



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**EFICACIA DEL MARCADOR DE 72 kDa EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS
ANTI- *Trypanosoma cruzi* EN FASE CRÓNICA ASINTOMÁTICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MONTSERRAT LÓPEZ SERAFÍN

ASESOR: MVZ. ÁNGEL GERMÁN MARTÍNEZ SOSA

COASESOR: Biól. SERGIO PASTÉN SÁNCHEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

II N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. EN C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Eficacia del marcador de 72 kDa en la determinación de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en fase crónica asintomática

Que presenta la pasante: Montserrat López Serafin

Con número de cuenta: 405015445 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de noviembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M. en E. Fernando Flores Benitez	
SECRETARIO	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
1er. SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
2do. SUPLENTE	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enfermedad de Chagas, Departamento de Parasitología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud; bajo la dirección del Biól. Sergio Pastén Sánchez y codirección del MVZ. Ángel Germán Martínez Sosa de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** y al **Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicio 160** por alimentar mi espíritu por el estudio de las ciencias de la vida.

Papá me dijo alguna vez que nosotros mismos elegimos un momento y una familia, un linaje sanguíneo con el que hemos nacido para presentarnos con las oportunidades que consideramos idóneas para esta vida. Agradezco a **Miguel Ángel López Ángeles** y **Reyna Serafín Hernández** por ser mis padres y mi vida.

A mis asesores **Biól. Sergio Pastén Sánchez** por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo en cada etapa durante la elaboración de esta tesis, por ser tan humano y gran profesionalista, lo admiro y lo quiero mucho, sigue y seguirá siendo un honor trabajar a su lado.

MVZ. Ángel Germán Martínez Sosa por las enseñanzas en el aula de clases, por aceptar ser mi asesor en la realización de este trabajo, por todo el tiempo, disposición y comentarios para concluir este trabajo.

A mis profesores **M. en C. Juan Pablo Martínez Labat**, **MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes**, **Dr. Marco Antonio Vega López** y **M. en E. Fernando Flores Benítez** por su apoyo en el enriquecimiento de este trabajo de tesis y también a todos los profesores que han sido parte de mi vida.

A la **Dra. Carmen Guzmán Bracho**, a todo el equipo del **Laboratorio de Enfermedad de Chagas**, a **Miguel** que hemos aprendido mucho juntos, eres una gran colega y amigo. Al **Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos** porque ahora es mi segunda casa.

A **Coti** por ser mi amiga y cómplice desde que nos conocimos como estudiantes en la Facultad, eres admirable y otra hermana. A todas las personas especiales en mi vida.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	IX
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	
1. La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana	
1.1. Historia	10
1.2. Agente etiológico	12
1.2.1. Morfología	12
1.2.2. Clasificación taxonómica	14
1.3. Ciclo biológico	15
1.4. Ciclos epidemiológicos de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.5. Mecanismo de transmisión	
1.5.1. Transmisión vectorial	19
1.5.2. Transmisión transfusional	19
1.5.3. Transmisión vertical	19
1.5.4. Otros mecanismos de transmisión	19
1.6. Vectores y clasificación taxonómica	20
1.7. Reservorio	22
1.8. Epidemiología	22
1.9. Patogenia	25
1. 10. Cuadro clínico	27
1.10.1. Fase aguda	27
1.10.2. Fase indeterminada	28
1.10.3. Fase crónica	28
1.11. Inmunopatología	29
1.12. Estrategias de tratamiento	32
1.13. Medidas de prevención y control	34
1.14. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas	36
2. Documentando la utilidad diagnóstica de los resultados	42
2.1. Calificación de equipos	43
2.2. Especificaciones de desempeño	43
2.3. Evaluación de procedimientos de medida	44
2.4. Control de Calidad	46
2.4.1. Control de Calidad Interno	46
2.4.2. Control de Calidad Externo	47

	Página
JUSTIFICACIÓN	
HIPÓTESIS	
OBJETIVO GENERAL	49
Objetivos particulares	49
CAPÍTULO 2. DISEÑO EXPERIMENTAL	
2.1. Tipo de estudio	50
2.2. Estrategia utilizada	50
2.3. Panel de referencia	51
2.4. Sueros control	51
2.5. Muestras de desafío de la IET	53
2.6. Criterios de inclusión	53
2.7. Criterios de exclusión	54
2.8. Tratamiento de resultados	54
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	
3.1. Obtención de extracto crudo (antígenos totales) de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
3.2. Cuantificación de proteínas por método de Lowry	55
3.3. Perfiles de inmunodetección y resultados nominales	56
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1. Determinación de estimadores de desempeño	
4.1.1. Estudio comparativo	66
4.1.2. Estudio de reactividad cruzada	66
4.1.3. Estudio de imprecisión	67
4.2. Solución de discrepancias	68
	69
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	
	77
PERSPECTIVAS	
	78
BIBLIOGRAFÍA	
	79

