



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-
Trypanosoma cruzi EN DONADORES DE BANCO
DE SANGRE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

NIDIA HERNANDEZ BECERRIL



MEXICO, D. F.

267009

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

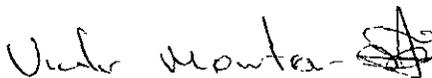
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	PROF	LEON CHAPA SATURNINO DE.
VOCAL	PROF.	GUTIERREZ RAMOS ABEL.
SECRETARIO	PROF.	MONTEON PADILLA VICTOR MANUEL
1 ^{er} SUPLENTE	PROF.	ASTIGARRAGA ZAVALETA MAITE
2 ^{do} SUPLENTE	PROF.	GARCIA TAMAYO FERNANDO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA

ASESOR



D. EN C VICTOR MANUEL MONTEON PADILLA

ALUMNO



NIDIA HERNANDEZ BECERRIL

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
1.1 GENERALIDADES	1
1.2 AGENTE ETIOLOGICO	2
a) Clasificación taxonómica del parásito	2
b) Fases del parásito	2
1.3 CICLO BIOLOGICO	3
a) Ciclo de vida en el huésped invertebrado	3
b) Ciclo de vida en el huésped vertebrado	4
1.4 VECTORES Y RESERVORIOS	4
1.5 CICLO DE TRANSMISION DE T. CRUZI POR LOS TRIATOMINOS.	
a) Ciclo silvestre o enzoótico	5
b) Ciclo peridoméstico intermedio o zooantropótico	5
c) Ciclo doméstico domiciliario o antropótico	5
1.6 FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD	5
1.7 DIAGNOSTICO	7
1.7.1 ESTUDIOS DE LABORATORIO	7
a) Diagnóstico parasitológico directo	7
b) Diagnóstico indirecto (serología)	8

II.- ANTECEDENTES	9
III.- OBJETIVOS	12
IV.- METODOLOGIA	13
IV.1. OBTENCION DEL EXTRACTO ANTIGENICO	13
IV.2. PRUEBA DE E.L.I.S.A.	14
IV.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	15
a) Preparación de las laminillas con epimastigotes	15
b) Prueba de inmunofluorescencia indirecta	16
IV.4. HEMOCULTIVO	16
a) Hemocultivo a partir del concentrado eritrocítico	16
b) Hemocultivo a partir del plasma	17
IV.5. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WB)	18
IV.5.1. Preparación de la muestra antigénica	18
IV 5 2 Resolución de la muestra por electroforesis	18
a) Preparación de los geles de poliacrilamida	18
b) Corrimiento electroforético	19
IV.5.3. Transferencia de los polipéptidos separados a la membrana de soporte	19
IV 5.4 Bloqueo de los lugares no específicos de la membrana de nitrocelulosa.	20
IV.5.5. Reacción antígeno- anticuerpo	20
IV.5.6. Revelado y detección	21
IV.5.7. Tinción de los marcadores de peso molecular (MPM)	21

V.- RESULTADOS	22
VI.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	30
VII.- BIBLIOGRAFIA	40
VIII. APENDICE	46
PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.	

I.-INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, tiene un gran impacto sobre la salud pública debido a su amplia distribución geográfica y elevada prevalencia, ubicándola entre las seis enfermedades tropicales más importantes del mundo. Por su localización se considera exclusiva del continente Americano, que comprende desde el sur de los Estados Unidos de América, donde se han registrado casos autóctonos hasta la provincia de Río Negro, en el Sur de Argentina. Al igual que otras parasitosis se considera una enfermedad de la pobreza por las condiciones socioeconómicas de la población que la padece^{1,2}.

En 1909 la tripanosomiasis americana fue descubierta por Carlos Chagas, investigador brasileño del Instituto de Manguinhos (en la actualidad Instituto Oswaldo Cruz) en Lassance, Minas Gerais, sitio donde fue comisionado para dirigir la profilaxis del paludismo^{1,2,3,4,5}.

La enfermedad de Chagas-Mazza (conocida también como la enfermedad de Chagas-Mazza-Romaña, tripanosomiasis americana o tripanosomiasis cruzi), es una protozoosis cuyo agente etiológico es el Trypanosoma cruzi, parásito hemoflagelado, que afecta preferentemente a células del miocardio, músculo liso y el sistema nervioso central (SNC), donde produce daño crónico e irreversible.

1.2. AGENTE ETIOLOGICO

a). Clasificación taxonómica del parásito.

El Trypanosoma cruzi está clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Clase	Zoomastigophora
Superclase	Mastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Tripanosomatina
Familia	Tripanosomatidae
Género	Trypanosoma
Sección	Stercoralia
Especie	cruzi

b). Fases del parásito:

Trypanosoma cruzi presenta en su ciclo biológico tres fases o formas diferentes: amastigote, epimastigote y tripomastigote.

AMASTIGOTE: Son formas redondas u ovoides que miden aproximadamente de 2 a 7 micras de diámetro y posee un núcleo excéntrico y cinetoplasto en forma de bastón que da origen al rizoplasto, sin flagelo libre. Se reproducen por fisión binaria asexual en el citoplasma de la célula huésped; diseminándose al romperse la célula penetra a otras originando nidos de amastigotes.

EPIMASTIGOTE: Este estadio morfológico es fusiforme, mide aproximadamente de 15 a 20 micras de longitud y presenta un núcleo central grande con cinetoplasto anteronuclear, pero todavía no se establece en un sitio final; el flagelo forma una pequeña membrana ondulante y una parte de flagelo libre. Estas formas se multiplican en la parte anterior del intestino de los triatomíneos, y en los cultivos *in vitro* para tripanosomátidos.

TRIPOMASTIGOTE: En la parte posterior del intestino del vector los epimastigotes se multiplican y dan lugar a tripomastigotes metacíclicos. Esta forma se encuentra en el huésped invertebrado y en el vertebrado el tripomastigote sanguíneo. Mide aproximadamente de 20 a 25 micras de longitud, tiene forma de C, U ó S. Presenta un núcleo central grande y vesiculoso con cinetoplasto subterminal donde inicia el flagelo que recorre todo el cuerpo, dando lugar a la membrana ondulante que queda libre en la región anterior.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

Trypanosoma cruzi es un parásito heteroxeno, que involucra en su ciclo biológico a organismos vertebrados e invertebrados, y debido a su capacidad de adaptación, asegura su supervivencia tanto en el huésped vertebrado (en sangre y tejido) como en el intestino del huésped invertebrado.

a) Ciclo de vida en el huésped invertebrado.

Cuando un triatómino hematófago sano ingiere la sangre de humanos o mamíferos infectados, en el cual se encuentran los tripomastigotes sanguíneos que es la fase infectiva para el insecto, los tripomastigotes sanguíneos pasan al intestino del triatómino, transformándose en epimastigotes y esferomastigotes, los que posteriormente se multiplican por fisión binaria longitudinalmente para convertirse al final en tripomastigotes metacíclicos. Estas formas son eliminadas por las heces y constituyen la fase infectante para el mamífero.

b) Ciclo de vida en el huésped vertebrado.

Después de alimentarse el triatomino infectado, libera al defecar, a los tripomastigotes metacíclicos que penetran ya sea por el sitio de picadura, por mucosa o cualquier sitio donde exista discontinuidad de las barreras epiteliales

Al penetrar el parásito a la célula del tejido, adopta la forma de amastigote y se multiplica por fisión binaria, de ahí se liberan a torrente sanguíneo para transformarse posteriormente en tripomastigotes sanguíneos, los que se diseminan a otros tejidos para multiplicarse nuevamente como amastigotes, repitiéndose muchas veces este proceso.

El ciclo de vida se completa cuando un triatomino libre de infección se alimenta de un mamífero infectado, ingiere los tripomastigotes sanguíneos y reinicia de esta manera el ciclo biológico.

1.4. VECTORES Y RESERVORIOS.

El T. cruzi se desarrolla habitualmente en los triatominos que actúan como vector transmisor, son insectos pertenecientes a :

Orden	Hemiptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae

Distribuidos en 6 géneros y 114 especies En la República Mexicana existen aproximadamente 32 especies de triatominos pertenecientes a 6 géneros distribuidos en todos los estados. Las especies mexicanas de mayor importancia son .

R. prolixus, T. barberi, T. dimidiata, T. phyllosoma, T. longipennis y T. picturata, en base a su domesticidad y distribución geográfica^{3,4}

Los huéspedes vertebrados funcionan como reservorios (todos los animales infectados por el parásito que lo mantienen en la misma fase que se encuentran en el hombre), por ejemplo los murciélagos, gatos, perros, etc., y el hombre

1.5. CICLO DE TRANSMISIÓN DE T. CRUZI POR LOS TRIATOMINOS.

Realizan tres diferentes ciclos, en relación directa a su antropofilia .

- 1.- **Ciclo silvestre o enzoótico:** triatóminos silvestres que solo ocasionalmente pican al hombre
- 2.- **Ciclo peridoméstico intermedio o zooantropótico:** aquellos que habitan en las cercanías de la vivienda humana y que han iniciado la colonización de ésta.
- 3.- **Ciclo doméstico domiciliario o antropótico:** triatóminos que tienen como principal fuente de alimento al hombre aunque no desdeñan animales domésticos ó silvestres (murciélagos, tlacuaches, ciertos roedores, etc.) que viven en la habitación humana o penetran a ella.

