

302827
16
230



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

DURACION DE LA INFECTIVIDAD DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI EN SANGRE DE COBAYOS CONSERVADA EN
CONDICIONES DE BANCO DE SANGRE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA FELIX ROBLES SANCHEZ

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION

	Pág.
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	1
1.2. OBJETIVO GENERAL.	4
1.3. OBJETIVOS PARTICULARES.	4

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. DEFINICION.	5
2.2. ANTECEDENTES HISTORICOS.	5
2.3. EPIDEMIOLOGIA.	10
2.3.1. ETIOLOGIA.	10
2.3.2. FACTORES DEL AGENTE.	10
2.3.3. CICLO VITAL EN EL INSECTO	12
2.3.4. MECANISMOS DE TRANSMISION.	12
2.4. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD. . .	14
2.5. DIAGNOSTICO.	16
2.5.1. METODOS DIRECTOS.	16
2.5.2. METODOS INDIRECTOS.	17
2.5.3. PROCESOS INMUNOLOGICOS.	17

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

	pág.
3.1. DIAGRAMA DE FLUJO.	19
3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.	20
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	20
3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO.	20
3.2.3. EQUIPO.	22
3.2.4. REACTIVOS	22
3.3. METODOLOGÍA.	23
3.3.1. MANEJO DE LA TOMA DE MUESTRA.	28
3.3.2. PREPARACION DE REACTIVOS.	28

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. RESULTADOS.	30
4.2. DISCUSION.	34
4.3. RECOMENDACIONES.	35

CAPITULO V

CONCLUSIONES.	36
BIBLIOGRAFIA.	38

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una infección parasitaria de naturaleza endémica, de curso agudo o crónico, que afecta tanto al hombre como a mamíferos domésticos (perros y gatos) y silvestres, principalmente roedores y carnívoros, causada por Trypanosoma cruzi, protozooario mastigóforo hemoflagelado que pertenece a la familia Trypanosomatidae. (1)

En esta enfermedad los síntomas y signos clínicos no son característicos, lo cual dificulta su diagnóstico.

El parásito se transmite al hombre por las heces infectadas de diferentes especies de triatomíneos hematófagos. Los triatomíneos al alimentarse con sangre de animales infectados, ingieren tripomastigotes, los cuales se transforman a epimastigotes en el tubo digestivo de los insectos, en ésta fase el parásito se reproduce y después de 15 a 30 días aparecen los tripomastigotes metacíclicos en

el recto del insecto, los cuales son liberados con las heces del triatomo. (5)

Esta enfermedad está limitada al Continente Americano y se ha descrito en casi todos los países, y en algunos de ellos en forma endémica, principalmente en América del Sur. (10,21)

Los estudios realizados por diferentes grupos de investigación de nuestro país muestran que en casi todos los estados de la República Mexicana se encuentran triatomos infectados con T. cruzi lo que hace suponer que la zona endémica de la enfermedad de Chagas, sea muy amplia. (28,31)

En zonas endémicas la Enfermedad de Chagas se transmite fácilmente ante la presencia de personas susceptibles, vectores domiciliarios activos y parásitos viables, sin embargo la enfermedad va perdiendo poco a poco su rigurosa dependencia del vector y en cambio van cobrando importancia otros mecanismos de transmisión: la transfusión sanguínea, la transmisión congénita, la vía oral o digestiva y la manipulación de sangre y de animales infectados.

A pesar de haber sido incrementado el número de trabajo sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas se piensa que ésta continúa siendo prácticamente desconocida y en nuestro país es necesario determinar el grado de riesgo que representa el mecanismo de transmisión sanguínea, en una ciudad como el Distrito Federal, considerada como zona no endémica pero con un factor de suma importancia como es la migración y cuyos migrantes aparentemente sanos provienen de zonas que son endémicas y pueden actuar como donadores de sangre pudiendo transmitir así el parásito a otros individuos. (6) La presencia cíclica o permanente de T. cruzi en la sangre de personas infectadas, hace que la transfusión sanguínea constituya un mecanismo de trascendencia en salud pública, el riesgo es evidente considerando que T. cruzi posee gran viabilidad y capacidad infectiva en las condiciones que habitualmente se conserva la sangre para transfusiones. (12,20)

1.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la duración de la infectividad de T. cruzi cepa Ninoa, en sangre de cobayo, bajo condiciones de banco de sangre.

