



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Extracción y evaluación de un antígeno soluble
para el diagnóstico de la infección por
Trypanosoma cruzi.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
ERICK AMADOR GAYTÁN



TUTORA: M. en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES

2007

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Amador
Gaytán
Erick
56 19 19 25
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
098046238
2. Datos del tutor
M. en C.
Martha Irene
Bucio
Torres
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Paz Maria Silvia
Salazar
Schettino
4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Margarita
Cabrera
Bravo
5. Datos del sinodal 3
Med. Cir.
Adela
Ruíz
Hernández
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán
7. Datos del trabajo escrito
Extracción y evaluación de un antígeno soluble para el diagnóstico de la infección
por Trypanosoma cruzi
pp. 50
2007

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM con apoyo económico parcial de DGAPA IN212307-3.

DEDICATORIA

A mis padres por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional. Por lo que ha sido y será... Gracias.

A mis hermanos Jorge y Adair por su amistad, apoyo y por estar ahí en las buenas y las malas y porque simplemente hacen que la vida sea memorable.

A mi familia en especial a mis abuelitos y a mi tía Chelín por su gran cariño y por sobre todo ser unos estupendos seres humanos.

A Yadira L. porque al darme su amistad me empujo hacia adelante, al darme su amor dio luz a mi corazón, por todos los momentos que hemos compartido, por su comprensión y porque sus sabias reflexiones y su cariño incondicional son mis grandes motivaciones.

A mis amigos de la Facultad en especial a Eric y Jonathan porque fueron un gran apoyo durante la carrera, fueron fuente de sabiduría y de muy buenos momentos que espero aun no terminen, sin olvidar el que siempre puedo contar con ellos. ●●

A todas las personas que cruzaron por mi camino en algún momento y me ha brindado su amistad: mis compañeros y amigos de la secundaria, del CCH, de la Facultad y de lugares circunstanciales que unió nuestros caminos, a todos ellos nos veremos en el futuro.

Porque la vida no valdría la pena vivirla sin ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Paz Maria Salazar por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su gran apoyo y la confianza que me brindo.

A la M. en C. Martha Bucio por su apoyo, el conocimiento que me ha brindado a lo largo de este tiempo, por su paciencia y confianza que recibí para la elaboración de este trabajo.

A la M. en C. Margarita Cabrera por su apoyo en la revisión de la tesis y las valiosísimas aportaciones a este trabajo.

A la Med. Cir. Adela Ruíz por su apoyo en la revisión de la tesis y por los conocimientos transmitidos.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda por la revisión de este trabajo y por sus enseñanzas en sus clases que fueron forjando en mi el gusto por la parasitología.

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

A la Dra. Guadalupe García de la Torre por sus sugerencias.

A Lorena, por su gran apoyo en la obtención de este antígeno y en el desarrollo de este trabajo. Pero también por sus consejos y principalmente por su amistad.

A Elia, por su asesoría y ayuda en las técnicas de Electroforesis y Western-blot, pero principalmente por su amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología de Parásitos: Santiago, Mauro, Gloria, Laura, Nelia y Evita, por su amistad y los buenos momentos que hemos compartido.

A la Facultad de Ciencias y en general a la UNAM porque no hay orgullo más grande que ser hecho y formar parte de esta gran institución.

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Enfermedad de Chagas.....	2
2.2 Agente Etiológico.....	5
2.2.1 Ubicación taxonómica.....	5
2.2.2 Morfología.....	5
2.3 Vectores.....	8
2.3.1 Ubicación taxonómica.....	8
2.4 Ciclo de vida.....	10
2.5 Mecanismos de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
2.6 Patogenia.....	14
2.7 Patología.....	16
2.8 Cuadro clínico.....	17
2.8.1 Fase aguda.....	17
2.8.2 Fase indeterminada.....	17
2.8.3 Fase crónica.....	18
2.9 Respuesta Inmune a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.9.1 Invasión celular.....	19
2.9.2 Respuesta inmune.....	19
2.10 Diagnostico.....	21
2.11 Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> para el Diagnostico.....	24
3. Justificación.....	28
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos particulares.....	30
6. Metodología.....	31
6.1 Sueros Humanos.....	31
6.1.1 Criterios de Selección de las Muestras.....	31
6.2 Microorganismos.....	31
6.3 Extracción antigénica.....	32
6.4 Cuantificación de proteínas totales.....	32
6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
6.6 Electroinmunotransferencia.....	33
6.7 ELISA indirecta.....	33
6.7.1 Obtención del antígeno empleado en la técnica.....	33

6. 7. 2	Calibración de la técnica en microplaca	33
6. 7. 3	Determinación de la reactividad del extracto antigénico hacia sueros con anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> , anti- <i>Leishmania mexicana</i> y no reactivos.....	34
6. 8	Análisis estadístico	34
7.	Resultados.....	36
7. 1	Rendimiento parasitario y proteico.....	36
7. 2	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	37
7. 3	Electroinmunotransferencia (Wester-blot).....	38
7. 4	ELISA indirecta.....	39
7. 5	Reactividad antigénica y análisis estadístico	40
8.	Discusión.....	41
9.	Conclusiones.....	44
10.	Bibliografía.....	45

Extracción y evaluación de un antígeno soluble para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* afecta a millones de personas de América Latina. Esta enfermedad está asociada con factores socioeconómicos, con individuos de escasos recursos que viven en condiciones higiénico-sanitarias deficientes como es el caso de las áreas rurales. En México se ha encontrado al transmisor en todos los estados del país; aún cuando es considerado un problema en Salud Pública, a la fecha, no existen vacunas ni quimioterapias eficientes, por lo que son de suma importancia la prevención aplicando medidas de control sanitario y la detección de casos en etapas tempranas de la infección.

Los principales mecanismos de transmisión de la infección por *T. cruzi* son el natural o vectorial y la transfusión de sangre o de hemocomponentes. Normativamente, está contemplado el tamizaje en bancos de sangre, pero no es de observancia obligatoria debido a los altos costos de los reactivos comerciales. Por lo anterior, es necesario desarrollar reactivos, técnicas y procedimientos que sean eficaces, confiables y de bajo costo. En este trabajo se obtuvo un extracto antigénico (denominado Ag 21-S) a partir de una mezcla de tres cepas de *T. cruzi* aisladas y caracterizadas previamente.

El extracto antigénico regional fue caracterizado inmunoquímicamente, con lo cual se determinaron las proteínas totales, se identificaron las fracciones proteicas por peso molecular (SDS-PAGE) y se evaluó la reactividad inmune con anticuerpos anti-*T. cruzi* y normales (Western-blot). También se evaluó su sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo (con intervalos de confianza de 95%) utilizando la técnica de ELISA indirecta y sometiéndolo a 132 sueros (66 reactivos y 66 no reactivos) los cuales forman parte de la seroteca del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, con reactividades comprobadas con 2 pruebas serológicas (ELISA e IFI).

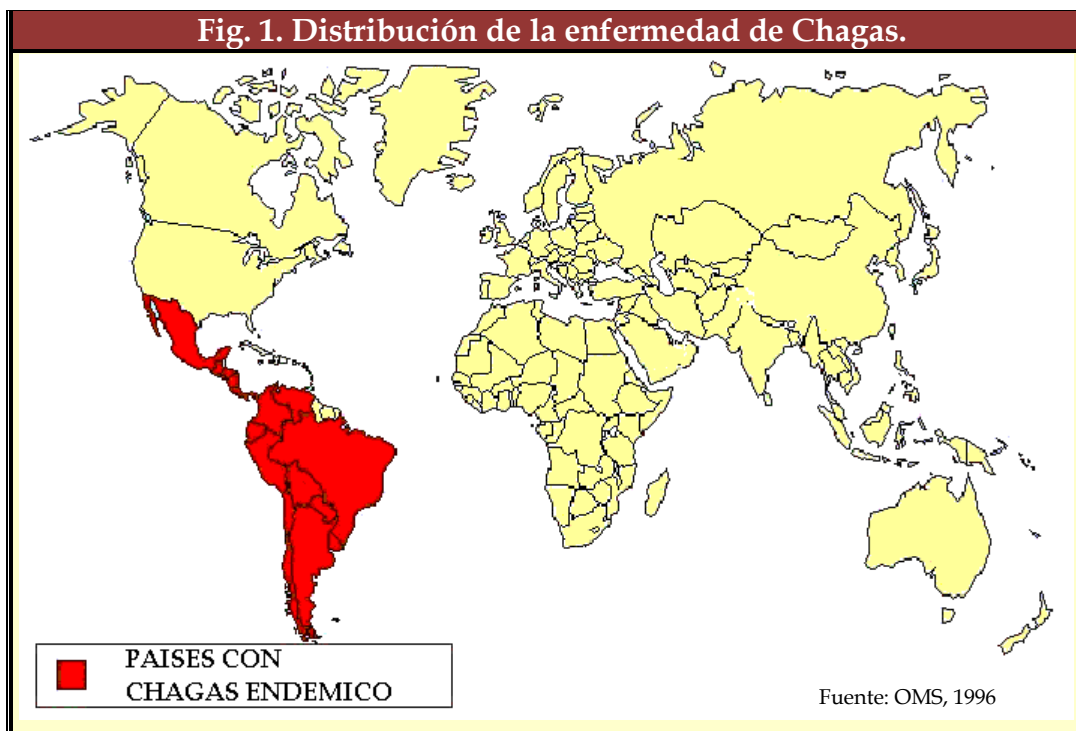
El extracto antigénico Ag 21-S presentó una sensibilidad del 96.9% y una especificidad del 100%, con valores predictivos positivo y negativo del 100% y 97% respectivamente. La reactividad hacia sueros con anticuerpos anti-*Leishmania mexicana* mostró valores (D.O.) negativos.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el antígeno 21-S utilizado con la técnica de ELISA indirecta, representa una importante herramienta confiable para el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, lo que constituye un valioso aporte para el control y la vigilancia epidemiológica sobre todo en bancos de sangre de nuestro país.

2.1 Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, fue reportada por primera vez por Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas en Minas Gerais, Brasil (Chagas, 1909) ⁽¹⁾, quién aisló al parásito en el intestino del transmisor *Panstrongylus megistus*.

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis endémica en América y constituye un importante problema de salud pública en gran número de países de América Latina (Figura 1), principalmente en Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, Uruguay, Chile, Perú, Ecuador, Venezuela, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guatemala y México.



La Organización Mundial de la Salud en 2002 estimó que en América Latina hay entre 11 y 18 millones de personas infectadas, de las cuales mueren al año aproximadamente 13 000 y alrededor de 100 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección ⁽²⁾. El cuadro 1 muestra las estimaciones de seroprevalencia de Schofield en el año 2000 para México de 540 mil casos, con 10,854 casos nuevos por año ⁽³⁾. Diversos estudios realizados en el país señalan una distribución heterogénea de la infección con seroprevalencias entre el 5 y 20 % en el área rural (Dumonteil, 1999) ⁽⁴⁾.

Cuadro 1. Estimación de la seroprevalencia e incidencia anual de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en México y América Central.		
País	Seroprevalencia	Incidencia Anual
México	540 000	10 854
Belice	600	26
Guatemala	730 000	28 387
Honduras	300 000	11 490
El Salvador	322 000	10 594
Nicaragua	67 000	2 660

Los antecedentes en México más relevantes sobre la enfermedad, son a partir de 1940 con los reportes de Luis Mazzotti de los dos primeros casos humanos en fase aguda; así como de los dos primeros vertebrados infectados por el parásito (perro y armadillo) ⁽⁵⁾. En 1984 Salazar Schettino reportó el primer caso de megaesófago con serología positiva ⁽⁶⁾; Tay J. en 1986 el primero de megacolon ⁽⁷⁾ y en 1989 Salazar Schettino describe el primer caso de transmisión por transfusión sanguínea ⁽⁸⁾. En el cuadro 2 se muestran diferentes estudios sobre Seroprevalencia en Bancos de Sangre en varios estados de la República Mexicana utilizando diferentes técnicas en las cuales se han obtenido seroprevalencias desde 0.3% en el D. F. hasta 17% en Cuernavaca, Morelos ⁽⁹⁾.

Cuadro 2. Estudios de Seroprevalencia en Bancos de Sangre de México.					
Lugar	Autor	Año	Técnica*	Donadores	%
Oaxaca	Goldsmith	1978	FC, HAI, AD	298	4.4
D. F.	Monteón	1987	IFI, CIE	265	1.1
D. F.	Ramos	1993	ELISA, dot-ELISA, W-b	1,076	0.28
Jalisco	Trujillo	1993	HAI	3,419	1.28
Yucatán	Rodríguez	1995	IFI	215	5.6
Cuernavaca	Rangel	1998	ELISA	318	17.0
D. F.	Guzmán	1998	HAI, IFI	64,969	1.5
D. F.	Monteón	1999	IFI, ELISA, W-b	3,300	0.3
Puebla	Sánchez	2002	HAI, ELISA	2140	7.7
D. F.	Cabrera	2004	HAI, ELISA	2210	6.8
Puebla	Monteón	2005	ELISA, IFI	2489	1.24
D.F.	Hernández	2005	ELISA, IFI,	43,048	0.37

*FC-Fijación del Complemento, HAI-Hemaglutinación Indirecta, AD-Aglutinación Directa, IFI-Inmunofluorescencia Indirecta, CIE-Contrainmunolectroforesis, ELISA-Inmunoensayo Enzimático, W-b-Western-blot.

Dada la importancia de este padecimiento, diversos estudios epidemiológicos han determinado que la enfermedad de Chagas está asociada directamente con factores socioeconómicos, particularmente con individuos de escasos recursos y que viven en condiciones higiénico-sanitarias deficientes; como es el caso de las áreas rurales en México en donde se ha encontrado el transmisor en todos los estados y en diferentes altitudes (Tay, 1980; Salazar-Schettino, 1983) ^(10, 11). Este padecimiento es una patología crónica que deteriora y pone en riesgo no solo la calidad de vida del individuo, sino la vida misma, convirtiéndose en una enfermedad discapacitante que impacta directamente el desarrollo socioeconómico de cada país.