1.6. FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.

La penetración de T. cruzi en el organismo del hospedero vertebrado particularmente el humano puede presentar diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la vía de entrada y la diseminación a otros tejidos y órganos.

La fase aguda está caracterizada por fiebre elevada intermitente, crecimiento de los ganglios linfáticos y en caso de invadir tejido visceral, hepatoesplenomegalia o miocarditis. En el sitio de picadura del artrópodo vector se produce un signo de puerta de entrada, es conocido como “chagoma de inoculación”. Estas lesiones son nodulaciones duras eritemo-papulosa que pueden presentar pequeñas vesículas no supurativas y que tienen un tiempo de evolución de 2 a 4 semanas.

Cuando la entrada del parásito es por conjuntiva se presenta un complejo oftalmoganglionar denominado signo de Chagas-Mazza-Romaña, caracterizado por inflamación de los ganglios periauriculares y de las cadenas cervicales.

En la fase indeterminada desaparece la sintomatología, sin embargo, la serología es positiva, electrocardiogramas normales y radiografías del corazón, esófago y colon, sin alteraciones. También presentan parasitemia esporádica transitoria y escasa. De este tipo de casos evolucionan a las formas cardíacas o digestivas el 30% y aproximadamente el 70% permanece indefinidamente en la etapa indeterminada.

El establecimiento del parásito de forma indefinida en el organismo puede ocasionar lesiones irreversibles presentando cuadros crónicos. En esta fase crónica el parasitismo y la parasitemia sufren un considerable descenso, y se hace difícil el hallazgo del agente etiológico en la sangre y en los tejidos.

En los casos en que el miocardio y el tubo digestivo sean lesionados, la afección puede desarrollar enormes cardiomegalias por dilatación del miocardio, con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que pueden ocasionar un aneurisma, y sobre todo en la punta del corazón.

En el caso de la miocardiopatía chagásica crónica (CCC), el daño comienza siempre en un período subclínico con alteraciones del ECG, el cual generalmente indica alteraciones en la conducción.

Cuando el paciente se hace sintomático comúnmente inicia con palpitaciones y disnea, precordialgia y síntomas originados por estasis visceral particularmente hepática

Otras formas clínicas como las megas (grande o crecimiento) viscerales se deben a la disfunción motora de los segmentos del esófago y colon debido a la denervación parasitémica intramural.

Cuando la infección es vía transplacentaria, el paso de T. cruzi al feto durante la gestación determina un cuadro clínico caracterizado por el nacimiento prematuro, hepatoesplenomegalia, compromiso del SNC variable y del miocardio. Esta forma clínica presenta una elevada mortalidad debido a que la mayoría desarrolla una distrofia grave, con profundas alteraciones del sistema inmune.

1.7. DIAGNOSTICO.

Cuando la enfermedad cruza por la fase aguda puede ser confundida con varias enfermedades febriles, principalmente paludismo y Kala-azar. La fiebre elevada continua con exacerbación vespertina con aproximadamente un mes de duración, taquicardia y edemas duros, etc.; las manifestaciones de puerta de entrada pueden sugerirnos el diagnóstico. Aunque la observación y aislamiento del parásito en muestras orgánicas del paciente lo confirman.

1.7.1. ESTUDIOS DE LABORATORIO.

El diagnóstico parasitológico está basado en exámenes directos, que permiten detectar el Trypanosoma cruzi en la sangre y los exámenes serológicos los anticuerpos formados bajo el estímulo del parásito^{1,2}

a) Diagnóstico parasitológico directo.

- 1.- *Examen directo de sangre fresca.* Este examen es empleado en el diagnóstico rápido de las formas congénitas y fase aguda.
- 2.- *Examen de gota gruesa.* En esta técnica se hemolizan los eritrocitos para que su acumulación no impida la observación de los parásitos.

- 3.- *Técnica de Strout*. Se realiza en sangre total y se somete a centrifugación, con el fin de concentrar y separar los parásitos.
- 4.- *Xenodiagnóstico*. Se utilizan 21 triatominos para demostrar la presencia de T. cruzi. Esta técnica se utiliza en la fase aguda y crónica
- 5.- *Hemocultivo*. Utilizando como medio de cultivo para el parásito la propia sangre de los pacientes chagásicos con medio de cultivo líquido con suplemento de infusión líquida de triptosa como es el medio LIT .
- 6.- *Inoculación en animales de laboratorio*. Se han empleado numerosas especies de animales para efectuar inoculaciones y hoy en día se prefiere utilizar el ratón de laboratorio. Los ratones con una edad de tres semanas, son inoculados por vía intraperitoneal con sangre citratada de pacientes.

b) Diagnóstico indirecto (serología).

Las técnicas utilizadas ponen de manifiesto la existencia de anticuerpos T. cruzi en el probable infectado chagásico. Los métodos serológicos más empleados son: Hemaglutinación indirecta (HAI), reacción de fijación de complemento (RFC), inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación directa (AD) y las técnicas inmunoenzimáticas (E.L.I.S.A.) ^{21,*}

II. ANTECEDENTES

En 1936 Salvador Mazza fue el primero en proponer la posibilidad de transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea, seguido por Días en Brasil (1945), Bacigalupo en Argentina (1945) y Talice en Uruguay en (1947)^{2,6}

El primer grupo de donadores seropositivos que presentaron reactividad en la prueba de fijación de complemento fue informado en 1949 en Belo Horizonte Brasil por Peregrino y Emmanuel Días en forma independiente. En 1952 Pedreira de Freitas encontró los primeros casos de Chagas pos-transfusional confirmados en Brasil. Mucho tiempo después fueron descritos otros casos de enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea en Brasil, Venezuela, Chile, Bolivia y gradualmente en otros países de Latinoamérica.

La seroprevalencia de anticuerpos T. cruzi en donadores en Latinoamérica es muy variable, en Argentina hay informes que existen del 1 a 17% de seroprevalencia en la ciudad de Buenos Aires y hasta un 23.9 % en Chaco. En Brasil la seroprevalencia varía entre 0.03 % en Río de Janeiro hasta 14.5 % en Brasilia. Chile reporta un 0.3% en Santiago hasta 29.0 % en Salamanca, en Colombia el Centro Nacional de la Transfusión reporta una seropositividad de 0 a 12.7 % y Cruz Roja Colombiana de 0 a un 5.2 %, en San José de Bogotá el 23%. En Ecuador la prevalencia es menor de 0.72% mientras que en Venezuela se ha informado de 1.3 a 4.0 %, En la Paz Bolivia es de 4.9 % y en Santa Cruz de 62.0%. Costa Rica con prevalencia de 0.8 a 1.6 %, Guatemala con 5 % y Honduras con 11.6 %^{5,7,8,9,10,11,12,13}

La infección por Trypanosoma cruzi hasta hace poco estuvo limitada a Latinoamérica determinando como zona endémica desde el sur de Estados Unidos hasta el paralelo 46 sur cerca de la Patagonia.

Debido a los movimientos migratorios de la población de zonas rurales a urbanas intra e internacionales han permitido la posibilidad de extender los límites geográficos de la enfermedad.

En Norteamérica como E.U. y Canadá se han informado casos, así hasta 1993 por ejemplo: en los Ángeles California observó una seroprevalencia de 0.09 a 1 %^{6,14}, en Washington D. C. de 205 inmigrantes centroamericanos (de Nicaragua y El Salvador principalmente) el 4.9 %.

En otros continentes hasta ahora no se han informado casos de enfermedad de Chagas, pero se estima que la población de inmigrantes latinoamericanos provenientes de zonas endémicas representa un sector muy importante y de riesgo potencial para la transmisión de la infección. Se sabe que aproximadamente hay 300 000 inmigrantes latinoamericanos en Europa, especialmente en Portugal, España, Italia, Francia e Inglaterra. En Japón han migrado alrededor de 150 000 brasileños en 10 años y 80 000 latinoamericanos en Austria⁶.

En México, Luis Mazzoti en 1940 reportó los primeros casos de tripanosomiasis americana, en pacientes originarios de Real del Carmen Oaxaca. En esta zona los triatomínicos encontrados fueron R. prolixus infectados con T. cruzi. Veinte años después Francisco Biagi informó los primeros casos comprobados de miocarditis causada por este parásito^{3,4}. Estudios posteriores informaron de casos en el Estado de Chiapas, Jalisco y Oaxaca. En 1972 Tay y colaboradores informan el panorama de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana⁷, determinando como área potencial de transmisión a todo el territorio que se encuentra a menos de 1800 m sobre el nivel del mar, debido a que dentro de esa altura es donde se han encontrado triatomínicos infectados por el parásito. En 1992 se publica un estudio epidemiológico a nivel Nacional donde se confirma la elevada seroprevalencia en áreas ya estudiadas como Oaxaca, Veracruz, Hidalgo y Chiapas; en los estados de Jalisco, Michoacán y Guerrero conocidos como de alta prevalencia no fue la esperada, sin embargo, Yucatán, Querétaro, Coahuila, Nuevo León y Baja California Norte se informaron casos de seropositividad. Los resultados de la encuesta presentan una seroprevalencia muy variable en todo el territorio Nacional que va de 0 al 3.0%, detectando trabajadores migratorios infectados en las ciudades fronterizas de Baja California¹⁵.

La tripanosomiasis iatrogénica pos-transfusional es la segunda vía de infección de T. cruzi en zonas endémicas y la principal en países donde no se presenta la infección por vectores.