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Observar la duración de la movilidad de T. cruzi.
- b) Determinar la duración de la capacidad de infección del parásito al ratón albino.
- c) Observar los posibles cambios morfológicos de T. cruzi que pudiera presentar durante el experimento.
- d) Determinación de anticuerpos de anti T. cruzi en ratón albino.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 DEFINICION

La enfermedad de chagas o Tripanosomiasis americana, es una protozoosis causada por Trypanosoma cruzi, parásito intracelular de las células del Sistema reticulo endotelial (SRE), que ataca particularmente el miocardio, esófago y colon. (31)

2.2 ANTECEDENTES HISTORICOS

La transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas fue planteada desde 1911 por Carlos Chagas. Demostrada clínica y parasitológicamente por Dao en Venezuela en 1949. Tello y col. (1982), detectó a 27 madres y 18 recién nacidos con serología positiva, aislando el parásito por xenodiagnóstico en 7 madres y en 3 niños. (15,29)

La vía oral o digestiva, se considera importante ya que en numerosos casos en los que no se ha podido determinar el mecanismo de infección, la vía digestiva parece la más

probable, sobretodo por los hábitos de los mamíferos, (8) principalmente depredadores o insectívoros. La infección digestiva en forma experimental ha sido reportada por diversos autores desde 1921, comprobaciones hechas por Schenone y col. (1982), los cuales inocularon por vía oral a ratas (*Rattus norvegicus*) con sangre de ratón y heces del vector infectadas con el parásito, las ratas se infectaron, demostrando así que la vía oral es posible y eficaz al menos experimentalmente. (27)

La contaminación de sangre al desollar animales infectados, es de alto riesgo entre individuos taxidermistas, cazadores y personas que experimentan con T. cruzi en laboratorios de investigación.

En orden de importancia, la transfusión de sangre constituye el segundo mecanismo de transmisión de la Enfermedad de Chagas, tanto en las zonas endémicas como en las no endémicas. (15,19,32)

La posibilidad de que la Enfermedad de Chagas sea transmitida por la transfusión sanguínea, fue señalada tempranamente por Mazza y colaboradores en 1936 en Argentina y por Días en 1945. (3,10,21). Constituyendo esta uno de los principales problemas de salud pública en

diversos países latinoamericanos como: Chile, Argentina, Bolivia, Ecuador, Venezuela, Brasil, Colombia, etc. el número de casos humanos es alto, principalmente en zonas rurales y entre la población de escasos recursos, que viven en cabañas de adobe con tejados de paja, cuyas paredes brindan excelentes refugios para los insectos transmisores y las condiciones ecológicas son favorables para la transmisión y mantenimiento del parásito. (13)

En la década pasada, se publicaron los resultados de estudios serológicos realizados en bancos de sangre de diferentes países latinoamericanos incluyendo México, en los que se encontró un alto grado de seropositividad de anticuerpos contra T. cruzi. (14,22,23,26)

Entre los estudios más importantes realizados en México están los de Goldsmith y Zárate (1978), en el estado de Oaxaca, estos determinaron el potencial de transmisión de la Enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea, de 298 sueros que examinaron, 13 (4.4%) fueron positivos a una o más de las tres técnicas serológicas empleadas (Fijación de Complemento, Hemaglutinación Directa e Indirecta). (10) En 1985, en el Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales ahora, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia, "Dr. Manuel Martínez Báez" y el Centro Nacional de Transfusión

Sanguínea, analizaron 150 muestras de suero, una de ellas presentó anticuerpos contra T. cruzi, con la técnica de Microaglutinación Indirecta. La muestra correspondió a un donador de 28 años de edad, proveniente del estado de Tabasco. (30) En 1986 se estudió la prevalencia de anticuerpos contra T. cruzi en hemodonadores del puerto de Acapulco. De 500 muestras, 64 fueron positivas por lo menos a una de las dos técnicas empleadas: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Hemaglutinación Indirecta (HAI). (11)

En cuanto al riesgo por transmisión sanguínea, en México se han hecho pocos estudios en hemodonadores, los más conocidos son: Oaxaca con 4.8% de positividad, realizado por Goldsmith y col.; (10) Hospital Universitario de Puebla con 16.5%, CNTS (Centro Nacional de Transfusión Sanguínea) con 1.0% y Acapulco con 12.5%, por Velasco, Tinoco y cols.; Hospital Rubén Leñero en el D.F. con 2.0%, por Salinas y Velasco e Instituto Nacional de Cardiología con 2.0%, por Monteón y cols. (31)

Salazar-Schettino en 1989 reportó el primer caso (paciente masculino de 32 años) de transmisión de T. cruzi por transfusión sanguínea, confirmado por serología, sin antecedente de convivencia con triatomos, ni de haber salido nunca del D.F. y sólo haber recibido una transfusión

sanguínea de dos unidades por anemia, a los 14 años. (25)

La supervivencia de T. cruzi en diversas circunstancias, ha sido estudiada por varios autores, Sullivan (1944), demostró la capacidad infectante de sangre contaminada a temperatura ambiente, durante 250 días. Wienman y McAllister (1947), mantuvieron a -15° con glicerina a una cepa de T. cruzi durante 234 días y posteriormente lograron mantener vivos a T. cruzi congeladas 635 días. Nussenzwings (1954), demostró que los tripanosomas sanguíneos conservan su capacidad infectiva de almacenarlos a 6°C durante 21 días.