	Página
ANEXOS	
I. Material, equipo, reactivos y biológicos	88
II. Preparación de reactivos y soluciones	92
III. Obtención de extracto crudo a partir de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	96
IV. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry	96
V. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE- SDS 10%)	98
VI. Inmunoelectrotransferencia (<i>Immunoblotting</i> o <i>Western blot</i>)	98
VII. Inmunodetección	100
VIII. Definiciones	102
IX. Caracterización del panel PA- 08	108
X. Caracterización del panel MPT 203 (Inserto)	111
XI. Algoritmo de diagnóstico serológico LeCh- InDRE	114
XII. Algoritmo de diagnóstico serológico LeCh- InDRE (inclusión IET)	115
XIII. <i>Western blot</i> (Inserto)	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Carlos Chagas en su laboratorio	10
2. Corte longitudinal de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
3. Formas tripomastigote y amastigote con microscopía electrónica de barrido	14
4. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
5. Triatomas	21
6. Mapa de México que muestra la densidad de las especies de triatomos	21
7. Casos e incidencia de Enfermedad de Chagas en México, 1995- 2012	24
8. Respuesta inmune en fase aguda y crónica en la enfermedad de Chagas	29
9. Respuesta inmune en las formas cardíaca e indeterminada en la enfermedad de Chagas	31
10. Intervenciones y acciones para prevención y control de la Enfermedad de Chagas	35
11. Historia natural de la Enfermedad de Chagas en el hombre	37
12. Evaluación de procedimientos de medida o de examen en el laboratorio	43
13. Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada en el desarrollo de la IET en LeCh- InDRE	50
14. Curva de calibrado de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry	55
15 a 25. Perfiles de inmunodetección	56
26. Planilla: cálculos de precisión con el suero control alto reactivo P5	68
27. Planilla: cálculos de precisión con el suero control bajo reactivo	69
28. Disposición del gel de poliacrilamida y membrana de nitrocelulosa para electrotransferencia	99
29. Disposición del módulo de transferencia	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación sistemática del vector	20
2. Cambios en los parámetros epidemiológicos de incidencia de la Enfermedad de Chagas	23
3. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en México	23
4. Esquemas de tratamiento de medicamentos anti chagásicos	33
5. Desempeño de los métodos parasitológicos	38
6. Desempeño de las pruebas serológicas disponibles en el mercado en base a composición antigénica	40
7. Requerimientos mínimos para la validación y/ o verificación de métodos cuantitativos y cualitativos aplicados a diagnóstico	45
8. Características del suero control positivo P5	52
9. Resultados de absorbancia curva de calibrado de BSA	55
10. Resultados nominales de la IET (<i>Western blot</i>) del panel PA- 08	62
11. Resultados nominales de la IET (<i>Western blot</i>) del panel PMT 203	62
12. Resultados nominales de la IET (<i>Western blot</i>) del panel LEISH	63
13. Resultados nominales de la IET (<i>Western blot</i>) del panel TOXO	63
14. Resultados nominales de la IET (<i>Western blot</i>) del panel TB	64
15. Concentrado de resultados	64
16. Resultados del estudio de imprecisión, suero control alto reactivo (P5)	65
17. Resultados del estudio de imprecisión, suero control bajo reactivo	65
18. Tabla de contingencia del estudio comparativo	66
19. Estimadores de desempeño IET (anexo VIII)	66
20. Tabla de contingencia del estudio de reactividad cruzada	67
21. Resultados de los paneles LEISH, TOXO y TB con las pruebas ELISA- T y ELISA- R	67
22. Tabla de contingencia para análisis de discrepancias	70
23. Estimadores de desempeño de la RNLSP	70
24. Construcción de curva de calibrado de BSA	97
25a y 25b. Caracterización de panel PA- 08 con pruebas de ELISA (equipo comercial)	108
26. Caracterización de panel PA- 08 con HAI y pruebas inmunocromatográficas	110

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
Bz	Benznidazol
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CCC	Cardiopatía Chagásica Crónica
CCI	Control de Calidad Interno
CI	Suero Control Interno
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)
DGE	Dirección General de Epidemiología
DIF	Desarrollo Integral de la Familia
DTT	Ditiotreitol
EC	Evaluación de la Conformidad
ECh	Enfermedad de Chagas
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático Indirecto
ELISA- R	Ensayo Inmunoenzimático Indirecto con antígenos recombinantes
ELISA- T	Ensayo Inmunoenzimático Indirecto con antígenos totales
FCA	Fase Crónica Asintomática
gp	Glicoproteína
GTR	Grupo de Trabajo Científico
HAI	Hemaglutinación Indirecta
IET	Inmunoelectrotransferencia

IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IFN-γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IMNC	Instituto Mexicano de Normalización y Certificación
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
ISO	International Organization for Standardization
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa	Kilodalton
LeCh	Laboratorio de Chagas
msnm	Metros sobre nivel del mar
Mϕ	Macrófagos
NK	<i>Natural Killer</i>
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato
NMX	Norma Mexicana
NO	Óxido Nítrico
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PAHO	Panamerican Health Organization
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
POEs	Procedimientos de Operación Estandarizados
QUADAS	<i>Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation analysis</i>

RNLSP	Red Nacional De Laboratorios de Salud Pública
rpm	Revoluciones por minuto
S/ Co	Razón Absorbancia/ Valor de corte
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SEDENA	Secretaría de Defensa Nacional
SEMAR	Secretaría de Marina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SSa	Secretaría de Salud
TA	Tripanosomiasis Americana
TBS	Tris Base Salino
TDR	<i>Tropical Diseases Research</i>
TEMED	N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina
TESA	<i>Tripomastigote Excretion and Secretion Antigens</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
URL	<i>Uniform Resource Locators</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMEN

Trypanosoma cruzi presenta una estructura clonal en sus poblaciones, lo cual se manifiesta en la heterogeneidad de su comportamiento biológico, bioquímico y molecular, observándose una asociación entre estas características con su procedencia geográfica y algunas formas de la enfermedad. Esta situación ha llevado a la búsqueda y evaluación de antígenos con valor diagnóstico a partir de aislados autóctonos con miras a desarrollar técnicas más eficientes en el diagnóstico de la fase crónica asintomática. La inmunoelectrotransferencia (IET) combina el poder resolutivo de la electroforesis y la especificidad de los anticuerpos, lo que permitiría su uso como prueba confirmatoria. Para evaluar la eficiencia de la IET se utilizaron extractos solubles ricos en proteínas, de epimastigotes de *T. cruzi*, se identificaron 6 bandas antigénicas específicas con pesos moleculares relativos entre 71 y 208 kDa, de éstas, la de 72 kDa mostró sensibilidad y especificidad del 100%, lo que sugirió su potencial para ser utilizada como prueba confirmatoria o para resolver discrepancias en el diagnóstico serológico. Bajo este supuesto se estandarizó, validó y verificó la IET.