El estudio en bancos de sangre de esta enfermedad en México es muy reciente, el primer informe data de 1978 (Golsdmith y cols) reporta el 44 % de seroprevalencia en hemodonadores de la ciudad de Oaxaca¹⁶. Velasco y Sepúlveda en 1985 notificaron una seroprevalencia de 0.67 % obtenida en el Centro Nacional de la Transfusión de la ciudad de México Tinoco y Garduño detectan 11.2 % de seropositividad en donadores familiares en bancos de sangre de la ciudad de Acapulco y un 19 % en donadores remunerados en 1987; en este mismo año (Monteón y cols) informaron la seroprevalencia de 1.1 % en un trabajo realizado en la zona metropolitana¹⁷. En 1989 el Banco de Sangre del Hospital Rubén Leñero obtienen una seroprevalencia de 2 %

En 1991 en el Congreso Iberoamericano de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional se informó de estudios hechos en diversos estados del país donde la seroprevalencia fue variable de 0.0 a 7.6 % , encontrando la más alta en donadores de Oaxaca, Tamaulipas y Guanajuato¹⁸

En la ciudad de México Ramos y cols¹⁹ observan el 0.28 % de seroprevalencia en donadores de banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “ Ignacio Chávez” en 1992. En el estado de Jalisco (Trujillo y cols) informó el 1.2 % de seropositivos en 1993²⁰

III. OBJETIVOS .

Actualizar los datos de seroprevalencia de anticuerpos anti- T. cruzi en hemodonadores del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Obtener información a través de la historia clínica que contribuya a determinar el lugar de origen y residencia de los donadores que con mayor frecuencia acuden al servicio de Banco de Sangre.

Aislar al parásito por medio de hemocultivos a partir de las unidades de sangre de los donadores con serología positiva para T. cruzi.

IV.2. PRUEBA DE E.L.I.S.A.

La prueba de ELISA se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Se sensibilizó la placa con 100 μ l/ pozo del extracto antigénico soluble ajustado a 10 μ g/ml en amortiguador de carbonatos a un pH de 9.6; e incubó toda la noche a 4°C
- 2.- Se decantó y lavándose 4 veces con PBS-Tween 20 (0.05%), (este amortiguador se utilizó como solución de lavado); agregando 200 μ l/pozo.
- 3 - Se bloqueó con PBS-Tween 20 --Albúmina bovina al 1%; agregándole 100 μ l /pozo e incubándose a 37°C por una hora.
- 4.- Se decantó y lavó 4 veces con la solución de lavado.
- 5.- Las muestras y los sueros control se diluyeron 1:400 en amortiguador de lavado.
- 6.- Se agregó 100 μ l de la muestra diluida/ pozo analizándose por triplicado; e incubándose una hora a 37°C
- 7.- Se lavó 4 veces con el amortiguador de lavado.
- 8 - El conjugado (anti-IgG humana marcada con peroxidasa) se diluyó 1:5000 en PBS-Tween 20- Albúmina al 1% y se aplicó en cada pozo 100 μ l. Incubándose a 37°C por una hora.
- 9 - Se lavó 4 veces con el amortiguador de lavado .
- 10.- El sistema de revelado consiste en o-fenilendiamina (4.0 mg) en amortiguador de citratos-fostato pH=5.0 (10 ml) y H₂O₂ 5 μ l, de esta solución se depositó 100 μ l por pozo y se dejó la reacción 10 minutos en la obscuridad
- 11.- Al finalizar el tiempo de reacción, se detuvo con 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5 N.
- 12.- Se leyó a 490 nm.

IV.3. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta la llevamos a cabo como indica la técnica aquí descrita.

A.- Preparación de las laminillas con epimastigotes.

- 1 - A partir de un medio de cultivo BHI ya inoculado con T. cruzi y en la fase de epimastigote, la fase líquida del medio se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 3000 r.p.m durante 10 minutos
- 2.- Se decantó y el botón se resuspendió en solución amortiguadora (PBS 0.01M pH=7.2).
- 3.- Posteriormente lavamos y centrifugamos con solución amortiguadora (PBS 0.01M pH=7.2) a 3000 rpm durante diez minutos 3 veces siguiendo las mismas indicaciones anteriores .
- 4.- Por último el paquete celular se resuspendió en una cantidad equivalente a 10 veces el volumen del botón obtenido.
- 5.- Se depositó una gota de la suspensión obtenida en un portaobjetos y se observó al microscopio, después se ajustó la concentración de los parásitos aproximadamente de 20 a 40 por campo.
- 6.- En portaobjetos previamente circulados, con lápiz de punta de diamante, se depositó una gota de la suspensión de parásitos dentro de la zona delimitada y se dejaron secar al aire.
- 7 - Las laminillas se conservaron en refrigeración a -70⁰ C.

Cuando se realizó la técnica de inmunofluorescencia a las muestras, las laminillas se descongelaron y se fijaron con metanol.

B.- Prueba de inmunofluorescencia indirecta.

- 1 - Los sueros problema y controles se diluyeron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01 M pH=7.2) a 1:32 y 1:64.
- 2 - Se identificaron las laminillas con las muestras correspondiente y diluciones hechas.
- 3.- Se depositaron 100 μ l de cada dilución en el espacio correspondiente a la suspensión fijada de epimastigotes, dejando las laminillas en cámara húmeda 20 minutos
- 4.- Lavamos con amortiguador de fosfatos (0.01 M pH=7.2)colocando las laminillas en una vaso de coplin en agitación lenta, realizando el procedimiento 3 veces
- 5.- Se realizó la dilución del conjugado (anti-IgG humana marcada con fluoresceina), 1:64 en Azul de Evans que está diluido a 1:10000 ó 1:15000.
- 6 - Se depositan 100 μ l del conjugado y se deja 20 minutos en cámara húmeda
- 7 - Se lavó 3 veces con amortiguador de fosfatos (PBS 0.01 M pH=7.2) (siguiendo las indicaciones anteriores del lavado).
- 8 - Se colocaron sobre una gasa seca y escurriéndolas unos segundos para eliminar el exceso de amortiguador, sin dejar secar se adiciona rápidamente una gota de glicerol y se colocó un cubreobjetos.
- 9.- Por último se leyó al microscopio de fluorescencia ^{3,5}

IV.4. HEMOCULTIVO.

a). Hemocultivo a partir del concentrado eritrocítico.

El hemocultivo que hicimos a partir del concentrado eritrocítico se trabajó en el orden siguiente:

- 1.- En condiciones estériles fraccionamos alicuotas de 40ml del concentrado eritrocítico en tubos de 50 ml nuevos y estériles.
- 2.- Se centrifugó a 3000 r.p.m. por 10 minutos a 4^o C
- 3.- Sin resuspender la sangre se retiró el plasma dejando aproximadamente en la interfase 5 ml a cada uno de los tubos (el plasma recolectado se puso en alicuotas y se guardó a -70^oC para estudios posteriores).
- 4.- Se tomaron los 5 ml de plasma más 5 ml de eritrocitos y se depositaron en un tubo estéril de 50 ml
- 5.- Se adicionó un volumen equivalente de medio LIT y se mezcló por rotación.
- 6.- Centrifugamos a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4^oC.
- 7.- Se retiró la fase acuosa dejando 2 ml aproximadamente en la interfase, después se adicionó un volumen equivalente al de la muestra contenida de medio LIT.
- 8.- Mezclamos suavemente por rotación y después se incubaron a 28^oC por tres meses.
- 9.- Los hemocultivos se revisaron una vez por semana, mezclándose previamente los tubos por rotación.

b). Hemocultivo a partir del plasma.

La fracción de plasma se trabajó de la siguiente manera:

- 1.- Se centrifugó la bolsa del plasma colocando la llave de paso de la bolsa hacia abajo, a 3000 r.p.m. por 5 minutos.
- 2.- En condiciones de esterilidad se abrió la llave de la bolsa y se depositó aproximadamente 10 ml de la parte inferior de plasma en un tubo de 50 ml estéril
- 3.- Se adicionó al tubo un volumen equivalente al de la muestra de medio de cultivo LIT. Se agitó por rotación suavemente y se metió a incubar a 28^oC por tres meses.

- 4.- Los hemocultivos se revisaron al microscopio una vez por semana, mezclándose previamente los tubos por rotación, se tomó una muestra con pipeta Pasteur en condiciones de esterilidad depositándolo en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos ^(3,5,23,24,25)

IV.5. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WB)

La metodología se realizó en el orden que indica la siguiente técnica.

IV.5.1 Preparación de la muestra antigénica.

Se utiliza el extracto antigénico soluble de T. cruzi, se tomó 500 µg de la proteína y se diluyó 1:2 con el amortiguador de muestra.

Después se adicionó 2- β mercaptoetanol a una concentración final de 1:20 y se colocó en baño María a ebullición por 5 minutos.

IV.5.2. Resolución de la muestra por electroforesis.

1. Preparación de los geles de poliacrilamida.

Se nivelaron y armaron los vidrios utilizados para la preparación de los geles en sandwich verificando que no hubiera fugas.

El gel separador se preparó y se depositó en el sistema rápidamente evitando formar burbujas, enseguida se agregó a la superficie del gel agua desionizada o alcohol isopropílico.

Una vez que solidificó se retiró el agua y se secó.

Después se colocó un peine preparativo, se hizo la mezcla del gel concentrador e inmediatamente se adicionó evitando que se formen burbujas.

II.-Corrimiento electroforético.

Se preparó la cámara de electroforesis colocando los geles y el amortiguador de corrida (o electroforesis) en baño de hielo.