Cerisola y Rabinovich (1972), lograron mantener la capacidad infectante y supervivencia de T. cruzi en cultivo y en sangre de animales parasitados, conservados a temperaturas de 4 a 6° durante 19 días. (6)

Andrews N.W. y col. (1987), confirman las modificaciones celulares graduales que ocurren durante la transición del parásito de tripomastigote a amastigote, en cultivo de células de mamíferos a 37°C en 24 hrs. (2)

2.3 EPIDEMIOLOGIA

2.3.1 ETIOLOGIA

El agente etiológico es Trypanosoma cruzi parásito flagelado perteneciente a (19) :

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Especie: T. cruzi

2.3.2 FACTORES DEL AGENTE

Inherentes a su naturaleza y características. Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado cuyo ciclo vital comienza con la fase de TRIPOMASTIGOTE METACICLICO, forma contenida en la materia fecal del triatómino y que infecta al huésped vertebrado penetrando por la solución de continuidad causada por la picadura del insecto, por las

mucosas y, muy probablemente, por la piel indemne. Dentro del huésped penetra a los macrófagos y si logra sobrevivir escapando al fagolisosoma, se redondea y se convierte en AMASTIGOTE, forma intracelular inmóvil, que se reproduce por bipartición en el citoplasma, rompe la célula y penetra a otras. Los amastigotes liberados son células redondas de 2-7 μ m de diámetro con gran núcleo excéntrico y CINETOPLASTO en forma de bastoncito incurvado que da origen al RIZOPLASTO, el cual se convertirá en flagelo en las diversas formas evolutivas. En seguida, mediante progresión fusiforme, adquieren la forma de EPIMASTIGOTE, que poco después se transforma en TRIPOMASTIGOTE SANGUINEO al desplazarse el cinetoplasto al polo posterior, de donde emerge una MEMBRANA ONDULANTE que en el polo anterior se transforma en FLAGELO.

El EPIMASTIGOTE fusiforme, mide de 15-20 μ m, su cinetoplasto es anteronuclear, cercano al núcleo y posee una membrana ondulante que en el extremo de la célula se convierte en flagelo.

El TRIPOMASTIGOTE sanguíneo mide entre 15-20 μ m de diámetro, es fusiforme y generalmente está incurvado en forma de C, U o S, su cinetoplasto está colocado en el polo posterior de la célula y es muy grande, de él nace una membrana ondulante que se convierte en el flagelo. (15,31)

2.3.3 CICLO VITAL EN EL INSECTO

Al ser ingerido por el triatómino, el tripomastigote sanguíneo ancho sufre cambios estructurales rápidos en el tubo digestivo, iniciándose, dos ciclos vitales simultáneos paralelos, al transformarse las formas sanguíneas en epimastigotes por un lado y esferomastigotes por el otro, los cuales pueden identificarse desde el estómago hasta el recto del transmisor. Al finalizar el ciclo, tanto el epimastigote como el esferomastigote se convierten en tripomastigotes metacíclicos. (19,31)

2.3.4 MECANISMOS DE TRANSMISION

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana se transmite con facilidad ante la presencia del artrópodo que efectua una transmisión de tipo contaminativa estercorearia. Un mecanismo que ha adquirido carácter importante es la transfusión sanguínea debido a que se usa como hemoterápia donde el donante voluntario puede ser individuo chagásico asintomático y se puede presentar tanto en zonas endémicas como no endémicas, debido a la migración de éstos, como resultado de las condiciones precarias de vivienda y el bajo nivel económico.

Existen otros mecanismos de transmisión de menor importancia, como:

- a) Transmisión congénita "in útero" (via transplacentaria).
- b) Por conducto de la leche materna.
- c) Al desollar animales silvestres o ingeridos semicrudos.
- d) Por falta de cuidado en el laboratorio: Por contacto con heces de triatóminos, por contacto con sangre de animales previamente infectados y formas de cultivo in vitro.
- e) Transplantes de órganos invadidos con amastigotes que se transforman en formas infectivas en el receptor.

2.4 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

A) FASE AGUDA

Existe un período de incubación asintomático de 4-10 días. Cuando la transmisión se hizo por triatóminos aparecen las manifestaciones de puerta de entrada con el SIGNO DE ROMAÑA o bien CHAGOMAS de inoculación en otras partes del cuerpo y evolucionan lentamente (de 2-4 semanas). La temperatura entre 37-38°C se acompaña de cefalea, astenia, malestar general, mialgias, artralgias e hiporexia, edema subcutáneo, hepatoesplenomegalia y la cardiopatía, lesión anatomopatológica más constante en esta fase que en casos graves evoluciona hacia la insuficiencia cardiaca.

El pronóstico en la fase aguda generalmente es bueno, el cuadro remite espontáneamente entre los 30 y 90 días posteriores a su instalación. El promedio de muerte en esta fase es de 7 a 10% y generalmente ocurre en infantes.

B) FASE INDETERMINADA O ASINTOMÁTICA

Durante esta fase desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo, la serología es positiva en un individuo asintomático con electrocardiograma y radiografía normales para corazón, esófago y colon y comprende la gran mayoría de los chagásicos crónicos menores de 25 años de edad.