El estudio de verificación se realizó bajo un diseño comparativo para verificar las características operativas del método y un segundo estudio para conocer la imprecisión, en las condiciones operativas, siguiendo los lineamientos estandarizados EP 12 A2 y EP 15 A2. Se demostró que el método es específico y sensible al 100% para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, con valores predictivos positivo y negativo también del 100%, con una reactividad cruzada nula y un coeficiente de variación menor del 5 %, concordante con los valores esperados lo cual apoya su posible utilidad como prueba confirmatoria.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1. La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana

1.1. Historia

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879- 1934) (figura 1), del Instituto Federal de Manguinhos (hoy Instituto Oswaldo Cruz), durante su participación en una campaña antimalárica.



FIGURA 1. Carlos Chagas en su laboratorio. Instituto Oswaldo Cruz. Foto de J. Pinto. Departamento de Archivo y Documentación de la Casa de Oswaldo Cruz/ Fiocruz. Tomado de URL: <http://www.unibio.unam.mx/chagmex>.

El protozoo fue observado inicialmente en chinches del género *Panstrongylus megistus*, colectados en Lassance, Minas Gerais, Brasil. Después de una minuciosa investigación y con sus estudios describió el nuevo parásito, al que denominó *Trypanosoma cruzi* (como homenaje a su maestro Oswaldo Cruz) (Soberon y Peláez, 1964).

Chagas fue el primer investigador en describir la entidad médica en su espectro epidemiológico, etiológico, patológico y clínico por lo que este hallazgo se considera como uno de los descubrimientos parasitológicos más completos de la historia.

En 1934 fue redescubierta en Argentina por Salvador Mazza y Romaña y se debe a Mazza la primera descripción de la enfermedad transmitida por transfusión sanguínea. En 1949 en Venezuela, Aldao describe el hallazgo de *Trypanosoma cruzi* en sangre periférica de un recién nacido (Ramsey y cols., 2003).

En México, los estudios de la Enfermedad de Chagas inician en 1940 cuando Luis Mazzoti diagnosticó los dos primeros casos en fase aguda, en 1984 Salazar- Schettino y cols., reportaron el primer caso de megaesófago con serología positiva y Tay en 1986, el primero de megacolon. Los anuarios de morbilidad (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud) se encuentran disponibles a partir del año 1986 y en 1989 Salazar-Schettino registra el primer caso por transfusión sanguínea (Salazar, 2009).

Hasta 1980 se obtuvieron datos consolidados sobre la distribución de la enfermedad en América y se demostró su endemidad en 21 países con un riesgo en el 25% de la población latinoamericana.

Desde 1978 se han realizado numerosos estudios de seroprevalencia que señalan una distribución heterogénea. Respecto al transmisor, Hoffmann en 1928 correlaciona por primera vez al triatomino como transmisor, la importancia de los vectores transmisores fue señalada por Lent y Wygodzinski en 1979. Estudios indican que México se considera el país latinoamericano con mayor diversidad de triatominos (Salazar y Marín, 2006).

1.2. Agente etiológico

La palabra *Trypanosoma* proviene del griego *τρίπανον* taladro y *σωμα* cuerpo (Soberon y Peláez, 1964). Los tripanosomas aparecieron hace aproximadamente 680 millones de años, pero también es posible que hayan infectado a mamíferos primitivos y que su evolución pudiera estar correlacionada con la evolución de éstos (Villagrán y De Diego, 2008).

Algunos investigadores plantean que *Trypanosoma brucei* (que ocasiona la enfermedad del sueño en África) y *Trypanosoma cruzi* coexistieron en el mismo ambiente por años y cuando el supercontinente Pangea se dividió, quedaron geográficamente limitadas y por tanto la evolución independiente de *T. cruzi* dio origen a dos linajes con historias evolutivas separadas en el norte y sur de América (Villagrán y De Diego, 2008).

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el insecto vector, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado Estercoraria, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector con liberación de formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *Trypanosoma cruzi* y a *Trypanosoma lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan en tubo digestivo, posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectantes son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma rangeli*.

1.2.1. Morfología

El orden Kinetoplastida debe su nombre a los cinetoplastos, una condensación de DNA localizada dentro de una única mitocondria, ramificada por todo el cuerpo del parásito.

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospederos multicelulares, el insecto vector (invertebrado) y un vertebrado. La morfología de los tripanosomátidos está dada en función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada) y la forma de salida del flagelo (central o lateral) (Villagrán y De Diego, 2008), aunque también se pueden encontrar en menor número formas intermedias como los esferomastigote, promastigote y opistomastigote (en el estómago del insecto

vector y en medios experimentales *in vitro*) (Carrada, 2004); sin embargo para fines de estudio se han descrito tres formas principales:

Epimastigote (20-40 x 2 μm): De forma elongada, el flagelo se origina por delante del núcleo, surge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática dando la imagen de una membrana ondulante corta y se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el intestino medio del vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas de *Trypanosoma cruzi*. Es también la forma de más fácil cultivo *in vitro* (figura 2).

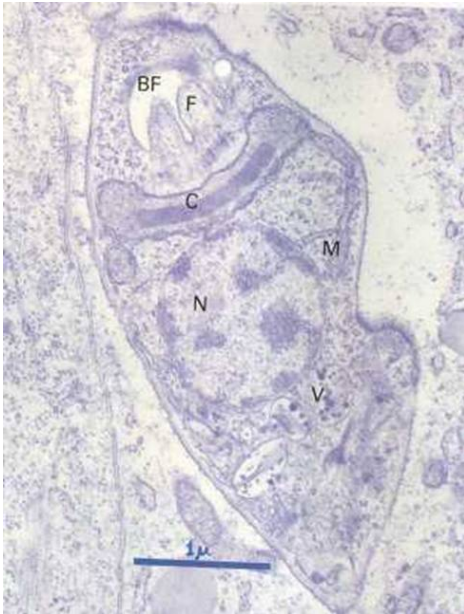


FIGURA 2. Corte longitudinal de *Trypanosoma cruzi*. Se observa el flagelo (F), el cinetoplasto discoide con minicírculos de ADN (C) y el núcleo (N) con zonas de cromatina condensada. El citoplasma está repleto de ribosomas. Tomado de URL: <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/hoy02/trypanosoma.htm>

Tripomastigote (20 x 45 μm): De forma elongada, núcleo central, cinetoplasto subterminal, voluminoso y ovoide. El flagelo nace del cinetoplasto y surge de un costado del cuerpo liberándose por el extremo anterior creando una imagen de membrana ondulante poco plegada y de importante extensión (figura 3 A) y un flagelo libre relativamente corto. En las extensiones teñidas adquieren formas casi siempre encorvadas (de C o de hoz). Presenta pleomorfismo: en la sangre del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico).