En un canal del gel concentrador se depositaron los marcadores de peso molecular (MPM) y en el preparativo la muestra antigénica (marcar el lugar en el que se depositó MPM) .

La electroforesis se inició a 500 volt por una o dos horas dependiendo hasta donde se desee la separación de la muestra antigénica en el gel.

IV.5.3. Transferencia de los polipéptidos separados a la membrana de soporte.

a). El sistema se montó de la siguiente manera:

Se recortó el papel filtro y la nitrocelulosa del tamaño del gel separador, después se sumergieron unos minutos en amortiguador de transferencia

Enseguida se construyó un sistema de sandwich en el siguiente orden

- 1.- toalla de soporte,
 - 2.- papel filtro,
 - 3.- gel de poliacrylamida,
 - 4.- membrana de nitrocelulosa,
 - 5.- papel filtro,
 - 6 - toalla de soporte.
- b) - Los sistemas formados se colocaron en la cámara de transferencia y después se adicionó el amortiguador de transferencia.
- c) - Se conectó el electrodo positivo al ánodo dejando el sistema de sandwich con la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo.
- d).- Se realizó la transferencia a 500 volt durante una hora

- e).- Una vez terminada la transferencia se separó el gel y la membrana señalando la posición de los MPM.
- f) - El gel separador se tiñó con azul de Cumassie para verificar la transferencia
- g) - De la membrana de nitrocelulosa se cortó la sección de los MPM y se lavó con PBS 0.01M, pH=7.2; después se tiñó con negro de amido.

IV.5.4. Bloqueo de los lugares no específicos de la membrana de nitrocelulosa.

- a).- Cuando separamos los pesos moleculares la fracción de la membrana restante se sumergió en amortiguador de PBS-Tween- Albúmina bovina al 3% toda la noche
- b).- Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1 %.
- c).- Se lavó 2 veces con PBS 0.01M, pH 7.2; congelándose hasta su uso a -20°C (en el caso de no utilizarla inmediatamente).

IV.5.5. Reacción antígeno-anticuerpo.

La adición de los sueros que contienen los anticuerpos específicos contra T. cruzi

- a).- Se cortaron tiras de la membrana de nitrocelulosa de 0.4 cm de ancho, de tal forma que el corte fuese paralelo a la misma dirección en que se llevó a cabo el corrimiento electroforético, para que las tiras tengan incluidas todas las proteínas separadas .
- b) - Se hicieron diluciones de los sueros problema y controles 1:100 en PBS-Tween 20 al 0.1% .
- c).- Se pusieron a reaccionar las tiras de la membrana de nitrocelulosa con las diluciones de los sueros por dos horas en agitación lenta a temperatura ambiente
- d).- Después se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1% con agitación 4 veces.

- e).- Se diluyó el conjugado (anti- IgG humana en cabra marcada con peroxidasa) 1.1000 en PBS-Tween 20 al 0.1% y se dejó reaccionar una hora en agitación .
- f).- Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y 2 veces con PBS 0.01M, pH=7.2

IV.5.6. Revelado y detección.

- a).- Las tiras de nitrocelulosa bien identificadas se sumergieron en la mezcla preparada como sustrato con agitación constante hasta que se observó el revelado de las bandas reconocidas por los anticuerpos presentes, tanto en los controles positivos como en los sueros problema (aproximadamente 10 minutos)
- b).- Se detuvo la reacción con agua de la llave y se observaron los resultados.

IV.5.7. Tinción de los marcadores de peso molecular (MPM).

- a).- En un recipiente se depositó colorante negro de amido, sumergiendo los MPM obtenidos en la membrana de nitrocelulosa y con agitación lenta se dejaron reaccionar hasta que se obtuvo una buena definición en la tinción.
- b).- Después se lavó con solución decolorante para aclarar los resultados, enjuagándolos con agua de la llave.

Por último se comparó los patrones de los marcadores de peso molecular (MPM) con los obtenidos con los sueros problemas y controles ²¹

V. RESULTADOS

Los donadores estudiados fueron diagnosticados aptos para la flebotomía después de cumplir con los requisitos obligatorios: historia clínica básica, el examen médico exploratorio y los estudio serológicos estipulados por la Secretaría de Salud (anticuerpos negativos contra el virus de la hepatitis B, hepatitis C, HIV Y VDRL).

Se analizaron 1795 muestras de donadores, el 79.67 % (1430) fueron hombres y 20.33 % (365) mujeres; de los cuales el 58 % se encuentra entre 18 y 30 años de edad, el 37 % entre 31 y 45 años y el 5 % de 46 a 60 años.

En el cuadro 1 observamos que del total de donadores estudiados con respecto al lugar de origen el 55.49% correspondieron al D.F. y el 42.61% a los estados vecinos del centro y sureste del país. Después del D.F. las personas que con mayor frecuencia acudieron son originarias del Estado de México obteniendo el 15.60% y de Hidalgo un 4.29%. Los donadores procedentes de los estados de Guanajuato, Morelos, Oaxaca, Puebla, Michoacán, Veracruz, Querétaro, Tlaxcala y Jalisco se observaron frecuencias entre el 1 y 4 % Con valores menores de 1 % correspondieron a los estados de Guerrero y Tabasco. El 1.89% son donadores originarios de otras entidades federativas del país como Sinaloa, Zacatecas, Nuevo León, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Nayarit, Aguascalientes, Yucatán.

En el cuadro número 2 se informa los datos obtenidos con respecto al lugar de residencia y número de donadores que con mayor frecuencia acuden al servicio de banco de sangre.

CUADRO 1

Datos correspondientes al lugar de origen.

ENTIDAD FEDERATIVA	NÚMERO DE DONADORES	FRECUENCIA %
D.F.	996	55.49
Edo. De Méx.	283	15.60
Hidalgo	77	4.29
Guanajuato	71	3.96
Morelos	70	3.90
Oaxaca	50	2.78
Puebla	41	2.28
Michoacán	38	2.11
Veracruz	33	1.83
Querétaro	30	1.67
Tlaxcala	25	1.39
Jalisco	19	1.06
Guerrero	16	0.89
Tabasco	12	0.67
Varios*	34	1.89
TOTAL	1795	100

*Originarios de otras entidades federativas del interior del país.

CUADRO 2

Datos correspondientes al lugar de residencia .

ENTIDAD FEDERATIVA	NUMERO DE DONADORES	FRECUENCIA %
D.F	1059	59.00
Edo De Méx.	514	28.63
Hidalgo	47.	2.62
Morelos	33	1.84
Guanajuato	29	1.61
Puebla	17	0.95
Michoacán	15	0.83
Veracruz	15	0.83
Tlaxcala	13	0.72
Querétaro	12	0.67
Oaxaca	11	0.61
Guerrero	9	0.50
Tabasco	8	0.44
Jalisco	5	0.28
Varios*	8	0.44
TOTAL	1795	100

*Residentes de otras entidades federativas del interior del país.

Con respecto al lugar de residencia observamos en el cuadro número 2 que el 59 % de la captación de donadores viven en el D.F. El 28.63% son residentes del Estado de México, el 2.62% viven en Hidalgo, el 1.84% en el Estado de Morelos y en Guanajuato el 1.61% A diferencia de los datos del cuadro 1 los donadores que radican en las entidades federativas restantes mencionadas observan frecuencias menores del 1%

Con el fin de observar el movimiento de ésta población consideramos pertinente calcular el porcentaje de migración de la muestra de donadores, con base en la comparación de los resultados de lugar de origen y de residencia (Cuadro 3)

CUADRO 3

Datos del porcentaje de migración de la población de donadores estudiada

ENTIDAD FEDERATIVA	RESIDENCIA N° DE DONADORES	ORIGINARIOS N° DE DONADORES	% MIGRACION
D.F.	1059	996	5.95i
Edo de Méx	514	283	44.94i
Hidalgo	47	77	38.96e
Morelos	33	71	53.52e
Guanajuato	29	70	58.57e
Puebla	17	50	66.00e
Michoacán	15	41	63.41e
Veracruz	15	38	60.52e
Tlaxcala	13	33	60.60e
Querétaro	12	30	60.00e
Oaxaca	11	25	56.00e
Guerrero	9	19	52.63e
Tabasco	8	16	50.00e
Jalisco	5	12	58.33e

*(e) corresponde a emigración y la (i) a inmigración .

En los datos obtenidos del porcentaje de migración observamos que los donadores residentes en el Estado de México el 44.94.% son originarios de otras entidades federativas y en forma menos relevante el D.F., que registró el 5.95% de inmigración. En contraste a estos resultados observamos a los donadores originarios de los estados de Morelos, Guanajuato, Puebla, Michoacán, Veracruz, Tlaxcala, Querétaro, Oaxaca, Guerrero, Tabasco y Jalisco que emigraron entre el 50 a 66 %, y el Estado de Hidalgo con menos del 40 % de emigración. Los resultados obtenidos con respecto a la seroprevalencia anti-T. cruzi en la población de donadores son los siguientes:

Se considera una prueba positiva a T. cruzi cuando resulte positiva en al menos dos de las técnicas empleadas y negativa cuando sean discordantes ó negativas .

De 1795 muestras estudiadas 6 fueron reactivas por la técnica de ELISA, confirmándose por inmunofluorescencia indirecta tres sueros a la dilución de 1:32 y dos a 1:64 (Cuadro 4).