C) FASE CRÓNICA

La fase crónica se manifiesta casi siempre en personas de 20-50 años. El cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo. Pueden presentarse dos formas clínicas, una sintomática en donde los individuos infectados presentan miocardiopatía dilatada (como principal complicación), insuficiencia cardíaca progresiva y muerte; y otra asintomática en la cual el sujeto no tiene manifestaciones clínicas ni alteraciones en ECG y pudiendo evolucionar de esta forma o no durante toda su vida. El paciente puede cursar con parasitemia esporádica y fugaz y presentar anticuerpos por lo cual será considerado un peligro potencial si llega a ser donador sanguíneo. (31)

2.5 DIAGNOSTICO

La observación y aislamiento del parásito en muestras orgánicas del paciente, confirman inobjektivamente el diagnóstico. De modo general, consideradas las bases fisiopatogénicas y la historia natural de la enfermedad de Chagas, una orientación práctica se resumiría así:

- a) FASE AGUDA : Alta parasitemia + Ac. inespecíficos + inicio de formación de Ac. específicos (IgM-IgG); y observación en fresco del parásito, a través de exámenes seriados (métodos directos).
- b) FASE CRONICA : Bajísima parasitemia + presencia de altos niveles de Ac. específicos (métodos indirectos).

2.5.1 METODOS DIRECTOS (Indicados en fase aguda)

- a) Examen en fresco.
- b) Gota gruesa.
- c) Método de concentración Strout.
- d) Biopsia de ganglios y músculos.

2.5.2 METODOS INDIRECTOS (Indicados en fase crónica)

- a) Xenodiagnóstico.
- b) Hemocultivo.
- c) Inoculación en animales sensibles.

2.5.3 PROCESOS INMUNOLOGICOS

- a) RFC.- (Reacción de fijación de complemento).
- b) RIF.- (Reacción de inmunofluorescencia indirecta).
- c) RIA.- (Hemaglutinación indirecta).
- d) AD.- (Aglutinación directa).
- e) ELISA.- (Enzimoimmuno análisis con inmunoabsorbentes).
- f) Immunoblot en todas sus variantes.
- g) Sondas de DNA.

Los individuos que padecen la enfermedad de Chagas crónica poseen en el suero anticuerpos de tipo IgG específicos contra los antígenos citoplasmáticos de T. cruzi. Tales anticuerpos se pueden encontrar en concentraciones variables, siendo posible su detección por técnicas inmunológicas tales como la hemaglutinación indirecta (HAI). La HAI se basa en la propiedad que tienen los

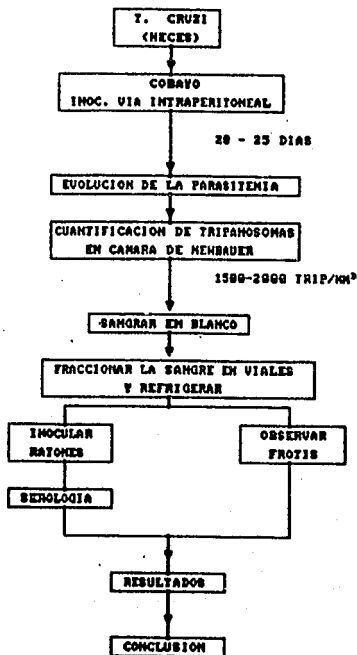
anticuerpos (que en este caso son anti T. cruzi) de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos.

Como en el suero, tanto de los individuos infectados como de los no infectados, existen anticuerpos inespecíficos; debe investigarse su presencia, especialmente para los anticuerpos heterófilos que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Dicha investigación se realiza enfrentando el suero con glóbulos rojos no sensibilizados. (4,7,9,16)

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Trypanosoma cruzi cepa Ninoa, aislada por el profesor Máximo Cortés, del Depto. de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas a partir de una niña de tres años de edad, procedente del estado de Oaxaca, la cual se ha mantenido en el laboratorio mediante pases triatoma-ratón-triatoma desde 1984.
- b) Triatóminos, se utilizarán aproximadamente 550 ninfas de III y IV estadio de Triatoma pallidipennis, desarrollados en el laboratorio de Entomología del Depto. de Parasitología de la E.N.C.B.
- c) Ratones albinos hembras de 20-25 g. aproximadamente.
- d) Cobayos, hembras de 180 g.

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Aplicadores de madera.
- Cámara Neubauer 1/400 Sq. MM. (Propper).
1/10 MM. Dcep. (Lumicyte).
- Cubreobjetos 100.50*24 MM. (Madesa).
- Frascos vacíos de 5 ml.
- Gasa.