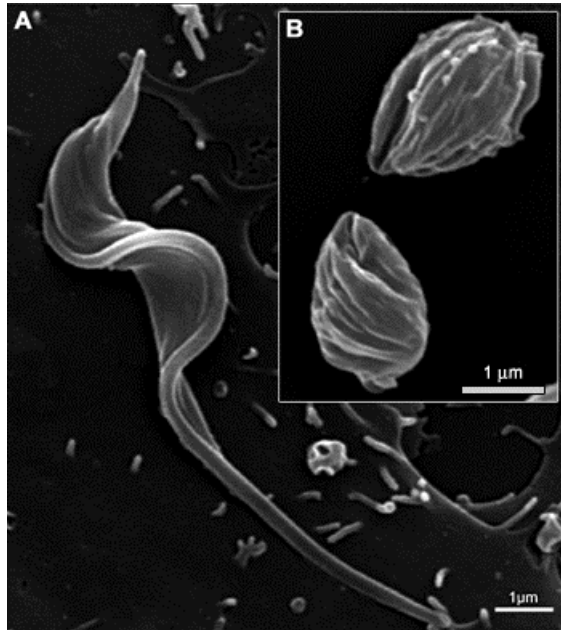


FIGURA 3. Formas tripomastigote y amastigote con microscopía electrónica de barrido. (A) forma tripomastigote adherida sobre una célula hospedera mostrando el cuerpo alargado y el trayecto del flagelo; (B) la forma amastigote se observa ligeramente ovalada. Imagen de Thaís Souto- Padrón, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro. Tomado de URL: <http://portal.fiocruz.br/es/content/oswaldo-cruz>.

Amastigote (2- 5 μm): También conocidos como esferomastigotes intracelulares, de forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre (figura 3 B). Se encuentra en una vacuola parasitófora en el citoplasma, principalmente en macrófagos y células musculares, multiplicándose continuamente por fisión binaria (Salazar y Marín, 2006).

1.2.2. Clasificación taxonómica (Villagrán y De Diego, 2008)

Reino: Protista

Subreino: Protozoos

Phylum: Sarcomastigofora

Subphylum: Mastigofora

Clase: Zoomastigofora

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

1.3. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en dos organismos diferentes (el insecto vector y el mamífero) (figura 4). En el vector se encuentran los epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y en el hospedero mamífero se encuentran los amastigotes y tripomastigotes sanguíneos (ver figura 4).¹ Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector al alimentarse de un mamífero infectado, ya en el intestino medio del insecto los tripomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes, forma replicativa (por fisión binaria) y se dirigen a la capa cuticular del epitelio de la glándula del recto y al saco rectal, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para el hospedero mamífero). Este ciclo dura en el vector de 8 a 10 días y permanecen infectados durante el resto de su vida (aproximadamente dos años) (Pereira y cols., 2008).² Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados por el insecto vector en las heces, penetrando en el hospedero y en las células de este, generalmente debido al prurito causado por la lesión cutánea en el sitio de picadura (lo que facilita el contacto de los parásitos con la lesión), sin embargo, otras vías de infección son a través de las mucosas bucal y conjuntiva.

Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde se diferencian a la forma de amastigote,³ el cual tiene ciclos de división binaria.⁴ Una porción de los amastigotes se diferenciarán a tripomastigotes, que retornan a torrente sanguíneo por lisis de la célula hospedera, así éstos tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células o bien⁵ ser ingeridos por el insecto vector durante la picadura al hospedero, continuando de esta forma el ciclo biológico del protozooario.

Aunque la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi* usualmente se encuentran en el citoplasma de las células infectadas y de que son exclusivamente el estado multiplicativo intracelular del parásito, investigaciones demuestran que los amastigotes se pueden encontrar en circulación durante la fase aguda de la infección (Iida y cols., 1989), Ya en 1988, durante investigaciones en modelo murino, se planteó la posibilidad del desarrollo de un ciclo alternativo para *T. cruzi* en el hospedero mamífero con la participación de amastigotes como forma infectiva. *In vivo*, los amastigotes infectivos podrían emerger de células que contienen amastigotes o mezclas de tripomastigotes y éstos o alternativamente, originados de la transformación extracelular de tripomastigotes

sanguíneos en amastigotes. Se ha observado que los tripomastigotes sanguíneos pueden transformarse en amastigotes entren o no a las células hospederas durante la fase aguda de la infección, así mismo, los amastigotes y las formas intermedias se han encontrado en circulación y también en el espacio extracelular de las células musculares cardiacas. Los amastigotes extracelulares comparten marcadores morfológicos e inmunoquímicos con sus homólogos intracelulares y aunque los amastigotes extracelulares pueden estar presentes durante la fase crónica de la enfermedad, durante esta etapa, los parásitos en sangre son muy escasos y los amastigotes podrían ser imposibles de detectar con microscopía óptica.

Los amastigotes también se encuentran en el hospedero vector, pero poco se sabe acerca de su potencial de desarrollo (Ley y cols., 1988).

En otras investigaciones se ha descubierto que cepas de *T. cruzi* I son mucho más eficientes que las del tipo II, pues poseen una notable habilidad para inducir fagocitosis, infectando varios tipos de células y favoreciendo la propagación de infección en las células de mamíferos hospederos (Fernandes y cols., 2013).