Organismos Internacionales de Salud en América Latina se han dado a la tarea de que a mediano y corto plazo se puedan observar resultados de las acciones dirigidas a controlar y eliminar este mal. Por esta razón México ha adquirido los siguientes compromisos ante la OMS/OPS. En los cuales la Organización Mundial de la Salud (OMS) en mayo de 1998 declara su compromiso para la “Eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas” para el final del año 2010 y pide a los Estados Miembros con poblaciones todavía afectadas por la enfermedad de Chagas que determinen la extensión de la enfermedad, elaboren planes de acción y establezcan comisiones técnicas para la certificación de la eliminación. Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS en octubre de 1999 en la Resolución de “Fortalecimiento de los Bancos de Sangre en la Región de las Américas, insta a los Estados Miembros a dar mayor prioridad en salud a la seguridad de la sangre a transfundir y pide al Director cooperar con los Estados Miembros en fortalecer los programas de sangre y de los componentes sanguíneos, además de promover el tamizaje universal preciso y eficiente de las unidades de sangre.

Ante estos compromisos, la Facultad de Medicina de la UNAM y la Secretaría de Salud, lanzan la “Iniciativa México: Propuesta para el control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas en México”. En ésta, se proponen 7 objetivos dentro de los que se contempla establecer el tamizaje obligatorio en bancos de sangre; a este respecto, la OMS, el 6 de junio del 2000, hace un comunicado a las autoridades sanitarias del país y a la Facultad de Medicina de la UNAM expresando la satisfacción de constatar el apoyo para esta Iniciativa ⁽¹²⁾.

2.1 Agente Etiológico

2.1.1 Ubicación taxonómica

Trypanosoma cruzi es un protozooario flagelado cuya ubicación taxonómica es la siguiente (Levine, 1989) ⁽¹³⁾:

Reino: Protista
Subreino: Protozoa
Phylum: Sarcomastigophora
Subphylum: Mastigophora
Clase: Zoomastigophorea
Orden: Kinetoplastida
Suborden: Trypanosomatina
Familia: Trypanosomatidae
Género: *Trypanosoma*
Especie: *Trypanosoma cruzi*

2.1.2 Morfología

Trypanosoma cruzi presenta tres estadios morfológicos de importancia biológica: tripomastigote, epimastigote y amastigote ^(14, 15, 16).

Epimastigote. Es la forma replicativa, no infectiva naturalmente para el ser humano o mamífero y se encuentra en el vector. Es de aspecto fusiforme con 16-18 μm de longitud. El cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatomíneos por división binaria longitudinal de manera profusa para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos; también es la forma del parásito que se observa en los medio de cultivo convencionales (Figura 2).

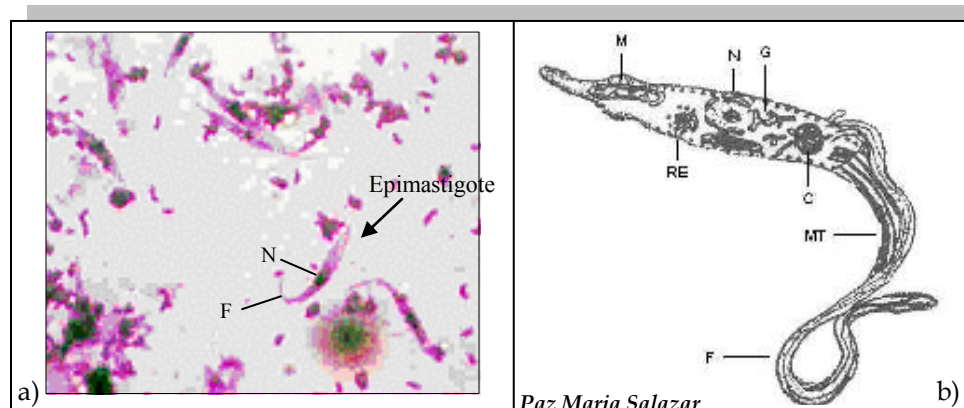


Fig. 2. a) Epimastigotes en medio de cultivo. b) Esquema de epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. C - cinetoplasto M - mitocondria RE - retículo endoplásmico N - núcleo G - aparato de Golgi MT - microtúbulos F- flagelo. Foto: Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

Tripomastigote metacíclico. Se encuentra en las heces del vector, este estadio no se reproduce y es la forma infectante natural para el hombre y otros mamíferos, esta forma se deposita con la materia fecal del vector para penetrar por mucosas o a través de piel; es flagelado, tiene forma alargada, mide entre 18 y 25 μm , presenta un núcleo vesiculoso y hacia la parte posterior de éste se localiza el cinetoplasto. El flagelo, con su membrana ondulante, se observa a lo largo del cuerpo del parásito y emerge libremente en el extremo anterior (Figura 3-a).

Tripomastigote sanguíneo. Se localiza en la sangre del huésped vertebrado; mide de 18 a 25 μm , es una forma no replicativa e infectiva para el insecto vector y el mamífero; proviene de la diferenciación del amastigote para infectar nuevas células o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito. Es flagelado, alargado en forma de C o S, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo (Figura 3-b).

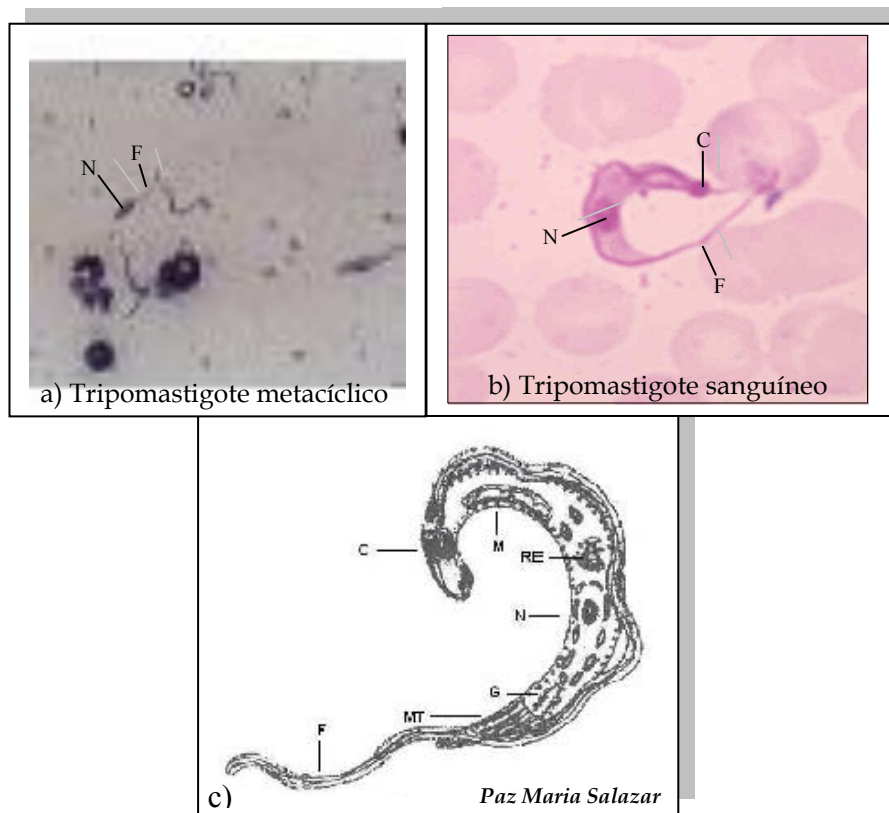


Fig. 3. a) Tripomastigotes metacíclicos en heces de vector. **b)** Tripomastigote sanguíneo en una muestra de sangre del huésped. **c)** Esquema de tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. C - cinetoplasto M - mitocondria RE - retículo endoplásmico N - núcleo G - aparato de Golgi MT - microtúbulos F- flagelo. Fotos: Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

Amastigote. Es la forma replicativa intracelular en el huésped vertebrado por división binaria simple. Esta forma proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclicos como sanguíneos y tiene la capacidad de infectar otras células. Presenta una forma esférica o subesférica aflagelar, mide de 2 a 4 μm ; el flagelo se encuentra secuestrado dentro de una bolsa visible a la microscopía electrónica de transmisión, tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto (Figura 4).

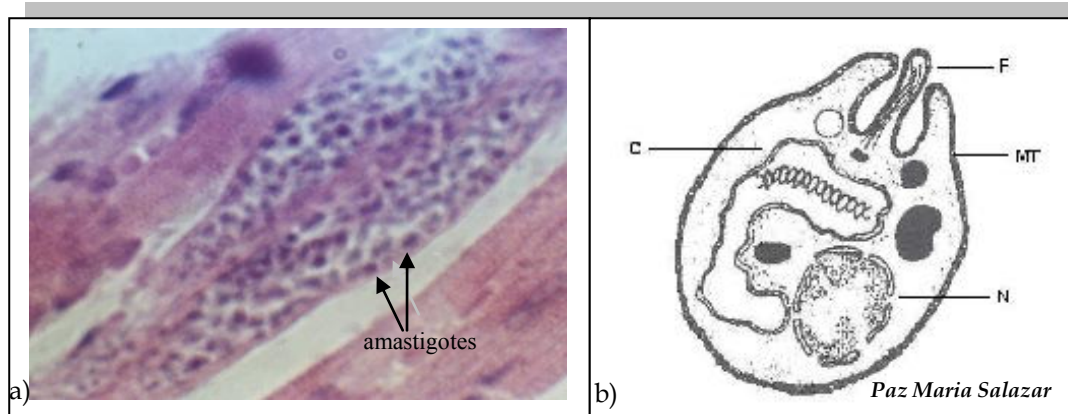


Fig. 4. a) Nido de amastigotes en tejido muscular (miocardio de ratón). **b)** Esquema de amastigote de *Trypanosoma cruzi*. C - cinetoplasto N - núcleo MT - microtúbulos F- flagelo. Foto: Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

2.3 Transmisor o vector

2.3.1 Ubicación taxonómica

Los insectos vectores de *Trypanosoma cruzi* se ubican taxonómicamente de la siguiente manera (Carcavallo, 1999) ⁽¹⁷⁾:

Phylum: Arthropoda
Clase: Hexapoda (insecta)
Orden: Hemiptera
Suborden: Heteroptera
Familia: Reduviidae
Subfamilia: Triatominae

Estos transmisores son artrópodos y todos los estadios ninfales así como los adultos son hematófagos obligados. En la República Mexicana han sido reportados ocho géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyryrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Meccus* y *Triatoma* distribuidos en todos los estados; gran número de estas especies, han sido identificadas naturalmente infectadas con *Trypanosoma cruzi* ⁽¹⁸⁾. Las especies de mayor importancia médica pertenecen al género *Triatoma* el cual tiene reportadas 24 especies en el país; específicamente a los complejos *Meccus* entre las que se encuentran *M. pallidipennis*, *M. mazzotti*, *M. picturata*, *M. longipennis*, *M. phylosoma* y *M. bassolsae* y del complejo *Protracta* en el que se incluye a *T. barberi*. ^(19,20) (Figura 5).

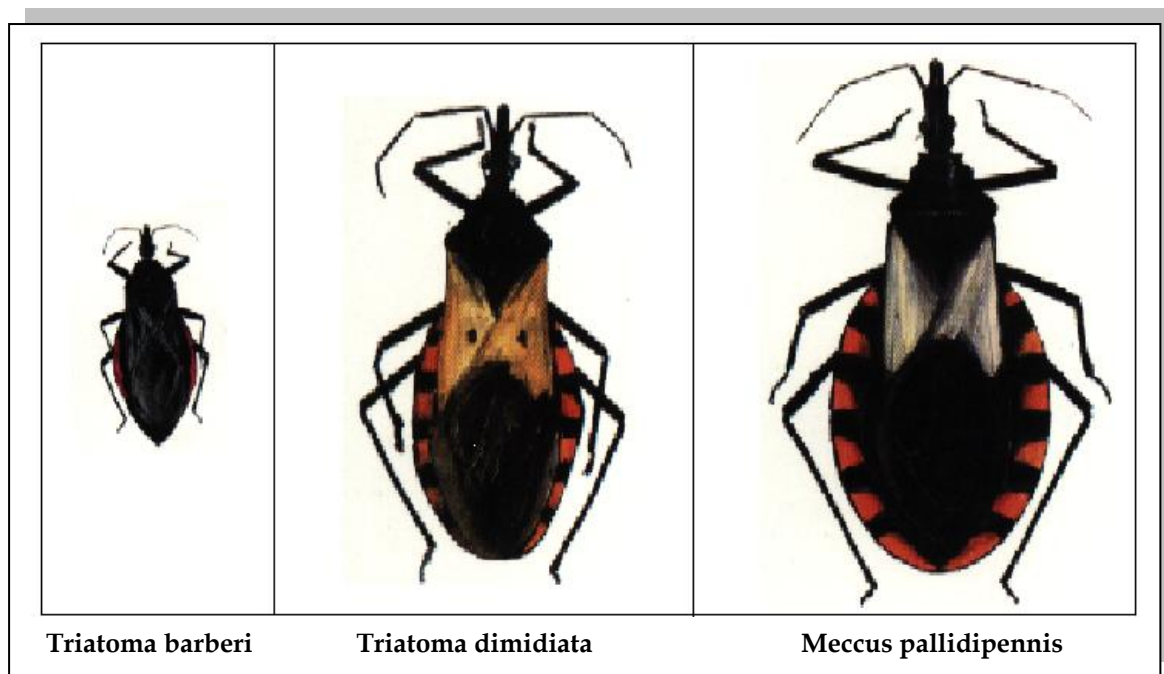


Fig. 5. Principales especies de importancia médica referidas en México. ⁽⁹⁾

El ciclo de vida de los triatominos incluye las fases de huevo, 5 estadios ninfales y adulto; su duración es variable dependiendo de la especie y de la disponibilidad de fuente alimenticia. La mayoría de las especies completan su ciclo entre 5 y 12 meses en condiciones óptimas. El tamaño del adulto varía dependiendo de la especie en un rango de 5 a 45 mm y no hay transmisión transovárica ^(9, 17, 21).