Los seis sueros fueron sometidos a la prueba de Western Blot y se observó que los patrones presentados por los cinco sueros confirmados positivos son similares a los patrones de los sueros chagásicos utilizados como controles

Con respecto a los hemocultivos que hicimos de los paquetes globulares y de los plasmas todos fueron negativos.

En los datos del cuadro 4 observamos que las muestras confirmadas positivas por IFI indirecta utilizando la dilución del suero 1:32 observaron densidades ópticas mayores o iguales a 0.3 por la prueba de ELISA, y con densidad óptica mayor de 0.4 dos muestras fueron confirmadas utilizando la dilución del suero 1:64.

Para complementar los resultados de los donadores con serología positiva recopilamos los datos de lugar de origen , residencia y edad (Cuadro 5).

CUADRO 4

Resultados de la serología para T. cruzi por las cuatro técnicas utilizadas.

TECNICA	E.L.I.S.A.	I.F.I	WB	HEMOCULTIVO
Donador				
1	0.212	-	-	-
2	0.328	1:32	+	-
3	0.360	1:32	+	-
4	0.417	1:64	+	-
5	0.556	1.64	+	-
6	0.317	1:32	+	-

Para la prueba de ELISA el valor de corte D.O. (0.21),para la prueba de IFI indirecta se consideró positiva

utilizando la dilución del suero problema 1 32

CUADRO 5.

Datos de origen , residencia y edad de los donadores con serología positiva .

DONADOR	SEXO	EDAD años	RESIDENCIA	ORIGINARIOS
1	M	* .	Edo. de Méx	Edo de Méx
2	M	22	D.F.	Veracruz
3	F	35	Edo. de Méx.	Edo de Méx.
4	M	19	Veracruz	Veracruz
5	F	46	Edo. de Méx.	Edo. de Méx.
6	M	31	D.F.	Oaxaca

*No se registro la edad .

Observamos en el cuadro anterior que dos de los donadores positivos confirmados son originarios y residentes del Estado de México y uno es originario y residente de Veracruz; dos son residentes del D.F. de los cuales uno es originario de Veracruz y otro donador de Oaxaca. Las edades están distribuidas entre 18 a 50 años. Respecto al sexo está distribuido con el 65% aproximadamente de hombres y el 35 % mujeres sobre la base de los donadores positivos por la prueba de tamizaje.

Con el fin de comparar la seroprevalencia encontrada para T. cruzi con las otras pruebas serológicas obligatorias para el Banco de Sangre, solicitamos los resultados obtenidos de las pruebas de tamizaje de la población de donadores estudiada (Cuadro 6).

CUADRO 6

Comparación de la frecuencia de hallazgos serológicos entre el grupo de donadores estudiado.

SEROPREVALENCIA SOLO A		POSITIVOS A MAS DE UNA PRUEBA SEROLOGICA	SEROPREVALENCIA%
HIV	0.0%	HIV CON,HVC,HBsAg Y RPR	0.22
HVC	0.22	HVC CON, HIV,RPR	1.39
HBsAg	0.11	HBsAg CON RPR	0.39
RPR	0.27	RPR CON HVC,HIV,HBsAg	1.73
T. CRUZI	0.33	T CRUZI	0

*Las pruebas serológicas enlistadas son las siguientes prueba para la detección de anticuerpos contra el Virus del Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), para la detección de anticuerpos contra los antígenos de Hepatitis B (HBsAg) y Hepatitis C (HVC), prueba con el reactivo de RPR para la detección de Sífilis y por último la prueba para la detección de anticuerpos contra T. cruzi Total de donadores estudiados 1795

En el cuadro 6 se observan las seroprevalencias encontradas para HBsAg, HVC, anticuerpos contra el HIV, T. cruzi y la aglutinación con el reactivo de RPR en la población de donadores estudiada . Además las seroprevalencias obtenida cuando fue reactivas a más de una prueba serológica

Las prevalencias obtenidas para una sola prueba serológica son las siguientes. en primer lugar tenemos a la prueba para T. cruzi con el 0.33 %, después con el reactivo de RPR que se utiliza como prueba de tamizaje inespecífica para la detección de Treponema palidum con 0.27 %, para la prueba de HVC el 0.22 %,el 0.11 % para la prueba de HBsAg y por último la prueba de HIV obteniendo el 0.0 %. Por otra parte las seroprevalencias registradas a más de una prueba serológica se observó al reactivo de RPR con las pruebas de HVC,HIV y HBsAg obtuvo el 1.73 %, la prueba de HVC con HIV y RPR fue de 1 39 %, para HBsAg con el reactivo de RPR registró el 0.22%, y la prueba de T. cruzi observó el 0 0 % .

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En los resultados obtenidos se observa que los donadores de las entidades federativas que con mayor frecuencia asistieron al banco de sangre respecto al lugar de origen fueron: el D.F. y el Estado de México con el 55.49% y 15.60% respectivamente; les siguen los donadores de los estados de Hidalgo(4.29%), Guanajuato (3.96%), Morelos(3.90%) y con frecuencias menores del 3% los donadores procedentes de los estados de Oaxaca, Puebla, Michoacán, Veracruz, Querétaro, Tlaxcala, Jalisco, Guerrero y Tabasco. También se presenta asistencia esporádica de donadores de otros estados del país principalmente del norte.

Con respecto a los resultados observados del lugar de residencia, el 59 % son donadores que viven en el D.F. y 28.63% en el Estado de México. Aproximadamente el 78 % de los donadores estudiados son residentes del área metropolitana. En tercer lugar tenemos a los donadores procedentes del Estado de Hidalgo (2.62 %) tanto como originarios o residentes que acuden al servicio de banco de sangre, seguido de los estados de Morelos y Guanajuato con el 1.84% y 1.61% respectivamente; de las entidades federativas restantes las frecuencias de donadores fueron menores al 1%.

En México existe poca información respecto a seroprevalencia a anticuerpos anti-T. cruzi en donadores de banco de sangre. Sin embargo en estudios previos hechos en el D.F. se ha reportado que en el área metropolitana la seroprevalencia se ubica entre el 0.2 al 1.6 %. En 1985 Velasco y Sepúlveda notificaron una seroprevalencia de 0.67 % entre 150 donadores estudiados en el Centro Nacional de la Transfusión de la ciudad de México. En 1987 en un trabajo realizado en los bancos de sangre del Instituto Nacional de Nutrición, el Instituto Nacional de Cardiología y el Hospital General de Nezahualcóyolt (Monteón y col) informaron

una seroprevalencia de 1.1 % de 265 muestras de donadores, utilizando las técnicas de contra inmunolectroforesis (CIE) que es una técnica específica y de baja sensibilidad obteniendo el cero por ciento y por inmunofluorescencia indirecta (IFI) técnica de alta sensibilidad y especificidad obteniendo el 1.1 %. Posteriormente en 1989 (Salinas y cols) realizan un estudio serológico específico a hemodonadores que acudieron al Banco de Sangre del Hospital General “Rubén Leñero” encontrando una positividad del 2 % y en 1990 en el Hospital de la Mujer (Guzmán y cols) detectando el 1.6% de positividad entre sus candidatos a donadores.¹⁸ La técnica utilizada en los dos estudios anteriores fue la hemaglutinación indirecta utilizando distintos títulos de corte. En 1993 en el Instituto Nacional de Cardiología “ Ignacio Chavéz” (Ramos y col) informan una seroprevalencia de 0.28 % de 1076 donadores estudiados¹⁹. Las técnicas utilizadas fueron Dot-Elisa, ELISA en placa y electroinmunotransferencia. En otras entidades como Oaxaca las seroprevalencias en donadores oscilan entre 0.9 % al 4.4%

En 1978 (Goldsmith y col) informan una seroprevalencia de 4.4% de 298 donadores de sangre estudiados en el estado de Oaxaca¹⁶ , empleando las técnicas de fijación de complemento considerando como positivo los sueros con títulos 1:8, hemaglutinación indirecta 1:128 y aglutinación directa 1:256, considerándose los sueros positivos a una o más pruebas serológicas. En Guerrero principalmente en Acapulco, se ha informado seroprevalencias entre 0.1 a 19.0 % incluyendo a donadores remunerados . Otro dato que llama la atención son los reportes de Bayona en Puebla en (1984) que observaron el 16.5% de seroprevalencia. En Veracruz con valores de 1.6 % de una muestra de 300 donadores con títulos mayores o iguales a 1:8²². En 1991 (Eduardo Huerta y cols) informan una seroprevalencia de 4.1, 4.7 y 19.7 % en tres grupos de donadores que acudieron a la Cruz Roja de Cuernavaca Morelos, mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y por hemaglutinación indirecta, aplicándose al 72% de ellos un cuestionario epidemiológico en su preselección²².

Recientemente (Hilda Rangel y col) informa una seroprevalencia de 17 % en un estudio hecho a 318 donadores en el Banco de Sangre del Hospital Regional de Cuernavaca, utiliza la prueba de ELISA con dilución de la muestra de suero 1:26²³. En Michoacán (2.0%) de una muestra de 435 donadores analizados por la prueba de ELISA, con relación a Jalisco (Trujillo y cols) informan en 1993 una seroprevalencia de 1.28% en una muestra de 3419 donadores estudiados por la prueba de HAI²⁰.