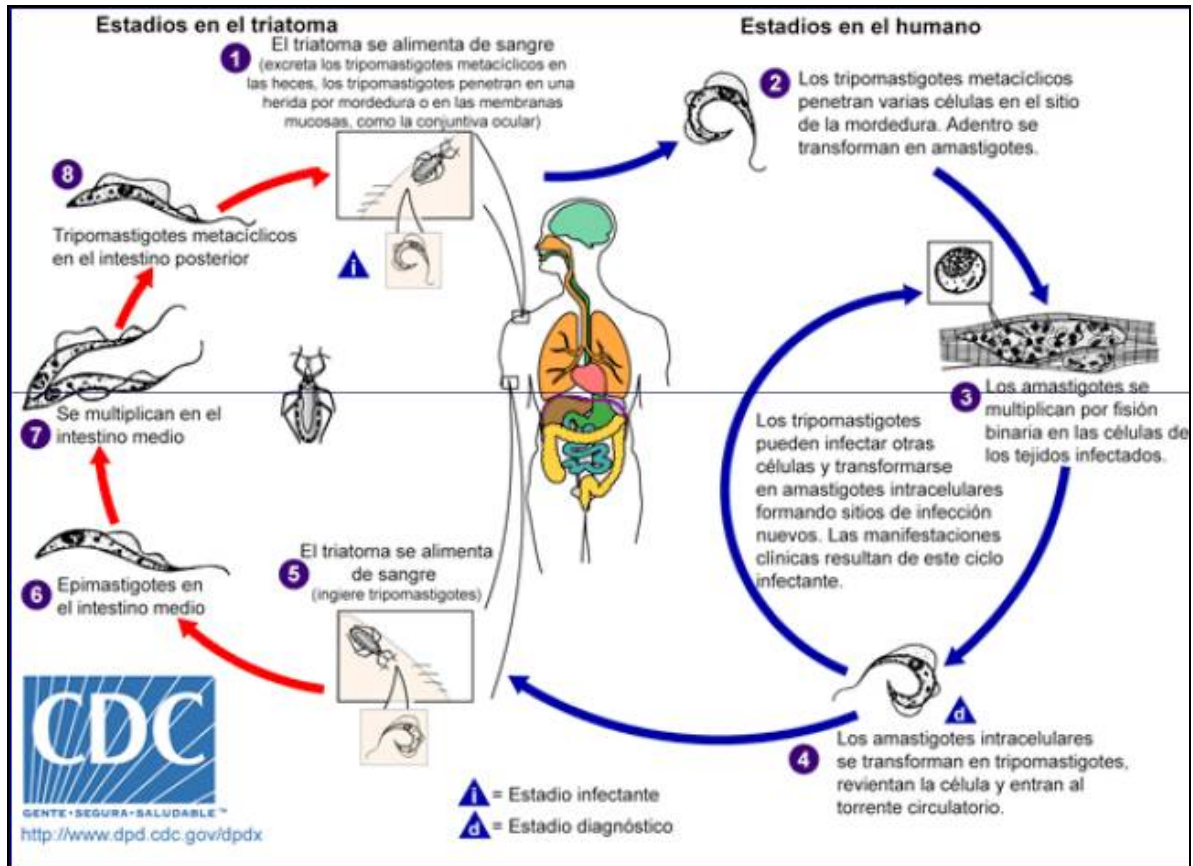


FIGURA 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de URL: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

El ciclo de vida del parásito incluye un gran número de triatominos y especies de mamíferos. Estudios que incluyen aspectos biológicos, bioquímicos, moleculares y farmacológicos, han demostrado que *T. cruzi* es muy heterogéneo en su comportamiento y que comprende un conjunto de cepas o poblaciones que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como silvestres (Ancca y cols., 2009). Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose variación en cuanto a diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para células hospederas. El comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*. Así mismo, uno de los problemas planteados consiste en saber si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en la respuesta de los pacientes

al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* que prevalecen en cada área geográfica o a las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Guzmán y cols., 1999). Se han identificado por varios métodos la marcada heterogeneidad a niveles bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico para correlacionar con los hallazgos clínicos y epidemiológicos

1.4. Ciclos epidemiológicos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo silvestre de *T. cruzi* es de naturaleza zoonótica, el protozoario circula entre vectores (triatominos) y reservorios silvestres. Los ecotopos (ecosistemas) primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y depende también de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno- florísticas y disponibilidad de alimentos.

Ciclo doméstico. La existencia de la enfermedad de Chagas en humanos fue un hecho accidental cuando el hombre entró en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, lo que forzó a los triatominos a ocupar viviendas humanas (proceso de domiciliación) basada en diversos elementos:

- Profundas acciones sobre el medio natural, como quema y tala de grandes extensiones que promovieron apertura de espacios naturales.
- La existencia de ranchos y viviendas de escasa calidad son abrigo de los vectores y presencia de vectores con alta capacidad de domiciliación, caso típico del *Triatoma infestans*.

De esta manera el hombre pasó a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas (GTC/ OMS, 2005) y es el principal reservorio, lo que favorece la expansión de la infección hacia zonas urbanas y países no endémicos.

Ciclo peridoméstico: Implica la participación de animales domésticos (gatos, perros, gallinas, etc.) y otros animales cercanos al peridomicilio, en donde la existencia de cercas y corrales permiten que el vector se instale en la periferia (peridomicilio). Este ciclo sirve de una unión a los ciclos silvestre y doméstico (Ministerio de Salud, 2011).

1.5. Mecanismos de transmisión

1.5.1. Transmisión vectorial

La transmisión vectorial es la principal vía de infección por *Trypanosoma cruzi* (80 al 90 %) y ocurre principalmente por el contacto con heces de triatomíneos, vía piel discontinua o mucosas, en el humano o de otros mamíferos. Las poblaciones en riesgo para la transmisión vectorial en México están ubicadas en su mayoría por debajo de los 2000 msnm (Villagrán y De Diego, 2008).