Los triatominos son de origen silvestre, asociados con pequeños mamíferos; la invasión del hábitat de estos insectos por el ser humano ha favorecido la adaptación de algunas de esas especies silvestres alrededor e inclusive dentro de las áreas donde el hombre realiza sus actividades. Por otro lado, según el grado de adaptación al domicilio humano, preferencias alimentarias, metaciclología y el tiempo de defecación, determinan la eficacia de estos insectos como transmisores.

2.4 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico de *T. cruzi* se desarrolla en la naturaleza en diferentes huéspedes, están involucrados el hombre, el artrópodo transmisor y un gran número de reservorios mamíferos, naturalmente infectados ^(15, 22).

El ciclo biológico inicia cuando los triatominos se alimentan de sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos, éstos se localizan en el intestino del insecto transmisor, donde se desarrollan hacia epimastigotes, mismos que se multiplican por fisión binaria longitudinal y en un lapso de 15 a 30 días, se transformarán en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante) en el ámpula rectal del insecto. *T. cruzi* no es transmitido por la picadura del insecto infectado, sino por encontrarse en las deyecciones penetra a través de la piel o mucosas por laceraciones que produce la probóscide del insecto al alimentarse o por el rascado ⁽¹⁴⁾. La mayoría de las especies consideradas como buenos transmisores, son los que defecan cuando están alimentándose; también es posible que el mismo huésped se infecte a si mismo al llevar las deyecciones a una solución de continuidad de la piel, hacia alguna mucosa o la conjuntiva ocular. El vector muestra cierta preferencia de picar en las uniones mucocutáneas, como son el ángulo palpebral externo y las comisuras de la boca, de ahí que reciba en algunas regiones el nombre de chinche besucona, cabe señalar que la picadura suele ser indolora en la mayoría de las especies, debido a las sustancias anestésicas que inoculan al momento de alimentarse ^(15, 22).

Los triatominos se vuelven infectivos 8-10 días después de haber picado a un huésped infectado y se mantienen así durante el tiempo que reste para completar su ciclo de vida ^(10, 22) (Figura 6).

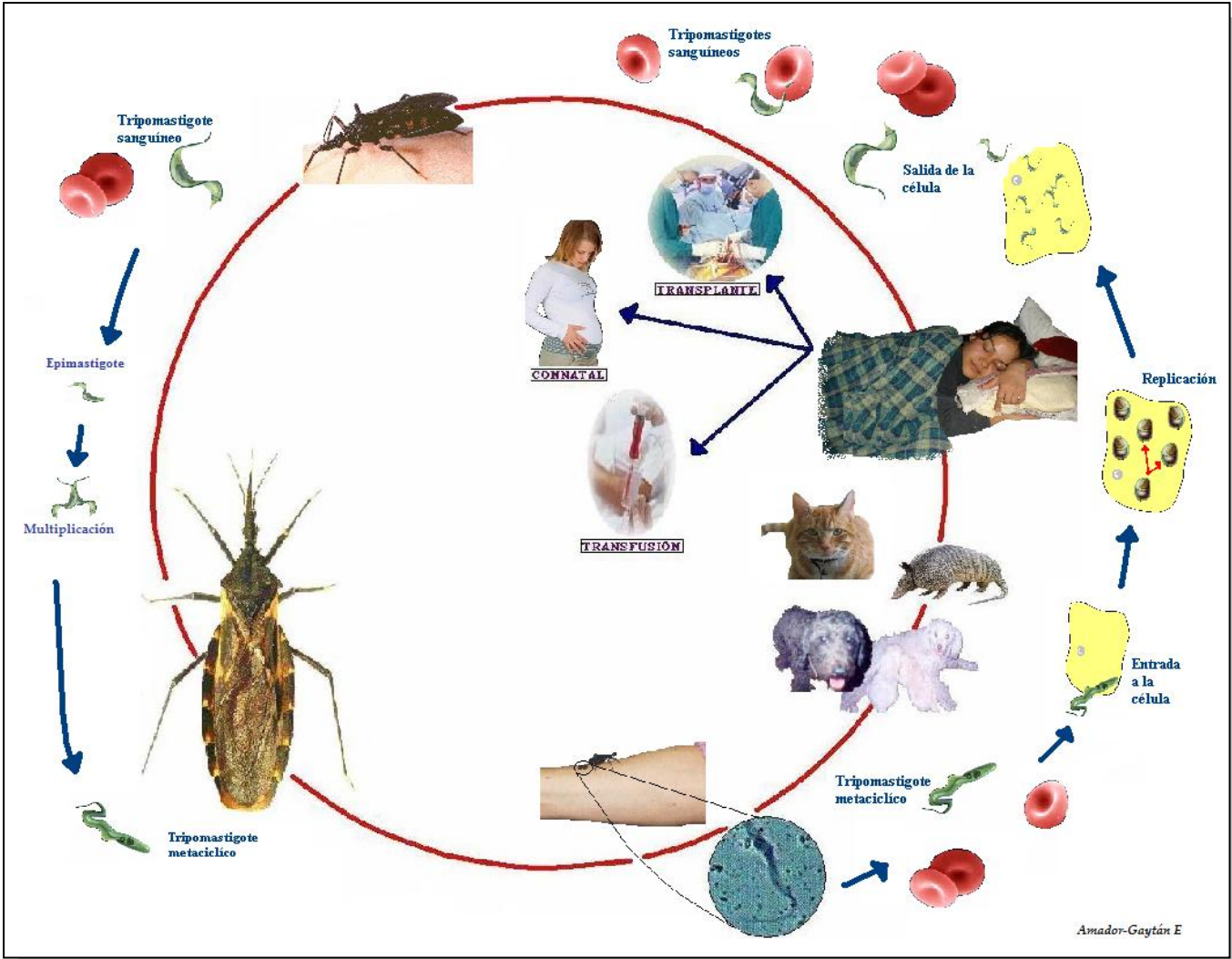


Figura 6. Ciclo Biológico Natural de *Trypanosoma cruzi*, en el cual se involucra el hombre, el vector y los reservorios mamíferos, naturalmente infectados.

2.5 Mecanismos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

El cuadro 3 muestra los principales mecanismos de transmisión de *T. cruzi*, de éstos el más importante en salud pública, por ser el más frecuente es la forma natural por medio del insecto hematófago infectado (Chagas rural).

El segundo mecanismo de transmisión debido a su frecuencia es por transfusión de sangre o de los componentes sanguíneos y por trasplantes de órganos ^(23, 24, 25) y tejidos (Chagas urbano). Actualmente se ha observado que en zonas no endémicas existen personas infectadas con *T. cruzi*, lo cual se debe al desplazamiento de individuos provenientes de áreas endémicas hacia zonas urbanas o no endémicas como esta ocurriendo en casos no autóctonos diagnosticados en Estados Unidos y Canadá con la posibilidad de ser hemodonadores. De esta forma, la infección puede extender sus límites geográficos y transformarse en un riesgo mundial ^(26, 27).

Cuadro 3. Principales mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas.
<ul style="list-style-type: none">• Natural o vectorial - Por medio del insecto hematófago infectado• Transfusión sanguínea o de sus componentes• Transmisión CONNATAL o vertical de la madre al producto• Ingestión de artrópodos infectados, alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos o con orina.• Manejo de animales contaminados• Accidentes de laboratorio

En 1949, en Belo Horizonte, Brasil, se llevo a cabo el primer estudio en hemodonadores reactivos con la prueba de fijación del complemento. Los primeros casos por transfusión, fueron reportados por Pedreira de Freitas en Sao Paulo en 1952. Posteriormente, otros casos fueron descritos en Argentina, Venezuela, Chile Bolivia y paulatinamente en todos los países de Latinoamérica.

En la transmisión connatal, la infección del producto por vía trasplacentaria desde la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada. La infección del hijo es posible durante el proceso de parto, e incluso por la leche de la madre infectada como había sido expresado por el mismo Carlos Chagas desde 1909 lo que actualmente ha sido comprobado experimentalmente y con casos clínicos comprobados ⁽²⁸⁾.

Mecanismos poco comunes y por lo tanto, de escasa importancia epidemiológica son el oral, que ocurre al alimentarse de triatominos infectados, o bien, a través de alimentos que hayan tenido contacto con materia fecal de un vector infectado ⁽²⁹⁾. Por manejo de animales infectados, se han referido casos contraídos al desollar

animales silvestres o peridomésticos infectados ⁽²⁴⁾. Existen también casos adquiridos por infección accidental en centros de investigación, por manipulación de transmisores, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de casos humanos o reservorios ⁽²⁴⁾.

2.6 Patogenia

La interrelación entre el parásito y su huésped es consecuencia de muchos años de co-evolución, durante los cuales, los parásitos se han seleccionado al presentar las moléculas idóneas en los procesos de reconocimiento y expresar así las funciones requeridas en el proceso de infección. Las moléculas involucradas en la penetración del tripomastigote en las células del vertebrado, lo cual es esencial para la supervivencia del parásito, deben exponerse al menos temporalmente para establecer la infección. Al mismo tiempo, esta exposición permite al huésped dirigir la respuesta inmune hacia estas moléculas, lo que se encamina a disminuir la parasitemia ⁽³⁰⁾.

T. cruzi ha desarrollado una fase intracelular que lo hace capaz de evadir la respuesta inmune del huésped, además de presentar una amplia oferta antigénica. Moléculas presentes en la superficie membranal del parásito y receptores sobre la membrana de las células del huésped son esenciales para la adhesión e internalización del parásito para establecer la infección ⁽³⁰⁾.

El cuadro 4 muestra los principales factores relacionados con el parásito y el huésped mediante los cuales *Trypanosoma cruzi* produce lesión. Estos factores determinan la presencia y evolución de la infección ⁽³¹⁾.

Cuadro 4. Principales factores relacionados con la patogenia.	
Parásito	Huésped
<ul style="list-style-type: none">• polimorfismo• tropismo• virulencia• constitución antigénica• cantidad de parásitos en el inóculo	<ul style="list-style-type: none">• constitución genética• sexo• edad• especie• raza• infecciones• respuesta inmunológica• temperatura• estado nutricional y dieta

La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y en otros mamíferos, se ha atribuido principalmente a la distribución geográfica de pleomorfas que presenta de manera natural *T. cruzi*; los parásitos, regionalmente pueden mostrar características biológicas distintas, como son el tropismo, la virulencia y patogenicidad entre otras.

Algunos investigadores definen diferentes tipos de cepas con base en su morfología, parasitemia, índice de multiplicación y patogenicidad en el ratón. Métodos bioquímicos permiten analizar los productos de expresión génica utilizando isoenzimas. La electroforesis de isoenzimas es uno de los métodos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos (zimodemos) ⁽³²⁾.

Miles y col. en 1981 introdujeron la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi* identificando 3 zimodemos en cepas de Brasil ⁽³²⁾.

Observaciones experimentales y en humanos demuestran claramente que aun cuando *T. cruzi* puede parasitar cualquier célula del organismo, existen cepas con tropismos bien definidos para células, tejidos u órganos. Las células más frecuentemente parasitadas son macrófagos, fibroblastos, neuroglia central o periférica y células musculares estriadas o lisas.

La heterogeneidad de poblaciones de *T. cruzi* ha sido mencionada como causa de diferentes manifestaciones clínicas y de la distinta respuesta terapéutica en la enfermedad de Chagas, la resistencia de este parásito a los fármacos no es la misma en todas las cepas aisladas. Se ha visto que la patología de la enfermedad de Chagas difiere según el área geográfica en donde se contrajo la infección. Miles y col. sugirieron que la distribución geográfica de los síndromes de megaviscera estaría relacionada con la cepa infectante ⁽³⁰⁾.

2.7 Patología

Se exhiben primordialmente lesiones de tipo inflamatorio y lesiones a nivel neuronal, en las cuales el daño principal se debe a la lesión directa del parásito al invadir las células del huésped con la consecuente lisis celular por la multiplicación y el proceso inflamatorio localizado, provocando daños irreversibles en los órganos afectados. La respuesta inmediata del huésped al parásito parece ser resultado directo a la multiplicación de *T. cruzi*, de este modo la multiplicación y/o mecanismos de sensibilización provocan lesiones en el huésped. Adicionalmente pueden ocurrir alteraciones degenerativas en células no parasitadas como consecuencia de trastornos isquémicos o metabólicos inducidos por el proceso inflamatorio o por fenómenos de autoinmunidad ⁽⁹⁾.

En la fase aguda, los amastigotes de *T. cruzi* se dividen en el interior de las células del huésped, destruyéndolas. Los parásitos liberados pueden invadir a otras células, las cuales sufren el mismo proceso y de este modo se provoca así una reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos, estas reacciones se observan en las zonas cercanas en las que se encuentran los nidos de amastigotes y dependiendo de la etapa de la enfermedad presentan rasgos característicos. Durante la fase crónica los focos inflamatorios son escasos, menos aparentes e irreversibles, presentan fibrosis peri e intraganglionar y reducción en el número de neuronas ^(33, 34).

Las células lisadas del huésped por los parásitos desencadenan una intensa respuesta inmune, la cual en casos severos puede generar una miocarditis aguda o la destrucción de ganglios nerviosos autónomos del tracto digestivo e incluso una meningoencefalitis con manifestaciones severas y en ocasiones son fatales principalmente en menores de edad y ancianos ⁽³⁵⁾.

2.8 Cuadro clínico

El periodo de incubación es generalmente asintomático; dura aproximadamente de 7-10 días en casos de transmisión vectorial y de 20-40 días en casos de transmisión por transfusión sanguínea ⁽²⁴⁾. La evolución de la enfermedad se caracteriza por presentar tres fases; la aguda, la indeterminada y la crónica.