Cuando se comparan las seroprevalencias obtenidas en población abierta como la realizada por la ENSE (Encuesta Nacional de Seroepidemiología)¹⁵, se encuentra que el Estado de México se observó en una población muestral de 2808 sujetos una seroprevalencia de cero porciento, y el D.F. de 0.2 % en una población de 2598, Oaxaca de 1418 individuos el 0.9 %, Hidalgo el 1.5 % (2005), Veracruz con 0.4 % (2213), Michoacán el cero porciento de 2045 estudiados y el Estado de Morelos el 0.1 % de 2150 sujetos. En este estudio se utilizaron las técnicas de hemaglutinación indirecta (HAI) con títulos de 1:8 como prueba filtro y la prueba de inmunofluorescencia indirecta, con títulos de 1:32, la asociación de HAI e IFI con títulos de 1:32 se consideró confirmatoria. Aunque la cobertura de este estudio no fue la idónea, se observó que la enfermedad de Chagas es irregular en todo el territorio Nacional y se recomienda realizar estudios en forma local.

Como se puede observar las seroprevalencias son muy variables y se ven involucrados factores técnicos y de interpretación. Como por ejemplo la variabilidad de los criterios de inclusión y exclusión , tamaño de la muestra, aunado a las limitaciones del diagnóstico serológico entre otros son factores que no permiten observar un panorama real de la enfermedad de Chagas. En Argentina, Brasil, Chile y Venezuela han realizado encuestas seroepidemiológicas masivas para establecer títulos de corte para considerar los límites de la población no chagásica de la chagásica.

Durante mucho tiempo los títulos fueron de 1:8 y 1:16 pero para evitar cruce inmunológico con otros padecimientos similares como leishmaniasis mucocutánea, Kala-azar y tripanosomiasis rangeli han elevado el título de corte a 1:32 Según Camargo los límites serológicos cuantitativos de individuos no infectados e infectados deben ser delimitados de acuerdo a la región

En el D F en 1995 se realizó un trabajo entre el Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), Secretaría de Salud y el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, con el objeto de tener información acerca de los antígenos de preparación local en los laboratorios participantes y observar la congruencia de los resultados de las pruebas serológicas²⁴. En este trabajo se obtuvo un índice de correlación (Kappa mayor a 0.8) identificando correctamente los sueros con y sin anticuerpos a T. cruzi utilizando antígenos preparados y con técnicas distintas (el INC utilizó ELISA en placa e IFI y el INDRE las pruebas de HAI e IFI), observando como limitante el uso de extracto crudo de antígeno por la variabilidad que presentan en la preparación.

En estudios hechos en forma local y Nacional en México vemos que los estados de Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Morelos, Veracruz y Jalisco han presentado seroprevalencias muy variables a anticuerpos anti-T. cruzi registrando valores mayores del 1 % en su población donadora Esto estudios nos permitieron identificar las zonas endémicas y considerar a los sujetos procedentes de estas entidades como individuos de alto riesgo, y con relación a nuestro estudio observamos una captación de aproximadamente el 23 0 % de individuos procedentes de las entidades antes mencionadas.

Por otra parte los datos observados del porcentaje de migración nos muestran que aproximadamente entre el 50 y 66 % de la población donadora originaria de los estados de Morelos, Guanajuato, Puebla, Michoacán, Veracruz, Tlaxcala, Querétaro, Oaxaca, Guerrero, Tabasco y Jalisco sale de sus entidades federativas de origen.

La población donadora procedente de Hidalgo registra aproximadamente el 40 % de emigración. Por otra parte en el Estado de México se observó que el 44.94 % de los donadores residentes son originarios de otras entidades del interior del país y el D.F. observó un 5.95 % de inmigrantes. Estos resultados demuestran que el Estado de México es la entidad que recibe mayor cantidad de inmigrantes, mientras que los otros estados registran salida de la población.

Al igual que en otros países vemos que los movimientos migratorios intra e internacionales de la población son factores que influyen y modifican el patrón epidemiológico tradicional de la enfermedad de Chagas ⁶. Por ejemplo en 1989 (Zicker y col) en un estudio realizado en el Banco de Sangre Central de Brasil observaron que en individuos de origen rural la seroprevalencia a T. cruzi fue de 1.8 a 16.2% vs 0. a 3.6% correspondiente a sujetos procedentes de zonas urbanas, en Bolivia, Colombia y Venezuela también se ha observado este fenómeno en forma más relevante que en México, debido a que son zonas de alta endemia y por lo tanto con mayor seroprevalencia ^{8,10,11,12,13}.

En EUA la prevalencia de donadores seropositivos es muy variable, los informes de estudios hechos en grandes ciudades como Miami y Los Angeles California en Estados Unidos, en donde en encuestas utilizando cuestionarios de selección en una población de 299,398 donadores de sangre de inmigrantes de Latinoamérica y en población de donadores ciudadanos americanos que han visitado recientemente países Latinoamericanos encontraron tasas de riesgo a la infección con T. cruzi de 0.14% ²⁵.

Aunque no se registran valores tan altos como en el centro y sur de América como Brasil, Argentina, Venezuela, Uruguay, Honduras y otros países que en la actualidad han adoptado leyes para el control de T. cruzi en los bancos de sangre ^{6,26}

En la enfermedad de Chagas los exámenes parasitológicos permiten detectar al Trypanosoma cruzi en la sangre y los exámenes serológicos los anticuerpos formados bajo el estímulo del antígeno, éste último permite solamente determinar si un individuo ha sido infectado o no por el parásito.

En los últimos años las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y en bancos de sangre como pruebas de tamizaje son: fijación de complemento, hemaglutinación indirecta (HAI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) como prueba de escrutinio o de diagnóstico, además de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y en casos especiales de investigación western blot.

Aunque estas pruebas serológicas tienen sensibilidad y especificidad mayor del 85 %, cada una puede llegar a producir resultados falsos positivos o negativos, por lo que se recomienda utilizar más de una técnica para disminuir el número de falsos e incrementar la sensibilidad del estudio^{1,2}. Las técnicas serológicas seleccionadas para éste estudio fueron las pruebas de ELISA, IFI y Western blot las cuales se encuentran estandarizadas en el Laboratorio de Inmunología teniendo una sensibilidad del 95 a 100% y una especificidad entre el 95 y 99 %
17,18

En este trabajo los resultados obtenidos de seroprevalencia a anticuerpos anti -T. cruzi en donadores de sangre fue de 0.28 %.

Las pruebas serológicas utilizadas concuerdan con los resultados, en cinco muestras de los donadores y sólo la muestra de suero de un donador fue negativa para IFI indirecta y western blot, la cual puede estar presentando reacción cruzada con otros antígenos o ser un falso positivo.

Con relación a la reacción cruzada, los antígenos de Leishmania sp, por lo conocido hasta ahora en México sólo cruzan a títulos de 1:4, por lo que se necesita utilizar los sueros a muy baja dilución y en algunos casos sin diluir para observar esta reactividad con T. cruzi. Esta característica favorece el estudio realizado, ya que los sueros que trabajamos fueron diluidos a 1:400 y podríamos descartar la posibilidad de reacción cruzada con leishmaniasis tomando en cuenta que el donador no observó lesiones cutáneas aunque puede ser procedente de zona endémica.

Con respecto a la negatividad de los hemocultivos, la probabilidad de detectar los parásitos es muy baja, si consideramos que la parasitemia es esporádica en la fase indeterminada y crónica, aunado a que la técnica tiene de un 40 a un 50 % de sensibilidad^{27,28,29}. Por otra parte el fraccionamiento de las unidades de sangre (paquete globular , plasma y concentrado plaquetario) permite que los parásitos se diluyan tanto en el paquete globular como en el concentrado plaquetario. sin embargo el hecho de no haber detectado al parásito en el hemocultivo no implica que no esté presente en las unidades de sangre, lo que sí puede sugerir es que la parasitemia esté disminuida.

T. cruzi puede sobrevivir por unos 20 hasta 42 días en refrigeración en la sangre total y en prácticamente todas sus fracciones, excepto el plasma liofilizado, la albúmina, la gamma globulina y los concentrados de factores de coagulación que se someten a procedimientos de esterilización^{30*}; las medidas de control como añadir violeta de genciana no han sido eficaces por diversos motivos como el tinte, malestar general y rash.³¹

Con relación a la probabilidad de transmisión por transfusión sanguínea Carvahlo y Dias han calculado entre el 12.5 y 25 % de capacidad infectante en estudios de seroconversión de receptores los cuales recibieron sangre contaminada ³². Para obtener estos valores se consideraron varios factores: La prevalencia de seropositivos en la población donadora, el número de unidades transfundidas, la sensibilidad de las técnicas de escrutinio

Es importante mencionar que los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología que acuden al servicio de cirugía y hematología principalmente, son con frecuencia sujetos politransfundidos los cuales tienen un mayor riesgo de infección iatrogénica. Así lo han demostrado algunos estudios realizados en Chile por Myriam Lorca y col en 1988, que trabajaron con pacientes en hemodiálisis no politransfundidos y politransfundidos, obteniéndose cero por ciento de seroprevalencia a anticuerpos anti T. cruzi contra el 9.7% en pacientes politransfundidos ³³.

En este mismo año informan de la prevalencia de la infección por T. cruzi en pacientes politransfundidos, observando el 15% contra el 2% detectado en donadores de banco de sangre, corroborando que a mayor número de transfusiones el riesgo de infección aumenta ³⁴.