1.5.2. Transmisión transfusional

La transmisión transfusional ocupa el segundo lugar (5 a 20 %) después de la vectorial, siendo los más expuestos los individuos poli transfundidos, hemofílicos y los que reciben diálisis. Del 12 a 25 % de los individuos que reciben transfusión con sangre infectada contraen la enfermedad, por lo que se ha vuelto un serio problema en los países desarrollados (Villagrán y De Diego, 2008).

1.5.3. Transmisión vertical

La transmisión congénita constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas (0.5 a 8 %). Una madre infectada puede transmitir *T. cruzi* circulante en su sangre, durante la segunda mitad de la gestación (Villagrán y De Diego, 2008).

1.5.4. Otros mecanismos de transmisión

Las otras vías de transmisión son excepcionales e incluyen la accidental, de laboratorio, por trasplante de órganos y oral (Villagrán y De Diego, 2008).

1.6. Vectores y clasificación taxonómica

Se ha propuesto que los primeros hospederos de *Trypanosoma cruzi* fueron insectos del orden Hemiptera y que éstos han infectado mamíferos primitivos desde hace 15 000- 20 000 años (Pereira y cols., 2008).

Dentro del reino Animalia, tipo Artropoda; clase Insecta; orden Hemiptera, se encuentra la familia Reduviidae, conformada por 23 subfamilias (tabla 1). Todos son insectos terrestres y hematófagos (Villagrán y De Diego, 2008).

La subfamilia está distribuida en las tribus *Alberproseniini*, *Bolboderini*, *Cavernicolini*, *Rhodniini* y *Triatomini* de las cuales de la primera y la tercera no se han descrito ejemplares en México.

Tabla 1. Clasificación sistemática del vector

Reino animal Tipo Artrópodos Clase: Insectos Orden: Hemípteros Familia: Redúvidos Subfamilia: Triatominos (Juannel, 1919) Género: <i>Triatoma</i> (Laporte, 1832) Especies: <i>T. barberi</i> (Usinger, 1939) <i>T. mexicana</i> (Herrich-Schaeffer, 1848) <i>T. pallidipennis</i> (Stal, 1872) <i>T. dimidiata</i> (Latrielle, 1811) <i>T. gerstaeckeri</i> (Stal, 1859)
--

Se conocen más de 50 géneros de triatominos infectados naturalmente con *T. cruzi* y los vectores potenciales abarcan 137 especies de chinches triatominas dentro de la familia Reduviidae, subfamilia *Triatominae*, distribuidos en 5 tribus y 13 géneros. Son conocidos ordinariamente como chinches asesinas, besuconas, vinchucas (Argentina, Chile, Uruguay y otros), barbeiros (Brasil), pitos (Colombia) y chipos (Venezuela). En la República Mexicana se han reportado 7 géneros, siendo el género *Triatoma* el más importante, con 32 especies distribuidas en prácticamente todo el territorio nacional, se reconocen 20 especies de triatominos hematófagos, denominados comúnmente como chinches picudas, besucones, o por una variedad de palabras indígenas como pic (Maya), msin o bidi (Zapoteco), etc. Los pertenecientes a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico y las especies de mayor

importancia por su capacidad vectorial y por su distribución en México son: *Triatoma barberi*, *T. dimidiata* (figura 5 y 6), *T. phyllosoma*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. picturata*, *T. mexicana*, *T. gerstaeckeri*.

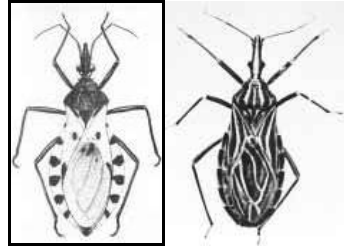


FIGURA 5. Triatomas. *Triatoma dimidiata* adulto (izquierda). *Triatoma rhodnius prolixus* (derecha) (Carrada 2004)

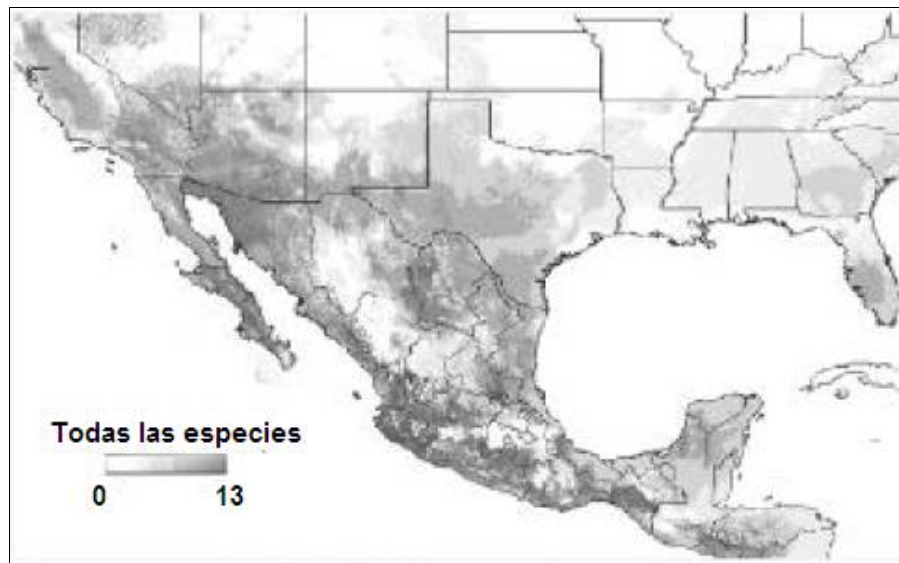


FIGURA 6. Mapa de México que muestra la densidad de las especies de triatomos. Imagen de Víctor Sánchez- Cordero, Instituto de Biología, UNAM. En Gaceta UNAM, 31 de enero, 2011. p. 8.

1.7. Reservorio

Trypanosoma cruzi parasita más de 150 especies de mamíferos tanto silvestres como domésticos, incluido el hombre; desde el punto de vista epidemiológico los que viven en las proximidades del hombre: armadillos y zarigüeyas (entre los silvestres), y perros, gatos, conejos, gallinas y otros (entre los domésticos) son los más importantes.