2.8.1 Fase aguda

El 70% de los individuos infectados permanecen asintomáticos. Se caracteriza por la presencia del parásito en sangre. En la mayoría de las personas, la enfermedad no es diagnosticada debido a que los signos y síntomas no son muy específicos y a que muchos de estos individuos no cuentan con servicio médico e incluso también por desconocimiento de la enfermedad por el mismo personal de salud. Menos del 5% presentan las manifestaciones clínicas patognomónicas que integran el complejo primario caracterizado por el chagoma de inoculación, patología cutánea caracterizada por la presencia de un nódulo subcutáneo y el signo de Romaña que ocurre en los casos de entrada a través de la conjuntiva y que se presenta como un edema bpalpebral unilateral, no doloroso, frecuentemente acompañado de crecimiento de nódulos linfáticos regionales. Este signo persiste hasta por 4 a 8 semanas (Figura 7). Las manifestaciones sistémicas más importantes son fiebre vespertina de 38°C, taquicardia, adenitis, linfangitis, hepato-esplenomegalia, astenia, diaforesis, hiporexia, cefalea, mialgias y artralgias (Prata, 1994) ^(4, 36).

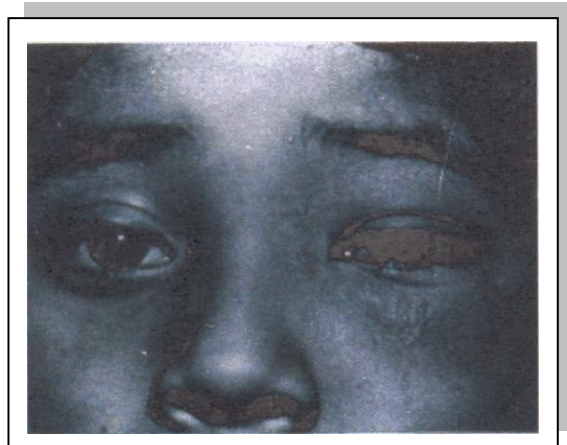


Figura 7. Signo de Romaña en un niño de 9 años de edad, procedente del estado de Oaxaca. Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

2.8.2 Fase indeterminada

Los individuos infectados cursan asintomáticos, aproximadamente un 70% nunca desarrollan lesiones. Esta fase se caracteriza por la lenta multiplicación de los parásitos dentro de las células y sólo es detectable por serología ⁽²⁹⁾.

2.8.3 Fase crónica

Puede aparecer 10 a 20 años después de la fase aguda, en la que puede o no haber síntomas. Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, suelen presentar crecimiento con daño irreversible de corazón (Figura 8) u otros órganos como el esófago o colon (megaesófago o megacolon) (Figura 9). Lo más sobresaliente en esta fase es la insuficiencia cardiaca o también puede presentarse la muerte súbita (29).

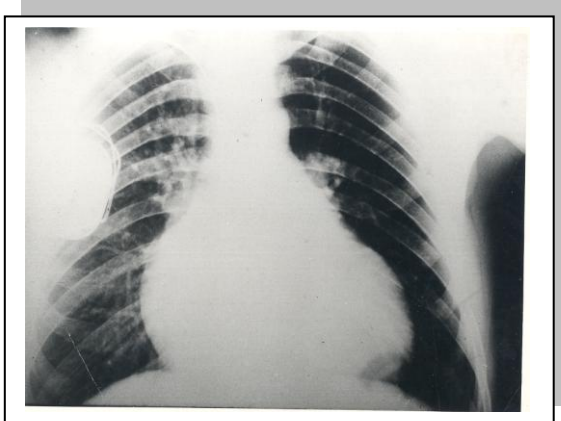


Fig. 8. Cardiomegalia grado III con Marcapaso implantado en forma definitiva. Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

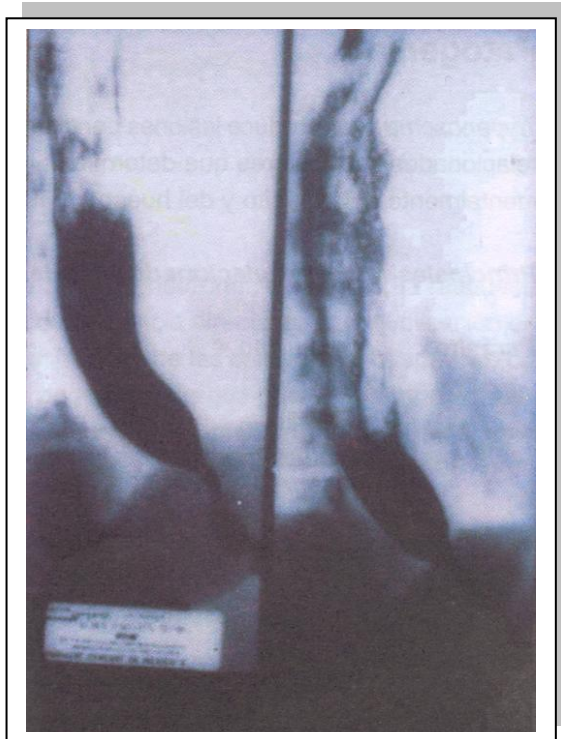


Fig. 9. Megaesófago chagásico, con odinofagia, disfagia y regurgitaciones con acalasia y serología positiva. Cortesía Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM.

2.9 Respuesta Inmune a la Infección por *Trypanosoma cruzi*

2.9.1 Invasión Celular

Trypanosoma cruzi puede infectar muchos tipos celulares; el parásito reconoce diferentes tipos de receptores de las células del hospedero; sus principales células blanco son las células fagocíticas y en especial los macrófagos, que representan la primera línea invadida, no obstante un mecanismo inusual de invasión se ha reportado en células no fagocíticas tales como los fibroblastos y otros tipos celulares experimentales, como las células HeLa y MDCK ⁽³⁵⁾.

2.9.2 Respuesta Inmune

Trypanosoma cruzi induce en el huésped vertebrado una respuesta inmune específica y altera en forma inespecífica y generalizada la funcionalidad del sistema inmune. La respuesta inmune defiende al huésped contra los efectos de la invasión parasitaria desde el momento de la infección, realizando un papel preponderante en el control del número de parásitos en el organismo. Los mecanismos desarrollados evitan que una eventual reinfección de lugar a una nueva fase aguda. A pesar de esta actividad protectora, el microorganismo no es eliminado y se establece una relación huésped-parásito condicionada por las características de ambos y por factores ambientales que tiende a llevar la infección aguda a la cronicidad. Durante la fase aguda de la infección, en los pacientes ha sido descrita una severa inmunodepresión, cuyo nivel más importante coincide con el pico más elevado de la parasitemia ⁽⁹⁾.

En la fase indeterminada de la infección, la respuesta inmune se restablece. En la fase crónica el parasitismo es escaso en contraposición con la presencia de una miocarditis intensa debida, según algunos autores a fenómenos de autoinmunidad ya que algunos epitopos del parásito pueden desarrollar una reacción cruzada con antígenos propios, estudios realizados en conejos infectados con *T. cruzi* y con fracciones subcelulares del mismo han comprobado una intensa respuesta inmune mediada por células que se presenta tanto contra el parásito como contra antígenos de miocardio ⁽⁹⁾.

En la lisis de epimastigotes y tripomastigotes se ha demostrado la efectividad de mecanismos citotóxicos, además de la liberación de antígenos del parásito por células infectadas que pueden adsorberse tanto a células sanas como infectadas haciéndolas susceptibles a la lisis mediada por anticuerpos o a la acción citocida.

La infección por *T. cruzi* durante la fase aguda, estimula una respuesta humoral específica con niveles altos de anticuerpos del tipo IgM, para incrementarse posteriormente los de las clases IgG e IgA, lo cual orienta para el reconocimiento de infecciones recientes o crónicas ⁽⁹⁾. Las inmunoglobulinas de tipo IgG1 y IgG2 presentan una frecuencia mayor. Altos títulos de anticuerpos de IgG1 y IgG3 anti

Trypanosoma cruzi se han observado en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica, y en crónicos asintomáticos, mientras que otros estudios han reportado niveles altos de Anti IgG1 en pacientes con cardiomiopatía severa ^(36, 37). En ensayos *in-vitro* ha sido observado que los anticuerpos interactúan con el tripomastigote circulante induciendo su lisis y pueden presentar anticuerpos adheridos a su superficie y ser lisados por acción del complemento, además el parásito puede evadir la acción de los anticuerpos por un mecanismo de «capping» ⁽⁹⁾.

Se ha observado también la presencia de activación policlonal e inmunosupresión desarrolladas durante las fases aguda o crónica de la enfermedad ⁽⁹⁾.

Trypanosoma cruzi se caracteriza por ser un parásito con una gran variedad antigénica. Sus moléculas de membrana cambian constantemente al pasar de un ciclo a otro, lo que demuestra una complejidad biológica y complica el panorama de crear una vacuna eficaz. No obstante se han estudiado antígenos dominantes como el antígeno HSP70 que determinan la respuesta en el huésped y en algunos casos induce una respuesta que es utilizada como mecanismo de evasión (cruzipain) ⁽³⁵⁾.

2.10 Diagnóstico

Para hacer un diagnóstico preciso y oportuno de la infección por *T. cruzi*, es de suma importancia considerar los mecanismos de transmisión, la fase clínica de la infección, así como la fisiopatología y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. A partir del diagnóstico se establecerán las medidas terapéuticas e incluso el monitoreo de programas sanitarios de vigilancia epidemiológica y control del padecimiento ⁽⁹⁾.

La presencia de formas parasitarias y de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico de laboratorio. Por esta razón, los métodos de diagnóstico son clasificados en parasitológicos e inmunológicos.

El cuadro 5 muestra algunos de los métodos empleados para el diagnóstico parasitológico, están indicados durante la fase aguda de la infección la cual es de muy corta duración. Estos métodos son menos utilizados ya que requieren mucho tiempo y necesitan personal altamente especializado. Los resultados están disponibles en 1-6 meses después de realizado el examen.

Cuadro 5. Diagnóstico Parasitológico	
Técnica	Características
<ul style="list-style-type: none">Examen directo, frotis y gota gruesa	Se realiza en la fase aguda de la enfermedad, observando en el microscopio óptico una gota de sangre fresca, o bien, teñida para la observación de los tripomatigotes sanguíneos ⁽⁹⁾ .
<ul style="list-style-type: none">Microhematocrito y métodos Strout	Métodos directos de concentración parasitaria ⁽³⁷⁾ .
<ul style="list-style-type: none">Xenodiagnóstico	Consiste en la alimentación de Triatominos no infectados mantenidos en laboratorio con la sangre del individuo sospechoso. El contenido intestinal del insecto es examinado 30-60 días después para observar al tripomastigote metacíclico ⁽³⁷⁾ .
<ul style="list-style-type: none">Hemocultivo	Método que permiten la multiplicación del parásito; por lo que generalmente se emplea para aislar y mantener las cepas en el laboratorio ⁽³⁷⁾ .

Los procedimientos serodiagnósticos ideales para la detección de la infección deberán ser fáciles de realizar, con resultados relativamente rápidos, reproducibles y de bajo costo además de tener sensibilidad y especificidad aceptables. Las pruebas serológicas de más alta sensibilidad son aquellos que detectan concentraciones muy bajas de anticuerpos como es el caso del inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta), de reactividad intermedia como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI) y existen otras de reactividad baja, actualmente ya en desuso en la mayor parte de los centros de diagnóstico.

Los métodos serológicos son utilizados en las fases indeterminada y crónica de la enfermedad. La OMS define para la confirmación de seropositividad, demostrar reactividad en 2 o mas pruebas serológicas ^(9,37).

Para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, la OPS/OMS, recomienda especialmente el uso de las pruebas mostradas en el cuadro 6.

Cuadro 6. Diagnóstico Inmunológico	
Técnica	Características
<ul style="list-style-type: none"> • Hemaglutinación indirecta. 	<p>La técnica consisten en adsorber antígenos solubles a eritrocitos, es una técnica relativamente fácil y accesible, presenta una alta sensibilidad pero su especificidad es menor en comparación con otras técnicas ⁽⁹⁾.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunofluorescencia indirecta. 	<p>Valora las concentraciones de anticuerpos con diferentes diluciones del suero, utiliza el parásito completo; la reacción es revelada empleando un fluorocromo (antigammaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína). Las laminillas se observan en microscopio de luz ultravioleta ⁽⁹⁾.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • ELISA indirecta. 	<p>Esta técnica se basa en la adsorción del antígeno a una superficie inerte (poliestireno); se realizan dos incubaciones, una con el suero problema (primer anticuerpo) y otra con la antigammaglobulina humana conjugada con la enzima (segundo anticuerpo) La reacción se revela con el sustrato enzimático correspondiente, dando finalmente la coloración característica del cromógeno empleado, la lectura se realiza en espectrofotómetro ⁽³⁸⁾.</p>

Estas pruebas pueden llegar a presentar variaciones en cuanto a reproducibilidad y concordancia de los resultados obtenidos con diferentes métodos, procedimientos y reactivos antigénicos empleados en los diferentes centros de diagnóstico. Se ha observado que *T. cruzi* presenta reactividad cruzada especialmente en pacientes con leishmaniasis, lo que representa una necesidad el contar con antígenos de alta especificidad y que contribuyan a diagnósticos de mayor confiabilidad.

2.11 Antígenos de *Trypanosoma cruzi* para el Diagnóstico

En *T. cruzi* la presencia de antígenos, concentración e inmunogenicidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito. Estos antígenos pueden estar representados por fracciones proteicas y glucoproteicas totales o fracciones purificadas (De Lima, 2001) ⁽³⁹⁾.

Aunado a lo anterior, en determinadas áreas endémicas pueden coexistir las infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* sp. Estos flagelados poseen determinantes antigénicos compartidos que cruzan serológicamente entre sí y debido a esto, la especificidad en el inmunodiagnóstico representa un gran reto ⁽⁴⁰⁾.

El primer gene codificado para un antígeno de *T. cruzi* fue secuenciado en 1986, desde entonces, muchos genes han sido identificados y parcialmente o completamente secuenciados ⁽³⁰⁾.