- Guantes desechables o de cirujano.
- Gradilla.
- Jaulas de metal.
- Jeringas de insulina.
- Jeringas de 3,5, 10 y 20 ml.
- Lancetas desechables.
- Mechero de Bunsen.
- Microdilutores (25 μ l.)
- Microgoteros (25 μ l.)
- Papel Kraff.
- Papel parafilm. "M" (Laboratory Film)
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas para blancos.
- Pipetas plásticas descartables.
- Pipetas volumétricas 1,5 y 10 ml.
- Policubetas con 96 pocillos de fondo en U (8hileras y 12 columnas).
- Portaobjetos 25*75 MM. (Corning).
- Recipientes para desechar pipetas.
- Tetinas. 2
- Tela adhesiva.

3.2.3 EQUIPO

- Centrifuga (BHG Optima II).
- Microscópio (Leitz Netzlär).
- Refrigerador (Jrtespi).
- Reloj de intervalo (General Electric).
- Termómetro (Taylor).

3.2.4 REACTIVOS

- Agua destilada.
- Anticoagualante CPD. (Acido cítrico, fosfato de sodio y dextrosa).
- Antígeno HAI (Liofilizado de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos de T. cruzi).
- Buffer HAI (Solución fisiológica tamponada con fosfatos a pH 7.5 con colorante inerte).
- Clorotex extra (Productos químicos Alen S.A.)
- Colorante de Wright. (Omnichem S.A. de C.V.).
- Glóbulos rojos no sensibilizados HAI.
- Iodisan (Elequim S.A.)
- Jabón líquido Sigmaclin (Lab. Sigma de Méx. S.A. de C.V.)
- Líquido de Turk (Omnichem S.A. de C.V.)
- Metanol absoluto (J.T. Baker S.A. de C.V.)

- Reconstituyente HAI (Solución fisiológica tamponada a pH 7.0).
- Solución amortiguadora para colorante Wright.
- Solución fisiológica 0.85% (Barter S.A. de C.V.)
- Solución proteica HAI (Solución de albumina bovina al 10%).

3.3 METODOLOGIA

- 1) OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS A PARTIR DE HECEs DE TRIATOMINOS. Para ésto se alimentan ninfas de triatominos previamente infectados con T. cruzi), sobre un ratón libre de infección; una vez repletas, se les presiona suavemente el abdómen para obligarlas a defecar, e inmediatamente se toma una gota de las heces y se observa al microscópio para confirmar la positividad del insecto. Si la materia fecal presenta más o menos 10 tripanosomas por campo con el objetivo de 40X, se procede a inocular al cobayo.

- 2) INOCULACION A COBAYOS. La materia fecal con tripanosomas se diluye con solución salina al 0.85% se carga con una jeringa para insulina, aproximadamente 0.2 ml. de la solución (0.1 ml. de solución salina más

0.1 ml. de heces) conteniendo 70000 tripanosomas/mm. determinandose mediante la cuenta en cámara de Neubauer.

- 3) CUENTA DE TRIPOMASTIGOTES EN SANGRE DE COBAYOS. Entre 20 y 26 días después de la inoculación del cobayo, se revisa si existe adecuada parasitemia (1000-1500 trip./mm); para ello se desinfecta la oreja del animal con alcohol yodado se busca una vena ideal en la parte posterior, pinchando con una lanceta desechable estéril, y la sangre se recoge con una pipeta para glóbulos blancos hasta la marca 0.5 y se diluye con cloruro de amonio al 0.85% hasta la marca 11. Se cuentan los tripomastigotes en la cámara de Neubauer, en los cuatro cuadrantes para leucocitos, con el objetivo de 40X: el número de tripanosomas contados se multiplica por el factor de dilución "50", para obtener el número de tripanosoma por mm de sangre.

- 4) SANGRADO DE COBAYO. En condiciones asépticas, se toma con una jeringa de 20 ml., 2.8 ml. de anticoagulante, fórmula CPD (Acido cítrico, citrato, fósforo de sodio y dextrosa). Se hace la asépsia de la región torácica, puncionando al cobayo por vía intracardiaca extrayendo la sangre y mezclandola con el anticoagulante;

posteriormente la sangre se fracciona en cuarenta viales. A cada vial se le agrega 3.5 ml. de sangre aproximadamente, se tapan. Las muestras se mantienen en refrigeración de 4-6°C. verificando la temperatura periódicamente.

- 5) DETERMINACION DE LA MOVILIDAD DE T. CRUZI. A partir de una muestra (vial) y en condiciones de esterilidad, se homogeniza y se toma una gota para observarla al microscópio, con el objetivo de 40X. Los tripomastigotes son identificados fácilmente por su movilidad.
- 6) OBSERVACION DE LA MORFOLOGIA DE T. CRUZI. De la misma muestra, se hace un frotis y se tinte por la técnica de Wright se observa con el objetivo de inmersión buscando los cambios que pudieran experimentar los parásitos.
- 7) DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD DE LA SANGRE EN RATON ALBINO. Tomar 0.5 ml. de la muestra. Por vía intraperitoneal inocular al ratón, luego marcarlo y mantenerlo en una jaula de metal para su observación.
- 8) SEROLOGIA. A ratones inculados.

9) PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA T. cruzi. (Chatest HAI).

Procedimiento :

- a) Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U, pasar un trapo húmedo por la base antes de usar y disponerla apaisada.
- b) Con microgotero de 25 μ l., colocar una gota de diluyente de sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.
- c) Tomar una alícuota de cada suero a ensayar con microdilutores de 25 μ l. (uno para cada muestra) y colocar en los pocillos de la columna uno.
Se utilizarán tantas hileras horizontales como sueros deban procesarse.
- d) Realizar diluciones a partir de la columna uno (dilución 1/2), pasando los microdilutores a la columna dos (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la columna seis (dilución 1/64).

- e) Colocar en las columnas 1 y 2 (dilución 1/2 y 1/4) una gota (25 μ l.) de GR no sensibilizados, para control de heterofilia.
- f) En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 μ l.) de Antígeno HAI.
- g) Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos.
- h) Dejar en reposo, al resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.
- i) A partir de los 90 minutos leer. Se puede aumentar la nitidez de la apreciación, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y translúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

Interpretación de los resultados :

NO REACTIVO: Presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

REACTIVO : Formación de una película o manto que

cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.

3.3.1 MANEJO DE LA TOMA DE LA MUESTRA

- a) El suero de la muestra se obtiene por medio de centrifugación 2500 Rpm. durante 3 minutos, se separa el suero de la muestra y se mantiene congelado hasta el momento del estudio, de esta manera se evita que baje el título en los sueros.
- b) Se procesan 20 muestras de suero con el fin de aprovechar el antígeno hidratado.

3.3.2 PREPARACION DE REACTIVOS

ANTIGENO HAI : Preparar con 5.2 ml. de reconstituyente de HAI. Esperar una hora antes de usar mezclando cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplee homogenizar mediante agitación evitando la formación de espuma.

DILUYENTE DE SUEROS HAI: Agregar 0.2 ml. de SOLUCION PROTEICA cada 10 ml. de Buffer HAI. Mezclar, rotular y fechar.

GR NO SENSIBILIZADOS : Homogenizar mediante agitación

antes de usar evitando la formación de espuma.

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA COLORANTE DE WRIGHT:

Disolver: Fosfato disódico	4.539 g.
Fosfato monopotásico	5.590 g.
Agua destilada	100 ml.

De esta solución tomar 9.54 ml. y aforar a 2 litros con agua destilada. esta solución debe quedar a un pH entre 6.40 y 6.50.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 RESULTADOS

En el examen de la sangre infectada al microscópio, se comprobó la viabilidad de los tripanosomas por la movilidad de estos parásitos (cuadro 1). En las observaciones hechas del día 0 al día dos, los tripanosomas se movían activamente, al tercer día sus movimientos se hicieron más lentos, notándose además una disminución en el número de parásitos por campo, perdiendo la movilidad completamente a los cinco días.

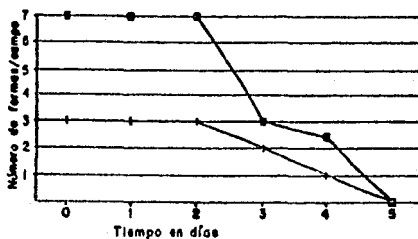
CUADRO NUM. 1

TIEMPO QUE PERMANECE LA MOVILIDAD (a) DE T. CRUII;
MANTENIDO EN CONDICIONES DE BANCO DE SANGRE.

TIEMPO (días)	NUMERO DE FORMAS MOVILES (b)	MOVILIDAD (c)
0 - 2	6 - 8/campo	+++
3	2 - 4/campo	++
4	1/3 - 4/campos	+
5	0	0

- a) Las observaciones se realizan en fresco utilizando el objetivo 40X.
b) Promedio de 10 campos.
c) +++: Alta movilidad; ++: Movilidad moderada; +: Baja movilidad; 0: No se observó movilidad.

Permanencia de la movilidad
en condiciones banco de sangre



■ Formas móviles
+ Movilidad

CUADRO NUM. 2

DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
 EN RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE (a) A PARTIR DE SANGRE
 DE COBAYO MANTENIDO DURANTE DIFERENTES PERIODOS BAJO
 CONDICIONES DE BANCO DE SANGRE.

PERIODO DE CONSERVACION DE LA SANGRE (días)	OBSERVACIONES EN FRESCO (b)	FROTIS TEÑIDO (TECNICA DE WRIGHT)	SEROLOGIA (c)
0 - 4	Positivo	Positivo	Positivo
5 - 16	Negativo	Negativo (d)	Negativo
17 - 20	Negativo	Negativo	Positivo

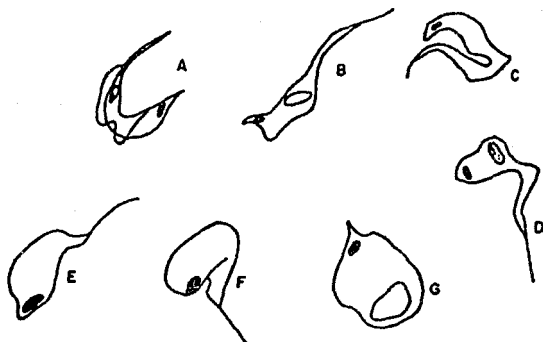
- a) Los ratones se inocularon con 0.5 ml. de sangre.
 b) Se buscó el parásito utilizando el objetivo 40X.
 c) Se siguió la técnica de Hemaglutinación Indirecta (Equipo Chagatest HAI).
 d) Se observaron fases no típicas del parásito.