1.8. Epidemiología

La enfermedad de Chagas es considerada la enfermedad parasitaria de mayor importancia en Latinoamérica, tanto por su morbilidad como por su importancia económica.

Trypanosoma cruzi se encuentra casi exclusivamente en el continente americano y es endémico en gran parte del Centro y Sur de América: su presencia se extiende desde el norte de Argentina hasta Texas, sin embargo, los actuales cambios demográficos debido a fenómenos migratorios han ampliado los límites geográficos de su distribución (Flores, 2009).

De acuerdo con datos del Banco Mundial, por sí sola supera a todas las otras enfermedades parasitarias y se ubica como la tercera enfermedad infecciosa de importancia después del SIDA y la tuberculosis (Ramsey y cols., 2003).

La prevalencia total de la infección por *Trypanosoma cruzi* se pudo estimar por primera vez en la década de 1980 empleando protocolos estandarizados y según las estimaciones más recientes, hay unos 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi* en todo el mundo (OMS, 2010), la tabla 2 muestra los cambios en los parámetros epidemiológicos (por la interrupción de la transmisión) y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990–2000–2006 (TDR/WHO, PAHO, WHO) (GTC/ OMS, 2005 y OPS/ OMS, 2006).

Tabla 2. Cambios en los parámetros epidemiológicos de incidencia de la Enfermedad de Chagas (GTC/ OMS 2005).

Parámetros epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45.000	21.000	12.500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700.000	200.000	41.200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	21 países	21 países

Se estima, que 30 % de los infectados desarrollarán la enfermedad y presentarán manifestaciones clínicas con predominio de lesiones cardíacas, seguida de megasíndromes: megaesófago y megacolon (Villagrán y De Diego, 2008).

La tabla 3 muestra los parámetros epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en México.

Tabla 3. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en México (OPS/ OMS, 2006).

Datos	Año 2005
Población	107, 029, 000
Número de infectados	1, 100, 000
Nuevos casos anuales de transmisión vectorial	7, 700
Casos anuales de Chagas congénito	1, 100
Mujeres (+) 15 y 44 años	243, 000
Tasa de prevalencia (x 100, 000 habitantes)	1, 028
Tasa de incidencia (x 100, 000 habitantes)	7
Incidencia de Chagas congénito (x 100 nacimientos)	0.051
Población expuesta en zonas endémicas	29, 500, 000
Miocardopatías	99, 143
Prevalencia en bancos de sangre	0.60

En estudios de morbilidad en México bajo los criterios de estratificación de zonas de riesgo, se estima que 1, 100, 000 personas están infectadas con *T. cruzi*. Con una población seropositiva de 1, 100, 000 individuos, y tasas de población femenina entre 15 y 44 años, se estima que hay 243, 000 mujeres en edad fértil seropositivas para *T. cruzi* (OPS/ OMS, 2006).

Del año 2000 a 2011 se registraron 4, 729 personas infectadas, con aumentos en la incidencia de 0.1 en 2000 a 0.7 (figura 7), el grupo más afectado se encuentra entre los 25 y 44 años de edad (45.9%).

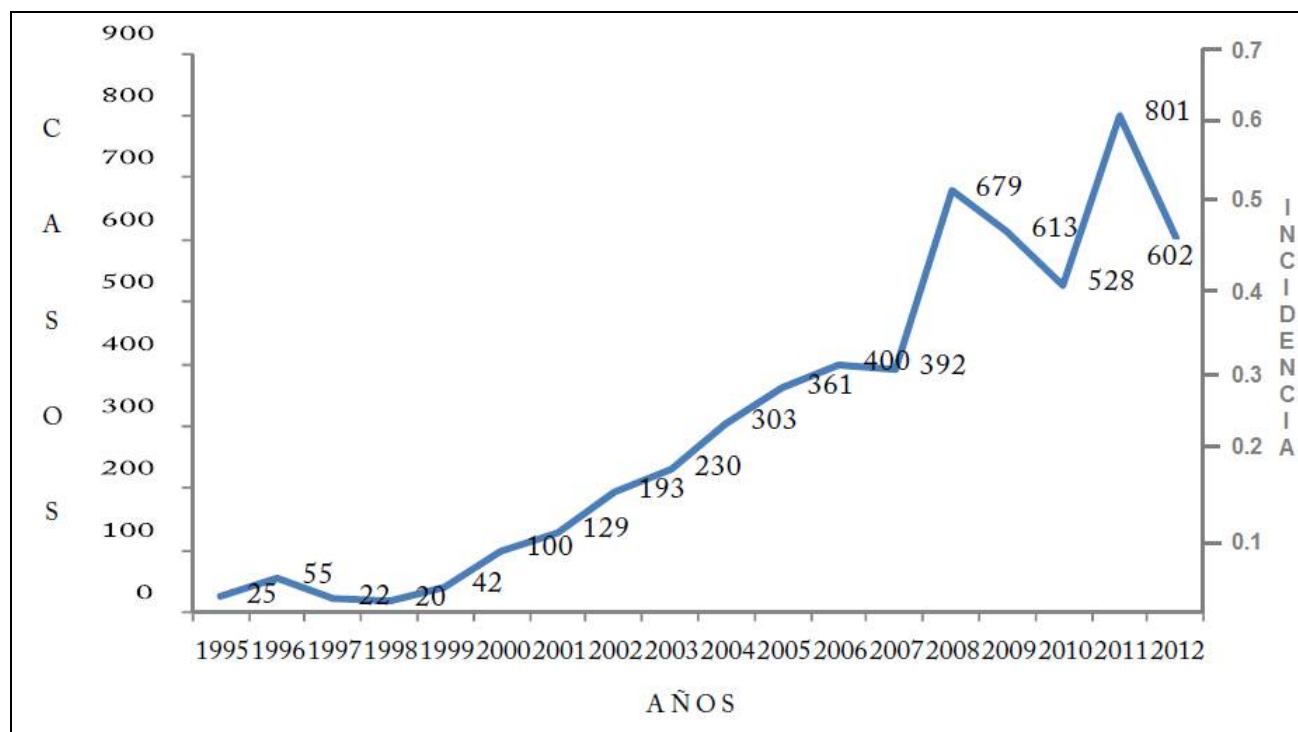


FIGURA 7. Casos e incidencia de Enfermedad de Chagas en México, 1995- 2012.*Hasta semana epidemiológica No. 52** Por 100 mil habitantes. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD, 2012.