Las técnicas serológicas constituyen una importante herramienta en la confirmación del diagnóstico de la enfermedad de Chagas inaparente y crónico y se basan en la detección de anticuerpos específicos, sus inicios se remontan a 1913, cuando Guerreiro y Machado describieron la prueba de fijación de complemento (Guerreiro y Machado, 1913). Desde entonces el diagnóstico serológico es aplicado; con el cual es posible detectar Inmunoglobulinas M y G en las primeras semanas de la etapa de la infección aguda, y permaneciendo la detección de la IgG en las etapas crónica de la infección indeterminada, cardíaca y digestiva ⁽⁴¹⁾.

A partir de ese primer paso desde 1913 y hasta la fecha, se han realizado numerosos esfuerzos con el objeto de perfeccionar cada vez más el serodiagnóstico, mejorando tanto la sensibilidad como la especificidad y así, Kelsner en 1936 obtuvo a partir de epimastigotes un antígeno somático crudo con baja especificidad. En 1938 Liem y Van Thiel secan los parásitos y los conservan al vacío en refrigeración. Davis en 1943 introduce la centrifugación de los medios de cultivo, el uso del timerosal y el congelamiento en hielo seco; la extracción de este antígeno fue modificada por varios investigadores con lo cual mejoró su eficacia. Muniz y Freitas en 1944 demostraron por vez primera la presencia de componentes antigénicos comunes en diferentes fases del parásito ⁽⁹⁾.

Boyden en 1951 empleó por primera vez la prueba de hemaglutinación indirecta con el antígeno de Davis con buenos resultados y Camargo en 1966 estandarizó para el diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana la técnica de inmunofluorescencia, prueba que inicialmente Coons en 1941 había utilizado para la detección de antígenos bacterianos (citado por Brener y Andrade) ⁽⁴²⁾. Voller en 1975 estandarizó y evaluó el empleo de la técnica de ELISA indirecta en microplaca para ser

empleada en estudios seroepidemiológicos relacionados con la enfermedad de Chagas ⁽⁴³⁾.

En Argentina, Segura en 1974 separó de su cultivo de epimastigotes 5 fracciones subcelulares (nuclear, mitocondrial, lisosomal, microsomal y fracciones de citoplasma celular) además del homogeneizado de la fracción soluble para valorar la eficacia de estos antígenos para su empleo con fines diagnósticos e inmunoprotectores ⁽⁴⁴⁾.

Trypanosoma cruzi es altamente inmunogénico y presenta una oferta antigénica amplia para el hospedador vertebrado, con proteínas periféricas localizadas en su membrana celular y cuya presencia e inmunogenecidad pueden variar en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito así como también antígenos compartidos, ninguno de los estadios presenta inmunodominantes y a diferencia de otros tripanosomátidos, plasmodia y babesia, no se presentan mecanismos de variación antigénica ^(39, 40).

Debido a que la membrana del parásito es la primera y más importante área de contacto con el huésped, tiene especial interés el estudio de las proteínas y glicoproteínas que la conforman, en las cuales en estas últimas los oligosacáridos representan entre 2 y 10% enlazados a la cadena peptídica. El estudio de la membrana celular del parásito permite definir diferentes patrones de proteínas para cada estadio. Existen glicoproteínas estadio específicas comunes a diferentes cepas y se ha reportado variación en la composición de glicoproteínas tipo mucina en epimastigotes de diferentes aislados de *T. cruzi*, así como entre diferentes estados de un mismo aislado. La composición glucoproteica de este parásito cambia durante su diferenciación de un estadio a otro ⁽³⁹⁾.

La glicoproteína mayor de 90 kD descrita por Snary en 1979 esta presente en la superficie celular en las fases de amastigote, epimastigote y tripomastigote empleada con éxito para el diagnóstico diferencial de *T. cruzi* con *T. rangeli* y *Leishmania spp.* Nogueira en 1981 y 1982 la refirió como el principal antígeno detectado en sueros de pacientes crónicos al describir inicialmente dos antígenos mayores de superficie en 6 cepas estudiadas, una glicoproteína de 75 kDa específica en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y otra de 90 kDa encontrada en los tripomastigotes sanguíneos y amastigotes y concluye que no presentan reactividad cruzada entre sí y plantea la factibilidad de su empleo con fines inmunoprolifáticos. Esta glicoproteína de 90 kDa también fue referida como el principal antígeno detectado en sueros de pacientes crónicos ⁽⁴⁵⁾.

La glicoproteína de superficie de 72 kDa descrita por Araujo en 1984 ⁽⁴⁶⁾ y Ferguson en 1985 ha sido encontrada en las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico, al parecer ausente en las formas sanguíneas y en el amastigote ⁽⁴⁵⁾; los trabajos de Joiner en 1985 demostraron que esta glicoproteína es el sitio receptor en la

membrana del factor C3 del complemento involucrado en la lisis de epimastigotes por la vía alterna del complemento en sueros normales de mamíferos, en contraste al estado de tripomastigote metacíclico infectivo, el estado de amastigote y el tripomastigote sanguíneo no son lisados cuando se incuban con suero humano ⁽⁴⁷⁾; está presente en las fases aguda y crónica de la enfermedad y con los trabajos de Schechter en 1986 se comprobó su presencia en cepas, clonas y sueros de pacientes independientemente del origen geográfico de los mismos ⁽⁴⁸⁾.

Nogueira y Schechter describieron otra glicoproteína de 75 kDa presente en los estadios que se desarrollan en el transmisor la cual no presenta cruce inmunológico y no se relaciona bioquímicamente con la de 90 kDa ⁽⁴⁵⁾. Los trabajos de Fischer en 1988, responsabilizan a una glicoproteína de 58 kDa obtenida de tripomastigotes de cultivos de inhibir la unión celular con el factor C3 del complemento humano ⁽⁴⁹⁾.

Scharfstein estudió otra glicoproteína de 25 kDa, la cual es aislada de la superficie de todas las fases y en diferentes cepas del parásito, con buena reactividad en sueros chagásicos provenientes de diferentes áreas endémicas y sin cruce en sueros de pacientes con Leishmaniasis. Con el fin de mejorar el inmunodiagnóstico, especialmente en áreas donde las leishmaniasis son coendémicas con la enfermedad de Chagas, Tachibana propuso el empleo de esta glicoproteína además de un anticuerpo monoclonal que a la microscopía electrónica la reconoce como un antígeno común en la membrana plasmática y el axonema ⁽⁴⁵⁾.

Araujo en 1986 describió un complejo de antígenos de Peso Molecular (P.M.) entre 21 y 31 kDa, los cuales fueron evaluados con buenos resultados diagnósticos y sin cruce con *Leishmania braziliensis* y *L. donovani* ⁽⁵⁰⁾.

La presencia de antígenos y complejos inmunes en el plasma, ha sido confirmada tanto en animales infectados como en pacientes en fases aguda y crónica, por lo que están siendo estudiados para evaluar su utilidad con fines diagnósticos.

Bongertz en 1981 describió en animales de experimentación la presencia de antígenos de *T. cruzi* en orina durante la fase aguda de la infección; Corral en 1984 también lo refirió en niños con infección aguda o congénita; Katzin en 1989 en pacientes crónicos y Umezawa en 1993 estudió un antígeno excretado en orina en el 60% de pacientes humanos en fase crónica, cuyo peso molecular se localiza entre 150-160 kDa ⁽⁴⁵⁾.

Actualmente, se han buscado diferentes alternativas para mejorar las pruebas diagnósticas, muestra de esto son estudios basados en la utilización de amastigotes como antígenos para el diagnóstico de diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas con la técnica de inmunofluorescencia de la cual se refieren mejores resultados que el usar epimastigotes para este fin ⁽⁵¹⁾, pero en la mayoría de los estudios se realizan con antígenos recombinantes; Gruber en 1993 caracterizó 2, de los

cuales 1 de ellos al ser probado con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, normales y con otras patologías parasitarias es propuesto como un candidato promisorio para el diagnóstico de la enfermedad. Almeida en 1990 realizó estudios al respecto en bancos de sangre. Krieger en 1992 durante la fase aguda de la enfermedad y Lorca en 1992 y 1993 en pacientes sintomáticos y asintomáticos y en pacientes crónicos ⁽⁴⁵⁾.

El primer estudio coordinado para la evaluación del diagnóstico potencial de antígenos recombinantes fue llevado a cabo por la OMS en 1990; un estudio de 17 antígenos recombinantes que involucró la participación de diversos laboratorios, en donde a cada suero se le realizó la prueba desarrollada por cada laboratorio. Este estudio debido a los buenos resultados obtenidos permitió aumentar el valor de los antígenos recombinantes para ser utilizados en las pruebas de diagnóstico ⁽⁵²⁾. Otros trabajos como el de Umezawa en 2003 han tenido como objetivo identificar antígenos con mayor especificidad a la infección por *T. cruzi*, Umezawa en su estudio utilizó mezcla de antígenos recombinantes de *T. cruzi* (B13, 1F8 y H49) utilizando la prueba de ELISA en la que determinó valores altos de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas ⁽⁵³⁾. La OMS/OPS señala la utilidad de los métodos serológicos y moleculares en las diferentes situaciones que se presentan respecto al diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (cuadro 7).

Cuadro 7. Métodos serológicos y moleculares para el diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> *.					
SITUACIÓN	CONVENCIONALES			NO CONVENCIONALES	
	ELISA	IFI	HAI	Antígenos recombinantes	PCR
Confirmación de caso clínico (Se recomiendan dos pruebas) ¹	X	X	X	X	
Control de sangre a transfundir (Se recomienda una prueba) ¹	X		X		
Detección de infección congénita (Se recomiendan dos pruebas)	X	X		X	X
Investigación epidemiológica (Se recomiendan dos pruebas) ²	X	X	X		
Seguimiento a paciente tratado (Se recomiendan dos pruebas) ¹	X	X	X	X	X

1. Únicamente cuando un programa de control de calidad con componentes interno y externo haya sido instalado. 2. Toma de muestra en papel filtro.

* Modificado de: Taller Internacional de Epidemiología, Diagnóstico y Control de la Enfermedad de Chagas. Oaxaca, Oax. México. UNAM, SSA, OMS/OPS. 7-9-Nov. 2002.

3. JUSTIFICACION

En México, como en otros países, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, durante las fases indeterminada y crónica, cuya evolución, a diferencia de la fase aguda es muy prolongada, se realiza con técnicas capaces de detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero; para estos fines, la OMS/OPS recomienda principalmente la técnica de ELISA indirecta, debido a su alta sensibilidad y especificidad, además de la ventaja de poder automatizarse con lo que se facilita el procesamiento de gran número de muestras en un tiempo relativamente corto lo que la hace idónea en encuestas epidemiológicas así como para el tamizaje en bancos de sangre; por otro lado, debido a la gran variedad de cepas del parásito con diversos comportamientos biológicos a nivel regional, se requiere obtener antígenos que al ser extraídos de varias cepas, pueda incrementarse la sensibilidad ante sueros de individuos provenientes de diversas regiones del país.

En México, la normatividad relacionada con esta enfermedad, recomienda observar las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud y los reglamentos emanados de ésta, en donde se señala la obligatoriedad en el tamizaje de componentes sanguíneos, así como la confirmación serológica de casos. Estas normas, aun cuando existen, a la fecha no son de observancia obligatoria debido principalmente al alto costo de estos reactivos comerciales.

Por esta razón, se requiere obtener y evaluar un extracto antigénico de *T. cruzi* para su empleo en los centros de diagnóstico del país y que al ser de procedencia mexicana, disminuirá los altos costos que se tienen al emplear reactivos comerciales extranjeros y poder así cumplir satisfactoriamente con los compromisos contraídos por las autoridades sanitarias ante la OPS/OMS para el control y erradicación de la enfermedad en México.

4. HIPOTESIS

Si con el empleo de antígenos extraídos de un aislado regional se obtienen sensibilidad y especificidad adecuadas; entonces, el empleo de antígenos extraídos de mezclas de aislados obtenidos de tres de los transmisores más importantes del país, podrá incrementar la reactividad diagnóstica para su aplicación masiva en el serodiagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, en las diversas áreas geográficas del país.

5.1 Objetivo general

Evaluar un extracto antigénico sensible y específico obtenido a partir de tres cepas de *Trypanosoma cruzi*, para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante la técnica de ELISA indirecta con fines diagnósticos.

5.2 Objetivos particulares

- i. Obtener tres extractos antigénicos de aislados (previamente caracterizados), provenientes de diferentes regiones y de los tres principales transmisores del país.
- ii. Determinar la concentración proteica de los extractos antigénicos obtenidos.
- iii. Identificar las fracciones proteicas de los antígenos por peso molecular (SDS-PAGE).
- iv. Evaluar la reactividad inmune de las fracciones proteicas (Western-blot).
- v. Calibrar el extracto antigénico con la técnica de ELISA.
- vi. Evaluar la reactividad y cruce inmunológico del extracto antigénico (ELISA).
- vii. Determinar sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de la técnica de ELISA indirecta.

6.1 Sueros Humanos

Para la validación de la técnica de ELISA utilizada de rutina en nuestro Laboratorio (Bucio, 99) ⁽⁵⁴⁾ se utilizó un panel de 50 sueros (25 reactivos y 25 no reactivos) proporcionados por el Instituto Mario Fatalla Chaben de la República de Argentina, ya que éste es un Centro de Referencia de Diagnóstico de la enfermedad de Chagas para la OPS/OMS, por lo consiguiente se consideró como estándar de oro (cuadro 8); una vez validada la técnica de ELISA de rutina de nuestro Laboratorio, fue utilizado como estándar de oro para evaluar el nuevo procedimiento. Para la evaluación del extracto antigénico 21-S frente a sueros regionales, se utilizaron 132 sueros (66 reactivos y 66 no reactivos) procedentes de diversas áreas geográficas de México los cuales forman parte de la seroteca del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, con reactividades comprobadas mediante dos técnicas serológicas diferentes. Para evaluar cruce inmunológico se utilizaron 5 sueros de individuos con Leishmaniasis cutánea (4 con la forma clínica localizada y 1 con la diseminada), proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Cuadro 8. Validación de la técnica de ELISA de rutina.		
ELISA con Antígeno UNAM 26-M	Antígeno Argentina	
	Infectados	Normales
Positivo	POSITIVOS VERDADEROS	POSITIVOS FALSOS
Negativo	NEGATIVOS FALSOS	NEGATIVOS VERDADEROS

6.1.1 Criterios de Selección de las Muestras:

- 1.- Ser sueros obtenidos por punción venosa.
- 2.- Después de la recolección haber sido filtrados y glicerinados v/v.
- 3.- Estar almacenados en tubos con tapón de rosca estéril.
- 4.- Estar identificados con fecha de toma, folio y estado de procedencia.
- 5.- Contar con dos o más resultados serológicos de reactividad concordante.