Respecto a la procedencia de los donadores seropositivos a T. cruzi observamos que el 80% viven en el área metropolitana y de estos el 50 % son originarios y residentes del Estado de México. Este último dato es muy importante debido a que el Estado de México no se ha contemplado como zona endémica y que por movimientos migratorios de su población registra ahora seropositividad. Es claro que los motivos por los cuales los donadores presentan anticuerpos contra T. cruzi son diversos, como salir esporádicamente a lugares endémicos, haber recibido transfusión sanguínea, ingestión de alimentos contaminados, que en este estudio no se determinaron.

Con respecto a la edad de los donadores positivos, observamos que se encuentra distribuida entre los 18 y 50 años, no hay un grupo de edad que predomine. Observamos que de acuerdo con la población estudiada se registró un sesgo en cuanto al sexo de los donadores de sangre, aproximadamente el 80 % de los donadores son hombres y el 20 % son mujeres. Esto se debe a que la mujer presenta mayor rechazo por causas de peso, talla, embarazo, anemia. Sin embargo vemos que los donadores positivos para la prueba de T. cruzi el 60 % son hombres y el 40 % mujeres, a pesar que los hombres tienen mayor representación, su prevalencia es 0.21% y para el sexo femenino de 0.55% por lo que podría parecer haber preferencia por el sexo femenino.

Actualmente el uso rutinario de pruebas serológicas de vigilancia que han asumido los bancos de sangre a partir de la aparición de la pandemia de SIDA y su alto riesgo de transmisión por transfusión, se han incrementado los tamizajes para la detección de las enfermedades transmitida por sangre o por sus componentes.

En este estudio observamos en los datos de las pruebas de tamizaje para HIV, Hepatitis B y C y Sífilis con el reactivo de RPR, que la seroprevalencia para la prueba de T. cruzi es la más alta, aun considerando las seroprevalencias obtenidas por muestras reactivas a más de una prueba serológica, la prueba para T. cruzi registró mayor prevalencia que la prueba de HIV.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio observamos que, los donadores que acuden con mayor frecuencia al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" son procedentes del D.F. un 59.0 %, del Estado de México el 28.63 %, de los estados de Hidalgo, Guanajuato, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Morelos, Veracruz y Jalisco el 23.0 %, los cuales han registrado elevadas prevalencias a T. cruzi y por lo tanto los sujetos procedentes de estas entidades se consideran de alto riesgo. Con menos frecuencia acuden los donadores de los estados de Querétaro, Tlaxcala y Tabasco.

Los resultados obtenidos del porcentaje de migración hace evidente que este movimiento de la población fluye hacia el Estado de México y con menor frecuencia al D F. Además se observó que los donadores positivos a la prueba de T. cruzi, el 80 0% es residente del área metropolitana siendo el 50.0 % originarios de zonas que registran elevadas seroprevalencias.

La seroprevalencia obtenida para T. cruzi fue de 0.28 % y mayor que las pruebas de Hepatitis B y C, la prueba de HIV y la prueba para Sífilis, con el reactivo de RPR. Con base en estos resultados consideramos pertinente que se introduzca la prueba serológica para la detección de anticuerpos anti-T. cruzi como una prueba obligatoria para el banco de sangre, acompañada de un cuestionario de selección que contenga los datos como el lugar de origen, residencia, tipo de vivienda, animales domésticos, visitas a zonas endémicas, si ha sido transfundido en dichas zonas, que determine al donador como sujeto de estudio para la prueba.

Para obtener una selección adecuada de los donadores, considerados candidatos para la prueba de T. cruzi, nos permitimos sugerir se proporcione información tanto al personal del servicio de banco de sangre como a los donadores, mencionando la importancia y trascendencia de este estudio, para así controlar la transmisión de la infección por transfusión sanguínea.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1 - Romero Dávalo Alfredo: (1978): ENFERMADAD DE CHAGAS, Editorial CIB Primera Edición, Bolivia.
- 2.- Andrade Z., Brener L : (1972) TRYPANOSOMA CRUZI E DOENCA DE CHAGAS, Río de Janeiro Brasil.
- 3.- Velasco Castrejón Oscar (1990). LA ENFERMEDAD DE CHAGAS, Publicación Técnica del INDRE #8 Dirección General de Epidemiología., México D.F.
- 4 - Velasco C.O., Tay Z J, Lara A.R., Gutiérrez K.M.. (1990). PARASITOLOGÍA MEDICA, Editor Francisco Méndez Cervantes, México D.F.
- 5 - Craig A. Fausto: (1974). PARASITOLOGÍA CLÍNICA, Editorial Salvat 8a. Edición, Mallorca España.
- 6.- S. Wendel, Z. Brener, M.E. Camargo, A. Rassi: (1992). CHAGAS DISEASE (AMERICAN TRYPANOSOMIASIS): ITS IMPACT ON TRANSFUSION AND CLINICAL MEDICINE , ISBT BRAZIL'92 SÃO PAULO BRAZIL.
- 7.- Tay Z.J., Ortega M., Caplin R: (1972). ESTADO ACTUAL DE NUESTROS CONOCIMIENTOS SOBRE TRANSMISORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO, APORTE DE NUEVAS LOCALIDADES INFECTADAS, Revista de la Facultad de Medicina, Vol. XV, No. 3.

- 8.- Roxana Carrasco, Hortensia Miguez, Clara Camacho, Lourdes Echalar, Suzana Revollo, Tania Ampuero, Jean-Pierre Dedet: (1990). PREVALENCIA OF TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION IN BLOOD BANKS OF SEVEN DEPARTAMENTOS OF BOLIVIA. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 85 (1): 69-73.
- 9.- Fabio Zicker, Cecilia María Turchi Martelli, Ana Luisa Sampaio Sgambatti de Andrade, Simonne Almeida E Silva: (1990) TRENDS OF T. CRUZI INFECTION BASED ON DATA FROM BLOOD BANK SCREENING, Rev Inst. Med Trop. São Paulo 32(2). 132-137.
- 10 - Celina M.T. Martelli, Ana Lucia S.S. Andrade, Simonne A. Silvia, Fabio Zinker (1992). RISK FACTORS FOR TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION AMONG BLOOD DONORS IN CENTRAL BRAZIL, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 87 (3): 339-343.
- 11.- Alberto ACHE (1993): PREVALENCIA DE INFECCIÓN HUMANA POR TRYPANOSOMA CRUZI EN BANCOS DE SANGRE EN VENEZUELA, Rev Inst. Med. Trop São Paulo, 35(5): 443-448.
- 12.- Felipe Guhl, Marcela García, Regina Ching, Oscar Juliao, Carlos Jaramillo, Diana Pachón, Sandra Molina, Diana Barrios: (1994). RIESGO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS TRANSFUSIONAL EN COLOMBIA, Medicina Transfusional.
- 13.- Oscar Juliao R.M.D.: (1994). SITUACION DIAGNOSTICA ACTUAL DE T. CRUZI EN BANCOS DE SANGRE COLOMBIA; Medicina Transfusional.

- 14.- S.A. Galel, L.V. Kirchoff: (1996). RISK FACTOR FOR TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION IN CALIFORNIA BLOOD DONORS, Transfusion: 36: 227-231
- 15.- Velasco-Castrejón O, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Guzmán Bracho C, Magos C, Llausás A, Gutiérrez G, Sepúlveda J.: (1992) SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO, Salud Pública Méx. 34: 186-196.
- 16 - Goldsmith R.S., Zárate R., Kagan Y., Cedeño J, Galindo- Vasconcelos M., Paz E.: (1978) EL POTENCIAL DE LA TRANSMISIÓN EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS POR TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA HALLAZGOS SEROLOGICOS ENTRE DONADORES EN EL ESTADO DE OAXACA , Sal. Pub. Méx :20: 439-444.
- 17.- Monteón V.M., Linares Turrent C., Amador Galicia F, Ruegsegger G, Reyes PA: (1987). ANTICUERPOS SERICOS A TRYPANOSOMA CRUZI EN DONADORES DE SANGRE DE LA CIUDAD DE MÉXICO. Bioquímica. 9:6-9.
- 18.- Enfermedades Infecciosas Transmisibles por vía Sanguínea. Memorias (1991). PRIMER CONGRESO IBEROAMERICANO DE BANCOS DE SANGRE Y MEDICINA TRANSFUSIONAL. Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea Subsecretaria de Servicios de Salud.
- 19.- Ramos Echevarría A.A., Monteón-Padilla V.M., Reyes-López PA.: (1993). DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI EN DONADORES DE SANGRE, Salud Pública Méx.; 35: 56-64.

- 20 - Francisco Trujillo Contreras, Felipe Lozano Kasten, M. Margarita Soto Gutiérrez, Rene Hernández Gutiérrez.: (1993). PREVALENCIA DE INFECCION A TRYPANOSOMA CRUZI EN DONADORAS DE SANGRE EN EL ESTADO DE JALISCO, MEXICO, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 26(2):89-92.
- 21.- J Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis : (1989). MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
- 22 - Enfermedades Infecciosas Transmisibles por Vía Sanguínea Memorias. (1993) II CONGRESO IBEROAMERICANO DE BANCOS DE SANGRE Y MEDICINA TRANSFUSIONAL Centro Nacional y Centros Estatales de la Transfusión Sanguínea Subsecretaría de Servicios de Salud.
- 23 - Hilda Rangel, Rodolfo Gatica y Celso Ramos: (1998). DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST TRYPANOSOMA CRUZI IN DONORS FROM A BLOOD BANK IN CUERNAVACA, MORELOS, MEXICO, Archives of Medical Research, Vol. 29, No. 1 pp. 79-82.
- 24.- Monteón VM, Sosa T, Reyes PA: (1989). SEROLOGICAL TEST FOR AMERICAN TRYPANOSOMIASIS. COMPARATIVE STUDY Rev. Latinoam. Microbiol. · 31. 35-38.
- 25- David A. Leibi, Elizabeth J Read, Bruce A. Lenes A. Jeffrey Yund, Robert J Stumpf, Louis V. Kirchhoff, and Roger Y. Dodd: (1997). SEROEPIDEMIOLOGY OF TRYPANOSOMA CRUZI, ETIOLOGIC AGENT OF CHAGAS "DISEASE, IN US BLOOD DONORS, *The Journal of Infectious Disease*: 176: 1047-52.