CUADRO NUM. 3

FASES OBSERVADAS DE T. CRUZI DURANTE EL TIEMPO EN QUE SE
 CONSERVO EN CONDICIONES DE BANCO DE SANGRE.
 FROTIS TEÑIDOS CON WRIGHT.

TIEMPO (días)	FASE OBSERVADA
0 - 4	Tripomastigotes
4 - 9	Esferomastigotes

DIBUJOS



LAMINA NUM. 1

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS DIFERENTES FORMAS QUE VA
ADQUIRIENDO T. CRUZI EN LAS MUESTRAS DE SANGRE.

A: Forma típica fusiforme del tripomastigote de T. CRUZI.

B, C : Engrosamiento inicial del parásito.

D, E, F : Acortamiento del cuerpo con tendencia a
redondearse.

G : Forma redondeada sin flagelo externo visible
(esferomastigote). Dibujos hechos a mano alzada
(no a escala).

4.2 DISCUSION

Los resultados obtenidos del examen microscópico en fresco de la sangre infectada con T. cruzi, mantenida en refrigeración entre 4 y 6°C revelaron que el número de tripomastigotes disminuye gradualmente lo mismo que su movilidad (Cuadro num. 1).

La infectividad y la serología de la sangre mantenida en refrigeración, probada en ratón albino, solo fue demostrada hasta el 4º día, después de este tiempo no se obtuvo parasitemia en ninguno de los ratones, pero si fue positiva la serología en el 17º-20º día siendo este punto importante, sobre todo para donadores, demostrando así la necesidad de implantar en los bancos de sangre de zonas endémicas y no endémicas una prueba serológica y descartar las unidades de sangre con serología positiva.

4.3 RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a los trabajos publicados sobre la importancia de la Enfermedad de Chagas en la transfusión sanguínea, se recomienda que en los bancos de sangre de zonas endémicas, no endémicas y en hospitales de concentración de zonas de zonas urbanas hacer lo siguiente:

- a) Preguntar la procedencia del donador.
- b) Si ha tenido contacto o no con el transmisor.
- c) Realizar alguna de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra T. cruzi (HAI, HAD, RFI, RFC, ELISA, etc.) antes de liberar la sangre.

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFIA**CONCLUSIONES**

- A) En el presente estudio experimental, en el que fue sometido T. cruzi a las mismas condiciones de bancos de sangre (temperatura y anticoagulante), se determinó su viabilidad, supervivencia durante 4 días en función de su movilidad.
- B) El parásito presenta cambios morfológicos apartir de las 24 horas la forma característica fusiforme hasta llegar a las formas redondeadas (esferomastigotes) sin flagelo externo aparentemente visibles, estas formas predominaron hasta el 9° día. Sin embargo, las formas redondeadas se pusieron de manifiesto sólo en frotis teñidos con Wright hasta los 20 días. De tal forma se considerará que T. cruzi permanece viable e infectivo todo este tiempo en las muestras de sangre conservadas en refrigeración.

- C) Dada la trascendencia médico-social de la enfermedad de Chagas y la necesidad de un mejor conocimiento de su epidemiología para buscar mejores métodos de combatirse hace imprescindible continuar y profundizar con más estudios acerca de la infectividad de T. cruzi manteniendo las condiciones de banco de sangre.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Atías, A. y A. Andrade; Parasitología Clínica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago, Chile, 2ª edición. 238-251. (1984)
- 2.- Andrews, W. N. y col.,; Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi, Experimental Parasit, 64/ 474-484.(1987)
- 3.- Baruffa Gioanni; Prevalência da infecção chagásica no banco de sangue de Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev.Inst.Med.trop. São Paulo. Junciro-Fevereiro 1/1/ 37-42 (1979)
- 4.- Basso A. y col.,; Enfermedad de Chagas: Determinación de anticuerpos en eluatos de sangre desecada. XXX Triduo de la ABA. Huerta Grande (Córdoba).
- 5.- Brener, Z.,; Biology of T. cruzi. Ann Rev. Microbiol. 27/ 347-382. (1973)
- 6.- Cerisola, J.A: y col.,; Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre: Bol. Of. Sanit. Panamer. 73/ 203-221.(1972)
- 7.- Cerisola, J.A: Test de Hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La Prensa Médica Argentina34-49/ 1761 (1962)