6.2 Microorganismos

Se utilizaron tres cepas de *T. cruzi*, caracterizadas previamente, denominadas Tequesquitengo, aislada de un ejemplar de *Meccus pallidipennis* del estado de Morelos; Querétaro de *Triatoma barberi* del estado de Querétaro y Xalapa de *Triatoma*

dimidiata del estado de Veracruz; estas cepas forman parte del cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Se realizó la curva de crecimiento de las tres cepas en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Triptose Medium) enriquecido con 5% SFB en incubación a 28° C para determinar el inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

La primera expansión parasitaria se realizó al inocular los cultivos en proporción 1:5 en matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de rosca; la segunda a los siete días en matraces de 1000 ml y al final de la tercer expansión se realizó la cosecha parasitaria. En ese momento el parásito se encontraba polimórfico en los estadios de epimastigote, esferomastigote y tripomastigote. El volumen final para determinar el rendimiento parasitario fue de 500 ml de medio de cultivo de cada aislado.

6.3 Extracción antigénica

Después de la cosecha parasitaria, se realizaron cuatro lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 2750 g (3500 rpm)/4°/20 min. Se desechó el último sobrenadante y se cuantificó la masa parasitaria por peso (gr). La masa parasitaria se resuspendió en PBS pH 7.2 en dilución 1:1.5 para realizar la lisis y fraccionamiento parasitario por sonicación mediante un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50) 7 pulsos de 40 watts durante 60 segundos con intervalos de enfriamiento de 60 segundos en baño frío de hielo/etanol. El producto final se centrifugó a 23 000 g (10 000 rpm)/4°/30 min. Se retiró el sobrenadante, el cual se denominó Ag 21-S, se cuantificó para determinar rendimiento parasitario, se fraccionó en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -20°C.

6.4 Cuantificación de proteínas totales (Lowry, 1951) ⁽⁵⁵⁾

Se cuantificaron las proteínas totales por el método de Lowry modificado, construyendo una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA 10mg/ml) en concentraciones de 0.125, 0.250, 0.375 y 0.500 mg/ml. Se realizaron dos diluciones del extracto antigénico en PBS pH 7.2 (1:16 y 1:24). La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro para microplaca a 680 nm, se obtuvo el promedio de las lecturas y se calcularon las concentraciones finales en mg/ml. La cuantificación proteica se realizó en los días 1, 7 y 30 y posteriormente en los meses 2, 3, 4, 5 y 6.

6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) ⁽⁵⁶⁾

La separación por peso molecular de los componentes de los extractos antigénicos se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles homogéneos de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador al 12.5% con dodecil-

sulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en un equipo Mini Protean III de Electrophoresis Cell (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial constante de 100 Volts durante aproximadamente 60 min con una fuente de poder Bio-Rad® Modelo 200/2.0. El volumen de muestra se ajustó para contener aproximadamente 100 µg de proteína por carril de 12 mm. Se emplearon marcadores de peso molecular comerciales de rango amplio entre 10 y 250 kDa (Bio-Rad®). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Las electroforesis se realizaron en los días 60, 90 y 180.

6.6 Electroinmunotransferencia (Western-blot) (Towbin, 1979) ⁽⁵⁷⁾

Después de la electroforesis, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm (Bio-Rad[®]) en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad[®]) a una diferencia de potencial constante de 12 volts durante 30 minutos; la nitrocelulosa fue bloqueada con una solución PBS/Tween 20 0.3% / leche deshidratada descremada 5% (DIFCO) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS/Tween 20 0.3% y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi* en dilución 1:500 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0.3% y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG humana unida a peroxidasa (Zymed*) en dilución 1:15 000 durante 2 hrs a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 5 lavados y se colocó el sustrato correspondiente DAB (3,3' Diaminobenzidina) en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se frenó con agua destilada. Las electroinmunotransferencias se realizaron los días 30, 60, 90, 120 y 180.

6.7 ELISA indirecta (Voller, 1975) ⁽⁴³⁾

6.7.1 Obtención del antígeno empleado en la técnica

Para realizar la prueba de ELISA indirecta se ajustó la concentración proteica del antígeno en PBS pH 7.2 para contener aproximadamente 830 µg/ml de proteína; se cuantificó y fraccionó en alícuotas de 1 ml en microtubos para criopreservación con tapón de rosca para su almacenamiento y conservación a -20° C.

6.7.2 Calibración de la técnica en microplaca

La prueba de ELISA indirecta se realizó en placas de poliestireno de alta unión de 96 pozos con fondo plano (Costar). El sistema se calibró inicialmente determinando la reactividad con diferentes concentraciones de antígeno y conjugado; la titulación del antígeno inicialmente se realizó en diluciones de 1:100 hasta 1:1200 y después en una titulación fina con diluciones de 1:400 hasta 1:700. El conjugado anti IgG humano unido a peroxidasa (Zymed®) se tituló en diluciones entre 1:6000 y 1:11000 y en titulación fina entre 1:8000 y 1:10000. El sistema se estandarizó inicialmente con tres sueros de origen humano previamente titulados en dilución

1:200 con reactividades confirmadas con 2 técnicas (ELISA e IFI) con densidades ópticas (DO) conocidas: 0.430 reactivo alto (RA), 0.215 reactivo bajo (RB) y 0.017 negativo o normal (N).

El antígeno se adsorbió a la placa en dilución 1:500; el bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con PBS-leche al 5% y los lavados con PBS-TWEEN 20 al 0.05%; los sueros se incubaron en dilución 1:200 a 37°C durante 30 min; el conjugado empleado fue anti IgG humana unido a peroxidasa en dilución 1:10000 en incubación durante 30 min, también a 37°C; se empleó como sustrato peróxido de hidrógeno al 30% y el cromógeno, O-fenilendiamina en tabletas de 10 mg (Zigma®). Para frenar la reacción se empleó ácido sulfúrico 1N. La lectura se realizó en espectrofotómetro para microplaca (Microplate Reader Bio-Rad Mod. 550) con filtro de lectura de 490 nm y de referencia de 595 nm. Los títulos de corte se determinaron tomando en consideración el promedio de los valores de sueros no reactivos más 2 ó 3 desviaciones estándar (Sn-1); se consideraron valores positivos con lecturas iguales o superiores a 0.200 (DO), zona gris entre 0.180 y 0.199 y negativos los inferiores a 0.180 (DO).

6.7.3 Determinación de la reactividad del extracto antigénico hacia sueros con anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-*Leishmania mexicana* y no reactivos.

Las técnicas de ELISA e IFI realizadas en el Laboratorio de Biología de Parásitos se evaluaron utilizando como estándar de oro un pánel de 50 sueros (25 reactivos y 25 no reactivos a *T. cruzi*) previamente titulados y proporcionados por el Instituto Nacional de Chagas Dr. Mario Fatała Chaben de Buenos Aires, Argentina.

Una vez que se estandarizó el sistema para la prueba de ELISA, se analizaron 132 muestras (66 reactivas y 66 no reactivas, considerando como estándar de oro las técnicas de ELISA e IFI evaluadas inicialmente; además se evaluó la reactividad con los 5 sueros de pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

6.8 Análisis estadístico ⁽⁵⁸⁾

Para la evaluación de las pruebas serológicas empleadas (ELISA e IFI), se realizó el análisis comparativo de los resultados serológicos al estimar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo con Intervalos de Confianza al 95% como a continuación se señala:

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Positivos Verdaderos}}{\text{Positivos Verdaderos} + \text{Negativos Falsos}} = \quad \times 100$$

$$\text{IC}_{95\%} = \frac{\text{Sensibilidad} \pm 1.96 \sqrt{[(p q)] \div n}}{p = \text{Sensibilidad}} \\ q = 1 - p$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Negativos Verdaderos}}{\text{Negativos Verdaderos} + \text{Positivos Falsos}} = \text{X } 100$$

$$\text{IC}_{95\%} = \text{Especificidad} \pm 1.96 \sqrt{[(p \cdot q)] \div n}$$

p = Especificidad
q = 1 - p

$$\text{VALOR PREDICTIVO +} = \frac{\text{Positivos Verdaderos}}{\text{Positivos Verdaderos} + \text{Positivos Falsos}} = \text{x } 100$$

$$\text{I.C. } 95\% = \text{Valor predictivo positivo} \pm 1.96 \sqrt{[(p \cdot q)] \div n}$$

p = Valor Predictivo Positivo
q = 1 - p

$$\text{VALOR PREDICTIVO -} = \frac{\text{Negativos Verdaderos}}{\text{Negativos Verdaderos} + \text{Negativos Falsos}} = \text{x } 100$$

$$\text{I.C. } 95\% = \text{Valor predictivo negativo} \pm 1.96 \sqrt{[(p \cdot q)] \div n}$$

p = Valor Predictivo Negativo
q = 1 - p

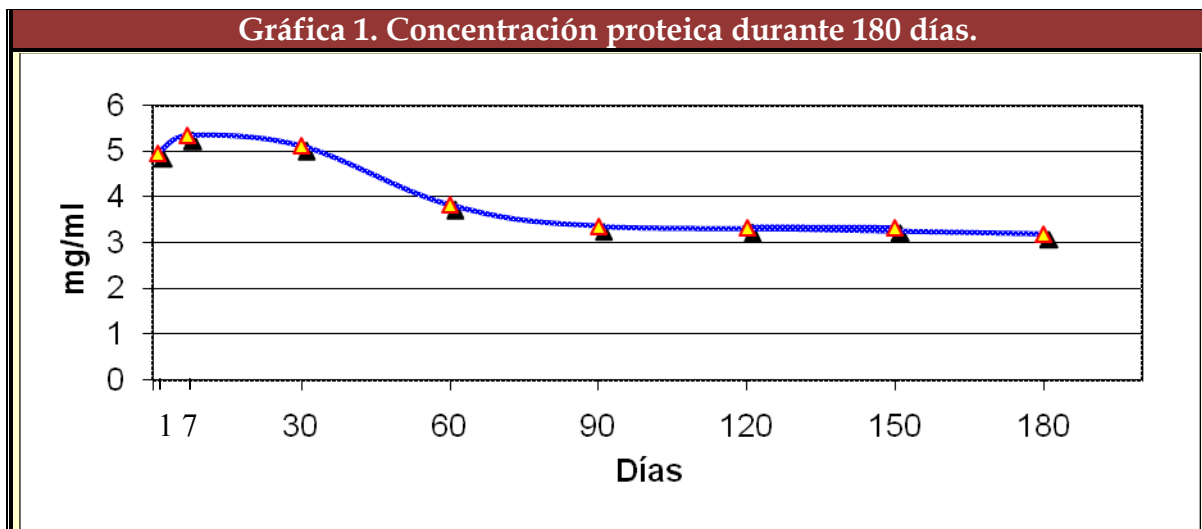
De las 50 muestras analizadas con ambos antígenos se calculó una sensibilidad de 96%, especificidad de 100% con valor predictivo positivo de 100% y negativo de 96.15% para la prueba de ELISA y en el caso de IFI se calculó una sensibilidad de 92% con especificidad de 100%, con valor predictivo positivo de 100% y negativo de 92.5%. El análisis estadístico de los 132 sueros analizados, se realizó considerando como estándar de oro las técnicas de ELISA e IFI evaluadas previamente (cuadro 9).

Cuadro 9. Validación de la técnica de ELISA con el nuevo antígeno 21-S.		
ELISA con Antígeno UNAM 21-M	Antígeno UNAM 26-M	
	Infectados	Normales
Positivo	POSITIVOS VERDADEROS	POSITIVOS FALSOS
Negativo	NEGATIVOS FALSOS	NEGATIVOS VERDADEROS

7.1 Rendimiento parasitario y proteico

Se cosecharon 1 500 ml de medio de cultivo que produjo una masa parasitaria de 1.0633 gr. El extracto antigénico se obtuvo en cantidad de 15 ml con una concentración proteica inicial de 4.958 mg/ml como lo indica el cuadro 10. En la gráfica 1 se muestran las cuantificaciones proteicas subsecuentes realizadas cada 30 días durante 6 meses.

Cuadro 10. Rendimiento proteico.		
Volumen (ml)	Proteínas totales (mg/ml)	Proteínas totales (mg)
15	4.958	74.370



7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El patrón de corrimiento electroforético (SDS-PAGE) al 12.5%, mostró varios componentes de los cuales se determinó el peso molecular de 14 que mostraron mayor relevancia (92, 77, 70, 62, 48, 45, 38, 30, 26, 22, 19, 18, 16 y 14 kDa) (Figura 10).