- 26.- Enrique Wolpert Barraza, María Soledad Córdova, Guillermo Robles Díaz, Pedro A. Reyes López: (1994). EL PAPEL DE LA SECRETARIA DE SALUD EN LA PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES POR TRANSFUSIÓN DE SANGRE, Medicina social.
- 27.- R.A. Neal, R.A. Miles: (1977). THE SENSITIVITY OF CULTURE METHODS TO DETECT EXPERIMENTAL INFECTIONS OF TRYPANOSOMA CRUZI AND COMPARISON WITH XENODIAGNOSIS, *Rwv. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19(3): 170-176.
- 28.- Elizabeth Bronfen, Francisco Silvério de Assis Rocha, Gisele Brandão Nogueira Machado, Maria Marcia Perillo, Alvaro José Romanha, Egler Chiari: (1989). ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DO TRYPANOSOMA CRUZI POR XENODIAGNOSTICO E HEMOCULTURA DE PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 84 (2). 237-240.
- 29.- Zélia M.P. Luz, Micheli G Coutinho, J. Romen Cancado , Antonia U. Kretti: (1994). HEMOCULTURA TÉCNICA SENSÍVEL NA DETECÇÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI EM PACIENTES CHAGÁSICOS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS , *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 143-148.
- 30.- Dias JCP, Brener Z.: (1984). CHAGAS' DISEASE AND BLOOD TRANSFUSION. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79:(Suplemento) 139-147
- 31.- G.C. Vilaseca, J.A. Cerisola, J.A. Olarte and A. Zothner: THE USE OF VIOLET IN THE PREVENTION OF THE TRANSFUSIONAL TRANSMISSION OF CHAGAS - MAZZA DISEASE, *Vox Sang.* 11: 711-716.

- 32.- De Carvahlo (1991) RI DOENCA DE CHAGAS E TRANSFUSAO DE SANGUE, Primer Congreso Iberoamericano de bancos de Sangre y Medicina Transfusional. Acapulco, México.
- 33 - Myriam Lorca , Eduardo Lorca, Antonio Atias, Luis Plubins: (1988). ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PACIENTES EN HEMODIALISIS CRONICA, Prevalencia y riesgo por transfusión sanguínea, Rev.Méd. Chile 116 . 509-513
- 34 - Myriam Lorca, Jaime Lorca, Raquel Child, Antonio Atias, Marilena Canales, Eduardo Lorca, Jorge Gutiérrez: (1988). PREVALENCIA DE LA INFECCION POR TRYPANOSOMA CRUZI EN PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS, Rev. Méd Chile 112-116.

5.- H₂SO₄ 2.5 N.

H₂SO₄ ----- 13 70ml.

Aforar a 100.00ml con agua destilada.

b) Soluciones para IFI.

6.- A partir de la solución (2) PBS (10X 0 1M), se toman 100ml y se afora a 1000.00ml con agua destilada y se ajusta el pH a 7.2 con solución NaOH.

7.- Azul de Evans.

c) Soluciones para Wenster Blot (WB)

8 - Solución monomérica de acrilamida (30.8% T, 2 6% C).

Acrilamida ----- 30.00g

Bis- acrilamida ----- 0.80g.

Agua desionizada ----- 100 00ml

Filtrar a través de papel whatman No.1 a 4°C. Precaución: La acrilamida y la bisacrilamida son potentes agentes neurotóxicos.

9.- Amortiguador del gel separador (1.5 M Tris - HCl, pH=8.8),

Tris ----- 18 15g

HCl (0.1M) ----- 48.00 ml

Ajustar a pH 6.8 y aforar a 100ml con agua desionizada.

10.- Amortiguador del gel concentrador (0.5 M Tris - HCl, pH = 6.8)

Tris ----- 6.00g.

HCl (0.1 M) ----- 48.00 ml.

Ajustar a pH= 6.8 y aforar a 100 ml con agua desionizada.

11.- Solución SDS (10% w/v)

SDS ----- 10.00g.
Agua desionizada ----- 100.00ml.

12.- Persulfato de amonio (iniciador 10% w/v)

Persulfato de amonio ----- 0.50g.
Agua desionizada ----- 5.00ml.

(Se prepara al momento de utilizarse).

13.- Amortiguador de electroforesis (0.025 M Tris - 0.192 M glicina, HP = 8.3 0 1% w/v).

Tris ----- 3 00g.
Glicina ----- 14.40g.
SDS ----- 10 00 ml de la solución 4 ó 1.0g.

14.- Amortiguador de transferencia (pH =7.8 - 8.4.)

Tris ----- 3.00g.
Glicina ----- 14.40g.
Metanol ----- 200.00ml.

15.- Amortiguador de muestra.

H₂O desionizada ----- 4.00ml
Tris - HCl (0.5 M), pH=6.8 ----- 1.00 ml.
Glicerol ----- 0.80 ml.
SDS (10% p/v) ----- 1.60 ml.
Azul de bromofenol (2% p/v) ----- 0.25 ml.
2 β - mercaptoetanol ----- 0.40 ml.

(Adicionar al usarse)

Diluir las muestras 1:2 con el amortiguador de muestra y posteriormente calentar a 95°C por 5 minutos.

16.- Gel separador (10% acrilamida).

H ₂ O desionizada	-----	6.50 ml.
Tris- HCl (pH= 8.8, 1.5 M)	-----	3.30 ml
SDS (10% p/v)	-----	130.00 μ l.
Acrilamida bis	-----	5.20 ml.
Persulfato de amonio (10%)	-----	6.50 μ l.
TEMED	-----	6.50 μ l.

17.- Gel concentrador. (4% acrilamida)

H ₂ O desionizada.	-----	6.10ml.
Tris - HCl (pH 6.8, 0.5 M)	-----	2.50ml.
SDS (10% p/v)	-----	100.00 μ l. .
Acrimina bis	-----	1.30 μ l.
Persulfato de NH ₂	-----	50.00μ l.
TEMED	-----	10.00μ l

18.- MPM (Marcador de peso molecular) (1:20 con la buffer de muestra) 5 μ l de MPM + 950 μ l de buffer de muestra.

19.- PBS- Albúmina 3%.

PBS 1%	-----	100.00ml.
Albúmina bovina	-----	3.00 g.

20.- PBS- Tween 20 0.1%.

PBS 1% - - - - -	1000.00ml
Tween 20 - - - - -	1.00ml

21.- Sustrato del Blot (peroxidasa).

Cloronaftol - - - - -	30.00mg.
Metanol - - - - -	10.00ml.
PBS 0.01 M pH 7.2 - - - - -	50.00ml.
H ₂ O ₂ al 30% - - - - -	50.00 μ l

Adicionar el mismo orden de los reactivos para prepararla.

22.-Negro de Amido.

Negro de amido 10-B - - - - -	0.10 %
Metanol - - - - -	45.00%
Acido acético - - - - -	10.00 %

23.-Azul de Comassie.

CULTIVO IN VITRO DE Trypanosoma cruzi CEPA NINOA

MEDIOS DE CULTIVO PARA T. cruzi

1) MEDIO LIT.

NaCl- - - - -	4 0g.
KCl - - - - -	0.4g.
NaHPO ₄ - - - - -	8.0g.
Glucosa - - - - -	2.0g.
Triptosa - - - - -	5.0g.
Infusión de hígado - - - - -	5.0g.

Hemina (disolver en trietanolamina o NaOH para obtener una concentración de)

50mg/ml	-	-	-	25.0mg
Agua bidestilada-	-	-	-	1000 0ml
Suero fetal bovino (SFB)-	-	-	-	100 0ml

Disolver los componentes del medio de cultivo en agua bidestilada a excepción de la hemina y el suero fetal bovino, calentar, filtrar y ajustar el pH a 7.2 y posteriormente esterilizar en autoclave. El SFB se inactiva a 56 °C durante 30 minutos y se esteriliza por filtración al igual que la hemina. Por último se adicionan al medio en condiciones de esterilidad.

2) MEDIO DE CULTIVO BIFASICO ENRIQUECIDO (BHI).

Agar BHI-	-	-	-	37 0g
Agar nutritivo-	-	-	-	23 0g.
Dextrosa-	-	-	-	10.0g
Suero fetal de ternera-	-	-	-	5 al 10%.
Agua bidestilada-	-	-	-	1000.0ml.
Solución salina-	-	-	-	1000.0ml. (al 0.9% y pH 7.0).

Disolver los componentes en un litro de agua bidestilada y ajustar el pH a 7.0. Distribuir el medio en matraces erlenmeyer de 250ml depositando en cada uno 100ml

Se esteriliza en autoclave y una vez solidificado se adiciona un volumen equivalente de solución salina estéril. Por último se agrega suero inactivado (a 56 °C por 30 minutos y esterilizado por filtración). Todo esto en condiciones de esterilidad