cardiol Mex. 2009;(4):24-38
46. Nogueira N, Unkeless J, Cohn Z. "Specific Glycoprotein Antigens on the Surface of Insect and Mammalian Stages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci. 1982;(79): 1259-1263.
47. OMS.2007.Reporte sobre la Enfermedad de Chagas del Grupo de Trabajo Científico. Programa especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR)/SWG/09. Ginebra. Suiza.

48. Organización Panamericana de la salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OMS 2006, Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425-06.
49. Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, Marchese J, Williamson B, Hunt T, Karger BL, Sousa MV. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. J Proteome Res. 2004;(3): 517–524.
50. Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cervenansky C, Robello C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol.2004;(34):881–886.
51. Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Salazar PM, Cabrera M, Monroy C, Bargues MD, Mas Coma S, O'Connorje, Angulo VM, Jaramillo N, Pérez R. Genome size determination in Chagas Disease transmitting bugs (Hemiptera - Triatominae) by flow cytometry. Am J Trop Med Hyg. 2007;(763):516-521
52. Pereira M, Andrade A, Ribeiro J. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. Scien.1981;(211): 597-600.
53. Ruiz RC, Rigoni VL, Gonzalez J, Yoshida N, The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol.1993;(15):121–125
54. Rojo, J.2009.Tamizaje de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre, situación actual en México. Centenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. México D.F.,Memorias. Pp 41
55. Salazar PM, Tay J, Navarrete F, Ramos S.Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. Rev. Inv. Salud Públ. Mex.1975;(35): 37-45.
56. Salazar PM, Castejón J, Rodríguez H, Tay J. Miocarditis Chagásica crónica en México. Tercer caso comprobado por exámenes parasitológicos. Prensa Med. Mex. 1979;(44):115-120.
57. Salazar PM, Tay J, Bucio MI, Haro I, Anzures ME, Flores AS.Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inv. Salud Públ. Mex .1984;(26): 452-455
58. Salazar PM, Barrera M, Bucio M. Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea. Primer caso humano en Mexico.Rev Mex Patol Clin.1989;(36):57-59.
59. Salazar PM, De Haro A, Bucio M, Cabrera M.Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma Cruzi* en México. Med B. Aires. 2005; (65):63-69.

60. Salazar PM, Perera D, Ruiz Adela, Bucio M, Zamora C, Cabrera M, Harnden A. Chagas Disease as a Cause of Symptomatic Chronic Myocardopathy in Mexican Children. *J Pediatr Infect Dis.* 2009;(11):1011-1013.
61. Scharfstein J, Luquetti A, Murta AC, Senna M, Rezende JM, Rassi A, Mendonça-Previato L. Chagas' disease: serodiagnosis with purified Gp25 antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;(6):1153–1160
62. Siber AM, Marcipar IS, Roodveldt C, Cabeza MP, Laguens R, Marcipar AJ. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Exp. Parasitol.* 2002;(100):217-225.
63. Schechter M, Stevens A, Luquetti A, Snary D, Allen A, Miles M. Prevalence of Antibodies to 72-Kilodalton Glycoprotein (GP72) in Patients with Chagas' Disease and further Evidence of Zymodeme Associated Expression of GP72 Carbohydrate Epitopes. *Infect Immun.* 1986;(53): 547-552.
64. Snary D, Hudson L. *Trypanosoma cruzi* Cell Surface Proteins: Identification of One Major Glycoprotein. *FEBS Lett.* 1979;(100):166-170.
65. Solana ME, Katzin AM, Umezawa ES, Miatello CS. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol.* 1995;(33):1456-1460
66. Stolf, BS, Souto RP, Pedroso A, Zingales B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;(126): 73–80.
67. Tafuri W. Immunopathology of Chagas' disease-a historical overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;(94):274-248.
- 68.
69. Tay J, Gutiérrez QM, Salazar PM, Castillo M, Ortega M. Estudio sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inv Salud Pú b Méx.* 1973; (33): 67-76
70. Tay J, Salazar PM, Ontiveros A, Jiménez J, De Haro I, García Y. Epidemic study of Chagas disease in a town in Oaxaca, Mexico. *PAHO Bulletin* 1986; (4): 358-65
71. Torres E, Bucio M, Zenteno E, Espinoza RA, González L, De Alba M, Guevara Y, Salazar-Schettino PM, 2009. Diagnóstico de individuos con enfermedad de Chagas por electroinmunotransferencia. Resultados preliminares. XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología Asunción, Paraguay Memorias. Pp 202.

72. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;(9):4350–4354.
73. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper NJ, Coura JR, Borges PJ, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996;(34):2143–2147
74. Umezawa ES, Bastos S, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, González A. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol.* 1999; (37):1554-1560.
75. UNAM,SSA, OPS. Manual para el Diagnostico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México D.F.2006;45p.
76. Vargas F. 2004. Biología de vectores de la enfermedad de Chagas en el norte de Perú. Ensayos sobre la eliminación de *Rhodnius ecuadoriensis*. OPS V Reunión de la comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina Lima-Perú.
77. Verani JR, Seitz A, Gilman RH, La Fuente C, Galdos CG, Kawai V, de La Fuente E, Ferrufino L, Bowman NM, Pinedo CV, Levy MZ, Steurer F, Todd CW, Kirchhoff LV, Cabrera L, Verastegui M, Bern C. Geographic Variation in the Sensitivity of Recombinant Antigen-based Rapid Tests for Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection *Am J Trop Med Hyg.* 2009 (80): 410 – 415.
78. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso VC, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;(68): 574–582.
79. Voller A, Draper C, Bidwell D, Bartlett A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet.* 1975;(1):424-428.
80. Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, *An. Acad. Bras. Cienc.* 2006;(78):87–111.
81. Zingales B, Carniol C, de Lederkremer RM, Colli W. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;(26):135-144.