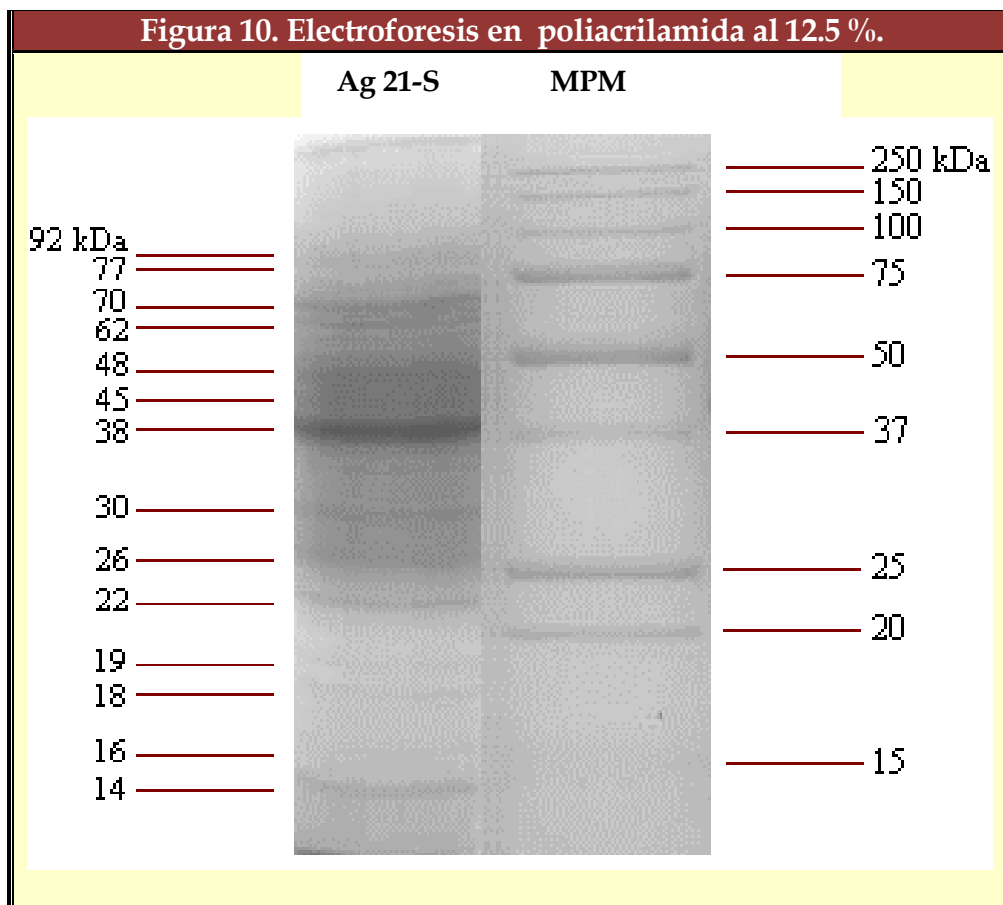


Figura 10. Componentes presentes.

7.3 Electroinmunotransferencia (Western-blot)

Al evaluar la reactividad de los componentes en el extracto antigénico 21-S contra un pool de sueros reactivos a *Trypanosoma cruzi*, se observaron 12 componentes relevantes, que corresponden a los siguientes pesos moleculares 210, 72, 62, 48, 45, 38, 37, 30, 27, 22, 18 y 14 kDa, también se evaluó la reactividad del extracto antigénico contra un suero negativo (Figura 11).

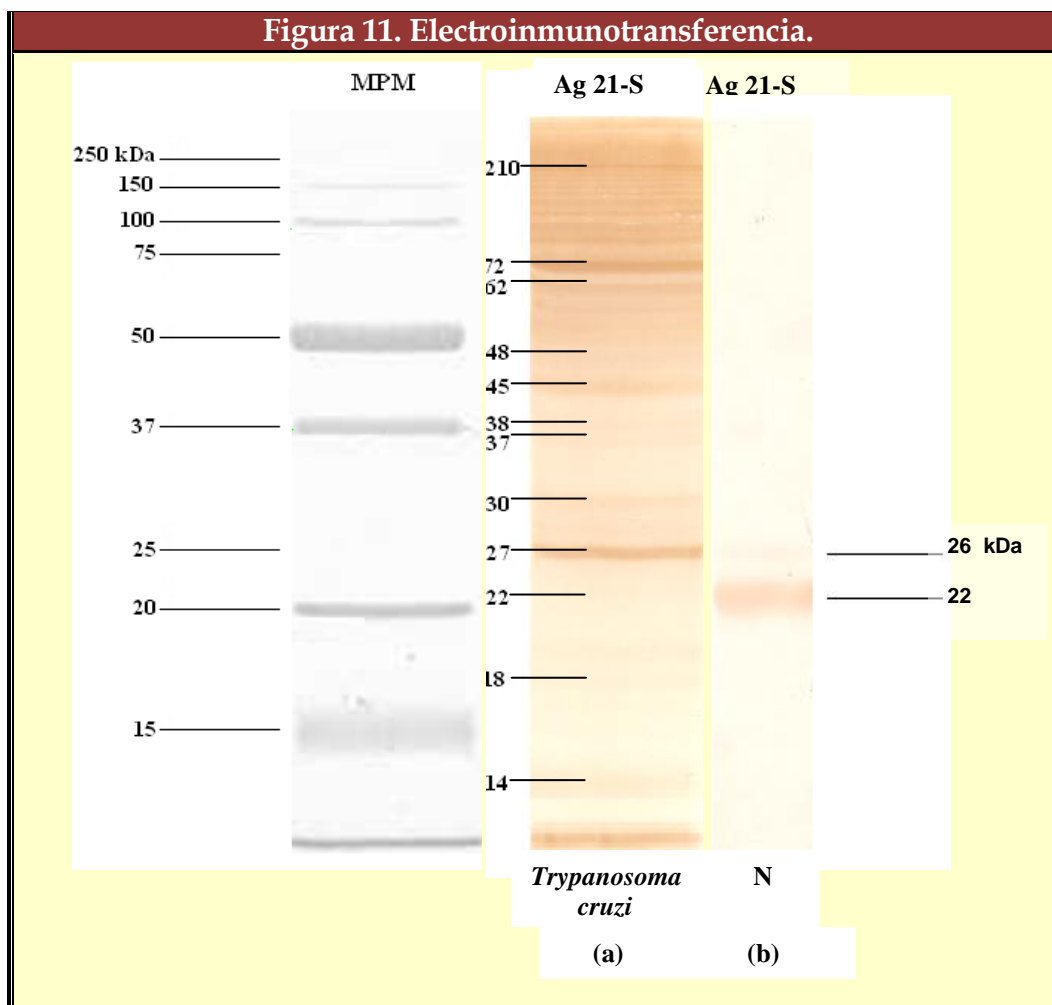
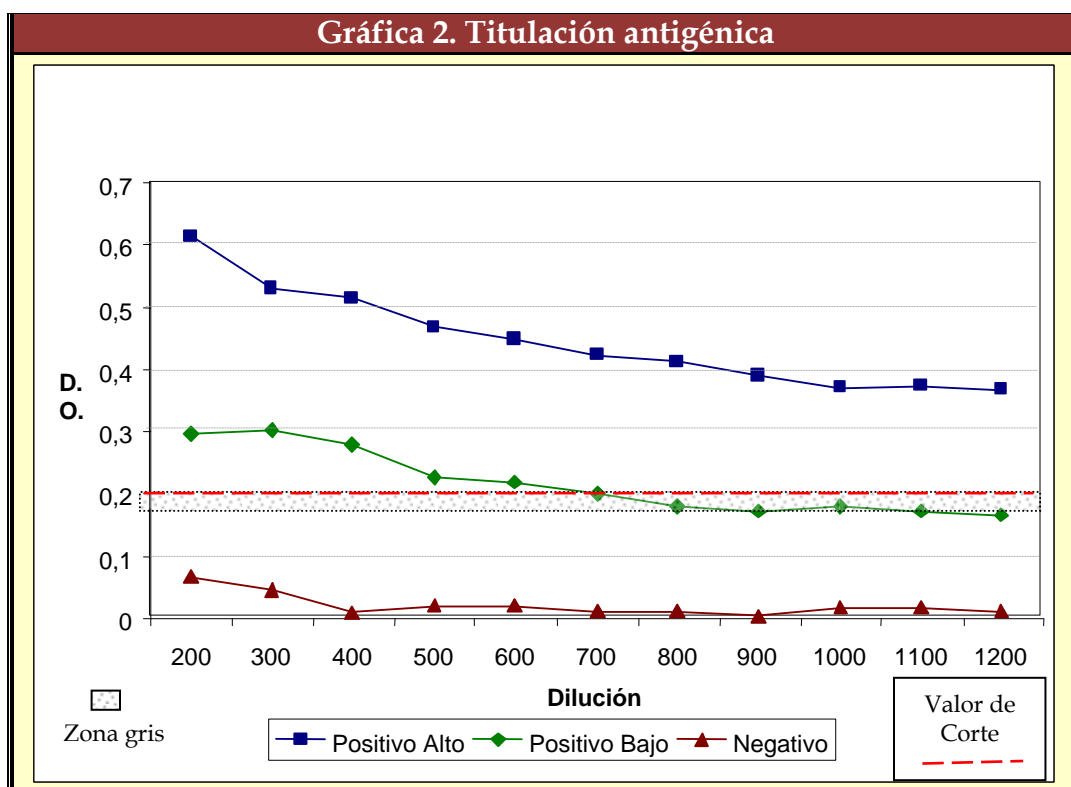


Figura 11. Reactividad mostrada con el extracto antigénico 21-S. (a) contra un pool de sueros reactivos a *Trypanosoma cruzi* y (b) contra un suero normal (N).

7.4 ELISA indirecta

Para la estandarización de la técnica se titularon conjugado y antígeno. El extracto antigénico contenía 830 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína, después de la titulación correspondiente (Gráfica 2) se determinó su empleo en dilución 1:500 que contienen 1.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lo que corresponde a .166 $\mu\text{g}/\text{pozo}$. La titulación del conjugado se determinó para su uso en dilución 1:10 000.



Densidad óptica (D.O.) de sueros reactivos (positivo alto y bajo) y no reactivos (negativo) en diluciones sucesivas del antígeno. El conjugado se usó en una dilución 1: 10 000. Títulos de corte (D.O.): POSITIVO: ≥ 0.200 , ZONA DUDOSA: 180-199, NEGATIVO: < 0.180 .

7.5 Reactividad antigénica y análisis estadístico

Antígeno UNAM 21-S	Antígeno UNAM 26-M		TOTAL
	Infectados	Normales	
Positivo	64	0	64
Negativo	2	66	68
TOTAL	66	66	132

El extracto antigénico Ag 21-S presentó una sensibilidad del 96.9% y una especificidad del 100%, con valores predictivos positivo y negativo del 100% y 97% respectivamente.

La reactividad del extracto antigénico hacia sueros con anticuerpos anti-*Leishmania mexicana* mostró valores (D.O.) negativos (cuadro11).

Cuadro 11. Reactividad del extracto antigénico ante sueros de individuos con anticuerpos anti- <i>Leishmania mexicana</i> .	
Forma clínica	D.O.
Leishmaniasis cutánea localizada	.014
Leishmaniasis cutánea localizada	.040
Leishmaniasis cutánea localizada	.047
Leishmaniasis cutánea localizada	.018
Leishmaniasis cutánea diseminada	.117

En México como en general en América Latina las pruebas de rutina llamadas convencionales para el serodiagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* usualmente se basan en la detección de la inmunoglobulina G (IgG) en las fases aguda e indeterminada de la enfermedad y las principales son la ELISA, IFI y HAI. Estas pruebas son utilizadas ampliamente en los laboratorios para el diagnóstico individual, para el tamizaje en hemodonadores, así como también en encuestas epidemiológicas.

Sin embargo, en estas pruebas serológicas se pueden dar resultados inconclusos; es decir, discordantes en la reactividad de los procedimientos empleados e incluso de falsos positivos ⁽²⁷⁾.

Por tal motivo, la OPS/OMS recomienda por lo menos dos procedimientos diagnósticos de preferencia de principio diferente para determinar seropositividad. En algunos países de América Latina se utilizan reactivos antigénicos que reducen el número de estos resultados inconclusos; sin embargo, estos reactivos diagnósticos, no están comercialmente al alcance de nuestro país para su empleo con fines masivos.

Para el serodiagnóstico de *Trypanosoma cruzi*, se emplea una amplia variedad de antígenos, los cuales pueden estar representados por fracciones proteicas y glucoproteicas totales, semipurificadas, purificadas e incluso parásitos enteros, obtenidos principalmente de epimastigotes de *T. cruzi*. Por otro lado, se han observado diferencias en la reactividad antigénica que depende de la cepa empleada en el cultivo para la expansión parasitaria y de la metodología de extracción antigénica, determinando diferentes concentraciones de anticuerpos en una misma muestra, en el mismo paciente o en diferentes manifestaciones viscerales ⁽³²⁾. Por estas razones, en este trabajo, se diseñó una metodología de extracción antigénica para obtener un antígeno semipurificado, compuesto principalmente por glucoproteínas a partir de 3 aislados regionales.

En diversas ocasiones, se ha mencionado que el uso de antígenos de cepas autóctonas mejora los resultados en los ensayos con sueros regionales ^(27, 39); con la ventaja de disminuir los costos así como reducir resultados discordantes. Estudios previos han mostrado diferencias en concentración proteica así como de carbohidratos de diferentes aislados ⁽⁴⁷⁾. En este estudio se obtuvo un extracto antigénico, que al ser obtenido a partir de tres aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de los tres principales vectores del país, se encuentra enriquecido al ser producto de la mezcla de los componentes antigénicos que constituyen cada aislado, en el cual se aprecian valores cercanos al 100% en cuanto a sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

El empleo de este extracto antigénico, en conjunto con otro procedimiento convencional, puede en gran medida, disminuir el porcentaje de resultados falsos negativos, como ha sido demostrado en otros estudios al usar antígenos recombinantes paralelamente con antígenos convencionales en las pruebas de ELISA ⁽⁶¹⁾ y de este modo evitar lo que ocurre con la serología clásica donde pueden presentarse problemas en muestras cuya reactividad se encuentra cercana a los valores de corte.

En otros trabajos se ha observado que antígenos cuyo proceso de extracción es similar al estudio presente, incrementan los valores en cuanto a especificidad y sensibilidad, pero no se puede evitar del todo la incapacidad de las pruebas serológicas para discernir entre un proceso activo, una simple exposición al agente causal o a otro con una relación filogenética estrecha (ej. *Leishmania*) o inclusive de un problema ya resuelto ⁽⁶²⁾. Cabe destacar que el antígeno 21-S no presenta reactividad ante sueros positivos a *Leishmania mexicana*.