- 8.- Díaz-Ungria, C.; Papel del veterinario en la lucha contra la enfermedad de Chagas. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 1: 497-504. (1969)
- 9.- Fontanela S., Moretti E. y González G.; Estudio de la confiabilidad de dos técnicas para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. XXX Triduo de la ABA, Huerta Grande (Córdoba).
- 10.- Golsmith R.S.; Zárate C.R.; Kagan I.G.,; El potencial de transmisión en la enfermedad de Chagas por la transfusión sanguínea: hallazgos serológicos entre los donadores en el Estado de Oaxaca. Salud Pùb. México 22/ 439-444. (1978)
- 11.- Gudiño, R. y R. tinoco; Prevalencia de la enfermedad de Chagas en hemodonadores de la Ciudad y Puerto de Acapulco. Tesis de Licenciatura, U.N.A.M. (1987)
- 12.- Guhl, F. y col.; Estudio serológico sobre la incidencia de donantes chagásicos en cuatro bancos de sangre de la Cd. de Bogotá. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 21/ 225-227. (1979)
- 13.- Harold N. Brown; Parasitología Clínica. Cuarta edición. Editorial Interamericana. 52-55. (1981)
- 14.- Lorca, M. y col.; Infección por Trypanosoma cruzi en bancos de sangre de doce hospitales de Chile. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 95 (4)/ 321-325. (1983)
- 15.- Markell y Voge; Parasitología. Ed. El Manual Moderno. México, D.F.; 120-129. (1984)

- 16.- Mazza S.; Métodos diagnósticos de la enfermedad de Chagas: Valor y oportunidad de cada uno. Sexto Congreso Nacional de Medicina (Córdoba). 155 (1938)
- 17.- Olivera de Alameda J.; Técnica de la reacción de fijación de complemento en gotas para exclusión de donadores de sangre chagásicos. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 42(2) 133-143. (1963)
- 18.- Pinto Díaz J.C.; Arvite Chagas Disease. Memorias, Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Suppl. Vol. 79/ 85-91. (1987)
- 19.- Pinto Díaz J.C.; Doença de Chagas-Clinica e Terapêutica. SUCAM (superintendência de Campanhas de Saúde Pública Ministério de Saúde Brasília, D.F. 7-36. (1990)
- 20.- Rohwedder, W. R.; Infección Chagásic en donadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. Bol. Chil. Parasit. 24/ (1-2) 88-89. (1969)
- 21.- Rojas Raúl, Contreras M.C., Rojas J., Mendoza J., Sandoval L., Amigo C., y Shenone H.; Enfermedad de Chagas en donadores de sangre del Hospital de Copiapó. II Región, Chile. Bol. Chil. Parasit. 38/ 26-28. (1983)
- 22.- Rojas, R. y col.; Enfermedad de Chagas en Chile, Sectores Urbanos II.- prevalencia de la infección chagásica en donadores de sangre del Hospital de Copiapó. III Región Chile. Bol. Chil. Parasit. 38/ 26-28 (1983)

- 23.- Saggua, H. y col.; Seropositividad chagásica en bancos de sangre de zona endémica. Algunos aspectos epidemiológicos de los hemodonantes. Bol. Chil. Parasit. 37/ 24-26. (1982)
- 24.- Salazar J.H., Arends, T & Baekelt, G.A.; Comprobación en Venezuela de la transmisión de Schyzotripanum cruzi por transfusión de sangre. Arch. Venez. Med. Trop. 4/ 355-363. (1962)
- 25.- Salazar Schettino, Barrera B.M. y Bucio T.M.I.; Transmisión de Trypanosoma cruzi por transfusión sanguínea, primer caso humano en México. Rev. Mex. Patol. Clin. 36/ 3-59. (1989)
- 26.- Salazar, S. y col.; Seropositividad a Trypanosoma cruzi en cuatro grupos de población del Edo. de Oaxaca. 26 (6)/ 589-595. (1984)
- 27.- Schenone, H. y col.; Infección experimental de ratas con Trypanosoma cruzi por vía oral. Bol. Chil. Parasit. 37/ 2-9. (1982)
- 28.- Tay Jorge y col.; Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Rev. Salud Pública de México. V.XXII/4/ 409-450. (1980)
- 29.- Tello, P. y col.; Incidencia de la infección por T.cruzi en madres e hijos de un sector del área norte de Santiago. Bol. Chil. Parasit. 37/ 23-24. (1982)
- 30.- Velázco, A. y T. Sepúlveda; Búsqueda de anticuerpos contra T. cruzi en donadores de banco de sangre registrados en el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea de la Secretaría de Salud. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M. (1985)

- 31.- Velázco Castejón O., Guzmán C., Cruz J., López O., González F.; La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del Instituto Nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos. Número 8/ 1-49. (1991)
- 32.- Zigman Brener.; Laboratory- acquired Chagas disease: An endemic disease among parasitologist. Genes y antígenos of Parasites Ed. Morel C.M. Brazil. 3-9. (1984)