Uno de los propósitos de este trabajo, es utilizar el extracto antigénico 21-S para el serodiagnóstico en el tamizaje en hemodonadores y poder así prevenir la transmisión horizontal de la infección por *T. cruzi*, lo cual permitirá aminorar los costos elevados tanto en el procesamiento de las muestras de los hemodonadores ya que este antígeno al ser nacional su producción sería más económica y también se evitaría el descartar un número importante de unidades de sangre así como de sus componentes principalmente por la reducción de falsos positivos.

Al evaluar la especificidad y sensibilidad de ELISA utilizando diversos antígenos se demuestra que la especificidad es mayor con antígenos recombinantes pero su sensibilidad disminuye, como se describe en la evaluación realizada por Umezawa y col. ⁽⁵⁵⁾ por tal motivo se esperaba que el Ag 21-S fuera más sensible que específico.

Cabe destacar que este dato varía dependiendo de las zonas y de las diferentes enfermedades infecciosas que coexisten en las mismas, donde los sueros de pacientes con enfermedades infecciosas diferentes a tripanosomiasis pueden presentar anticuerpos que reconozcan los mismos epítomos reconocidos por anticuerpos chagásicos, destacando nuevamente que el antígeno 21-S no mostro reactividad ante cinco suero de pacientes con Leishmaniasis. Sin embargo estudios posteriores podrán determinar con más precisión que tan específico es este antígeno.

Los valores de sensibilidad y especificidad del antígeno 21-S son altos (muy cercanos al 100%) en comparación a lo reportado por diferentes estudios que muestran que en centros de diagnóstico de rutina (Bancos de sangre, hospitales, etc.), la sensibilidad de las pruebas comerciales convencionales se encuentran alrededor del 95% (rangos

entre 93% a 98%), indicando que una sola prueba al no ser segura al 100 % no es suficiente criterio para prevenir el riesgo de transmisión de *T. cruzi*.

En el caso de la prueba de ELISA es necesario tomar en cuenta que ésta tiene títulos de corte, a partir de los cuales una muestra es considerada reactiva o no reactiva. Esta prueba fue calibrada con fines diagnósticos con sueros de procedencia mexicana; este comportamiento es de especial interés para los objetivos de este trabajo, que permiten mejorar estos reactivos con fines diagnósticos para el país, ya que la prueba de ELISA debe basarse en antígenos capaces de poder reaccionar con la mayoría de los anticuerpos encontrados en muestras de individuos procedentes de diversas áreas geográficas.

Esta experiencia confirma lo referido por Camargo en 1986 ⁽⁶³⁾, en donde los países del Cono Sur constituyeron un grupo llamado Continental para Estudios sobre serología de la Enfermedad de Chagas, integrado por representantes de nueve países, este grupo estableció las bases para iniciar estudios comparativos en tres laboratorios (uno en Argentina, otro en Brasil y un tercero en Estados Unidos), en donde señalan las diferencias regionales en los resultados de las pruebas por lo que se recomienda el empleo de extractos antigénicos que contengan componentes comunes a diferentes cepas para reducir así al mínimo esas diferencias.

Finalmente el antígeno 21-S debido a los buenos resultados presentados y a su bajo costo para su obtención, puede ser más adelante una herramienta muy importante principalmente en los Bancos de Sangre y Hospitales de México en las pruebas de rutina para el serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi* en el tamizaje de hemodonadores.

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo nos permiten determinar que el presente extracto antigénico presenta estadísticamente valores de sensibilidad y especificidad altos.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir al usar el antígeno 21-S con la prueba de ELISA estandarizada y validada que representa una importante herramienta para el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, con una alta confiabilidad, lo que constituye un valioso aporte en Salud Pública, especialmente en bancos de sangre de nuestro país.

México tiene áreas co-endémicas de la infección por *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* por lo que al no presentar reacción cruzada con este parásito, este antígeno nos brinda una herramienta diagnóstica aún más valiosa para su empleo masivo.

Antígenos de procedencia nacional pueden brindar al país otras alternativas y disminuir los altos costos de los reactivos comerciales para el diagnóstico serológico, por lo cual se debe fomentar el uso, el estudio y caracterización de antígenos extraídos de cepas nacionales para su empleo en diversas técnicas y procedimientos.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Chagas C. 1909. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1: 159-218.
2. WHO. 2002. **The World Health Report.** Geneva: World Health Organization
3. Schofield CJ. 2000. **Challenges of Chagas disease vector control in Central America.** WHO/WHOPES. 36 pp.
4. Dumonteil E. 1999. **Update on Chagas' disease in México.** Sal Púb Méx. 41: 322-327.
5. Mazzotti, L. 1940. **Dos casos de Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca.** Gac Med Méx. 70: 499-502.
6. Salazar, PM, Tay J, Bucio M, Haro I, Anzures ME, Flores S. 1984. **Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*.** Sal Púb Méx. 26: 452-55.
7. Tay J, Salazar PM, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I, García Y, Gutiérrez M. 1986. **Epidemiologic study of Chagas disease in a town in Oaxaca, Mexico.** PAHO Bulletin. 20(4): 358-65.
8. Salazar PM, Barrera M, Bucio MI. 1989. **Transmisión por *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea. Primer caso humano en México.** Rev Med Patol Clin. 36: 57-59.
9. UNAM, CNTS. 2006. **Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*.** México D.F. 45 pp.
10. Tay J. y col. 1980. **Evolución del *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e in vitro.** Sal Púb Méx. 22(5): 513-520.
11. Salazar PM, Haro I, Jiménez J, García E. 1983. **Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de Enfermedad de Chagas en la República Mexicana.** Sal Pub Méx. 25: 77-82.
12. Salazar-Schettino PM, Cravioto Q, Alejandro, Tapia Conver R. 2001. **Iniciativa México: Propuesta para el control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas en México.** Bol Chil Parasitol. 57(3-4): 76-79.

13. Levine ND, Corlis JO, Deroux FE, Grain J, Merinfeld EC, Page EC, Poljanskiy G, Sragu V, Vavray J, Wallace FG. 1989. **A newly revised classification of the protozoa.** J Protozoology. 27(1): 37-58.
14. De Souza W. 2002. **Basic cell Biology of *Trypanosoma cruzi*.** Current Pharmaceutical Design. 8: 269-285.
15. Becerril-Flores MA. Romero-Cabello R. 2004. **Parasitología Médica de las Moléculas a la Enfermedad.** MC Graw Hill. México. 301 pp.
16. Haro I de, Salazar-Schettino PM, Cabrera M. 1995. **Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis.** 2ª ed. México; 289 pp.
17. Carcavallo UR. 1999. **Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas.** Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro, Brasil. Vol. 3.
18. Galvao C, Carcavallo R, Da Silva D, Rocha, Jurberg. 2003. **A check list of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeanel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes 1.** Zootaxa. 202: 1-36.
19. Salazar PM, Haro I, Uribarren T. 1988. **Chagas disease in Mexico.** Parasitol Today. 4(12): 348-52.
20. Carcavallo UR, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvao. 2000. **Phylogeny of the Triatomine (Hemiptera: Reuviidae). Proposals for taxonomic arrangements.** Entomología y vectores, Río de Janeiro. Vol. 7 (1): 1-99.
21. Memorias. 1999. **Primer Encuentro Internacional sobre Enfermedad de Chagas en México. Reunión Conmemorativa del Nonagésimo Aniversario de la Primera Publicación del Dr. Carlos Chagas.** Universidad Simón Bolívar. México, D. F. 158 pp.
22. Beaver PC. 2003. **Beaver Parasitología Clínica de Craig Faust.** 3ª ed. Masson Doyma México, S. A. México, D. F. 823 pp.
23. CDC. 2006. **Chagas disease alter organ transplatation - Los Angeles California.** MMWR Weekly, july 28.2006/ 55(29); 798-800.
24. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. 1992. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact and Transfusion and Clinical Medicine.** Editorial ISBT. Sao Paulo. Brasil. 271 pp.

25. Cabrera M, Bucio M, Rojo J, Bonifaz R, Guevara Y, Salazar-Schettino PM. 2004. **Detection of Antibodies Against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in the General Hospital of Mexico City.** Rev Pat Trop. Brasil. 33(1): 71-80.
26. Schmuñis GA. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 31(4): 547 - 557.
27. Wendel S, Gonzaga AL. 1993. **Chagas' disease and blood transfusion: a new world problem?** Vox sang. 64: 1 - 12.
28. Blanco SB, Segura E, Cura E, Chuit R, Tulián L, Flores I, Garbarino G, Villalonga JF, Gurtier RE. 2000. **Congenital transmisión of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north western Argentina.** Trop Med Int Health. 5(4): 293-301.
29. Tay J, Gutierrez QM, Rodríguez MA, López R, Romero R. 1994. **Microbiología y Parasitología Médicas.** 2ª Ed. Méndez Editores, México. 4198 pp.
30. Cazzulo JJ, Frasch AC. 1992. **SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains.** FASEB Journal. 6: 3295- 3264.
31. Tafuri WL. 1987. **Patogenia da Doença de Chagas.** Rev Inst Med Trop São Paulo. 29: 194-199.
32. Guzmán ES, Zavala JE, Acosta KY, Rosado ME. 1999. **Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.** Rev Biomed. 10: 177-184.
33. Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER. 1971. **Lesões do Plexo Mientérico do Esófago, do Jejuno e do Colo de Chagásicos crônicos. Estudo ao Microscopio Eletrónico.** Rev Inst Med Trop São Paulo. 13: 76-91.
34. Köberle F. 1968. **Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis.** Adv Parasitol. 6: 63-116.
35. Montiel G, Días G. 2002. **Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*.** Rev Méd Hosp Nac Niños Costa Rica. 37(1-2): 1-5.
36. Prata A. 1994. **Chagas' Disease.** Infectious Disease Clinics of North America, 8: 61-76.

37. Botero. 1998. **Parasitosis Humanas**. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 3ª Ed. 457 pp.
38. Liddell JE. 2002. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Measure Pure Protein**. Encyclopedia of life science, Macmillan Publisher Ltd, Nature Publisher Group 1-7 pp.
39. De Lima, et al. 2001. **Purificación Parcial y Empleo de Fracciones Glucosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas**. Acta Científica Venezolana. 52: 235-247.
40. Bua JE, Bontempi EJ, Ruiz AM, Segura EL. 1990. **Antígenos en *Trypanosoma cruzi***. Rev Argen Microbiol. 22: 47-66.
41. Sosa-Estani S. 2001. **La seroepidemiología en la investigación de la infección con *Trypanosoma cruzi***. Grupo de trabajo OPS en enfermedad de Chagas, Montevideo, Uruguay. 15-22 pp.
42. Brener Z, Andrade Z. 1979. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Río de Janeiro Brasil: Guanabara Koogan SA. 473 pp.
43. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. **The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide with Abstracts of Microplate Applications**. Dynatech Europe Laboratories Inc. 35-41 pp.
44. Segura EL, Cura E, Paulone I, Vasquez C, Cerisola J. 1974. **Antigenic Makeup of Subcellular Fractions of *Trypanosoma cruzi***. J Protozool. 21: 571-574.
45. Bucio-Torres MI. Tesis de Maestría. 1997. **Extracción e Identificación de Antígenos para el Diagnóstico de la Trypanosomosis Americana**. Facultad de Medicina. UNAM. 86 pp.
46. Araujo F, Tighe L. 1984. **Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Evidence that the 90-kD Protective Glycoprotein Antigen is Expressed in Blood-form Trypomastigotes and may not be Functional in Dead Epimastigotes**. J. Parasitol. 70: 185-187.
47. Joiner K, Hienny S, Kirchhoff LV, Sher A. 1985. **Gp72, the 72 kilodalton Glycoprotein, is the Membrane Acceptor Site for C3 on *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes**. J Exp Med; 161:1196-1212.
48. Schechter M, Stevens A, Luquetti A, Snary D, Allen A, Miles M. 1986. **Prevalence of Antibodies to 72-Kilodalton Glycoprotein (GP72) in Patients with Chagas'**

- Disease and further Evidence of Zymodeme Associated Expression of GP72 Carbohydrate Epitopes.** Infect Immun. 53:547-552.
49. Fischer E, Ouaiissi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchkine MD. 1988. **GP 58/68 a Parasite Component that Contributes to the Escape of the Trypomastigote form of *T. cruzi* from Damage by the Human Alternative Complement Pathway.** Immun. 65:299-303.
50. Araujo F. 1986. **Analysis of *Trypanosoma cruzi* Antigens Bound by Specific Antibodies and by Antibodies to Related Trypanosomatids.** Infect Immun. 53: 179-185.
51. Matsumoto TK, Hoshino-Shimizu S, Nakamura PM, Andrade HF, Umezawa S. 1993. **High Resolution of *Trypanosoma cruzi* Amastigote Antigen in Serodiagnosis of Different Clinical Forms of Chagas' Disease.** J Clin Microbiol. 31 (6): 1486-1492.
52. Moncayo A, Luquetti AO. 1990. **Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 85: 489-495.
53. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silvera JF. 2003. **AN improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens.** Transfusion. 43: 91-97.
54. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino PM. 1999. **Identification of Immunodominant Antigens in Mexican Strain of *Trypanosoma cruzi*.** Immun Inves. 28 (4): 257-268.
55. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.** J Biol Chem. 193: 265-275.
56. Laemmli UK. 1970. **Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature. 227: 680-685.
57. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci. 76: 4350-4354.
58. Cura E, Wendel S. 1994. **Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre.** OPS, Washington, D.C. 61 pp.

59. Gadelha M, Vercosa A, Lorena B, Nakazawa M, Carvalho B, Souza V, Ferreira P, Silva D, Krieger A, Goldenberg S, Gomes M. 2003. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test.** Vox Sanguinis. 85: 165-170.
60. García MG, Ehrenberg J, Puerto FI. 1996. **Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de conejos.** Rev Biomed. 7: 133-145.
61. Camargo M, Segura E, Kagan I, Pacheco-Souza JM, Carvalheiro J da R, Yanovsky J, Guimarães MC, 1987. **Normalización del Diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas en las Americas: Evaluación de tres años de colaboración.** Bol of Saint Panam. 102 (5): 449-462.