En 2011 la Secretaría de Salud concentró el 83.5% de los casos, IMSS- Ordinario el 7.0%, IMSS- Oportunidades el 3%, ISSSTE el 1.2%, SEDENA 0.37%, SEMAR el 0.2%, otras instituciones el 0.9% y el DIF y PEMEX no reportan casos.

Hasta 2012, las entidades con mayor número de casos fueron Veracruz con el 17.9%, Yucatán 14.8 % y Oaxaca 14.5% de los casos (SINAVE/DGE/SALUD, 2012).

En seroprevalencia se ha reportado una amplia variación en donantes en bancos de sangre: 0.3 % en el Instituto de Cardiología (1999), 1.03 % en el Hospital General de México (2002) (Ramsey y col. 2005) y en un estudio de mayor representatividad a nivel nacional con la participación de 18 estados, realizado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en colaboración con los Centros Estatales de

Transfusión Sanguínea (CETS) reportaron que en promedio el 1.5 % de las muestras de donación contienen anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* (Guzmán, 2001).

La mortalidad anual debida a la enfermedad crónica se complementa por una mortalidad infantil del 10% de los casos incidentes en menores de edad. Entre el año 2000 y 2010, se registraron 302 casos de defunción con un promedio de 27 al año, la mayoría del estado de Oaxaca (SINAVE/DGE/SALUD, 2012).

El impacto económico y social de esta enfermedad es alto, esta enfermedad se relaciona con el desarrollo socio- económico del país y frecuentemente está asociada a otras condiciones como desnutrición, tuberculosis y otras enfermedades parasitarias lo que se expresa como una carga económica por discapacidad y disminución de vida productiva (Ramsey y cols., 2003).

1.9. Patogenia

La enfermedad de Chagas es una infección sistémica. Las lesiones que produce *Trypanosoma cruzi* dependerán de las características del parásito (polimorfismo, tropismo, virulencia, constitución antigénica, cantidad de parásito) y del hospedero (constitución genética, sexo, edad, especie, raza, infecciones asociadas, estado nutricional, respuesta inmune).

En la fase aguda existe elevada parasitemia y parasitismo acentuado en órganos y tejidos, los focos inflamatorios son frecuentes y grandes, mientras que en la fase crónica los focos inflamatorios son escasos y menos aparentes pero irreversibles.

En general se presentan dos tipos de lesiones, la inflamatoria y la neuronal; en ambas, la respuesta básica del hospedero parece ser una consecuencia directa de la multiplicación del parásito. La evolución de la enfermedad de Chagas de su forma asintomática hacia la sintomática aún presenta cuestionamientos, sin embargo, los mecanismos propuestos para explicar la patogenicidad de la enfermedad incluyen lesión directa de las células parasitadas por *Trypanosoma cruzi*, lesión producida por toxinas liberadas por el parásito, alteraciones del sistema nervioso autónomo y lesión inducida por la respuesta autoinmune del hospedero, relacionados con diversos factores que determinan la evolución de la infección y que dependen fundamentalmente del parásito y del hospedero.

El fenómeno de autoinmunidad es consecuencia de los cambios fenotípicos inducidos por el ADN parasitario, concretamente por los minicírculos del ADN del cinetoplasto (ADNk) retenido en el genoma del paciente chagásico. Otros mecanismos que intentan explicar el carácter autoinmune de la enfermedad implican el mimetismo molecular, en este sentido se han identificado algunos autoantígenos que dan reacciones cruzadas con antígenos del parásito, como ocurre con la miosina, principal proteína del músculo cardíaco y la proteína B13 de *T. cruzi*. Un dato que apoya esta teoría es el hecho de que las lesiones cardíacas más graves se observan en la fase crónica con aparente ausencia de parásitos.

Independientemente del origen autoinmune o parasitario de las alteraciones orgánicas, se han postulado hipótesis que intentan explicar el desarrollo de la enfermedad. La *hipótesis neurogénica* defiende que es la destrucción neuronal tanto de tejido cardíaco como de los plexos mesentéricos, la responsable de la descompensación en la respuesta del simpático, debido a que las alteraciones van precedidas de daño miocárdico y disfunción ventricular izquierda.

La *hipótesis del estrés oxidativo* se basa en el daño producido en los miocitos por intermediarios reactivos de oxígeno como el NO producido en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, sin embargo no se puede asegurar si la disfunción de la mitocondria es un factor causante de la cardiomiopatía o un indicador de la patología.

Otros autores defienden la *hipótesis de la endotelina- 1 (ET-1)* como causa de la remodelación cardíaca, este vasoconstrictor y estimulante de crecimiento del músculo liso, producida por fibroblastos y cardiomiocitos se ha ligado a patologías cardiovasculares, siendo el principal factor que lleva a fallo cardíaco, siendo un posible inductor de vasoconstricción y modulador de las alteraciones vasculares observadas en la enfermedad de Chagas.

Esta información intenta explicar el origen multifactorial en la patogenia de la enfermedad, en donde parece necesaria la presencia del parásito o cuando menos la inclusión del ADN parasitario en el genoma del hospedero para inducir autoinmunidad, manteniéndose la enfermedad como consecuencia de la interacción sostenida entre el parásito y el sistema inmune del hospedero (Escario y Gómez, 2012).

1.10. Cuadro clínico

La enfermedad se caracteriza por presentar diferentes formas clínicas: la aguda, la indeterminada y la forma digestiva y cardiaca.

1.10.1. Fase aguda

Generalmente es asintomático, se evidencia una alta parasitemia, detectable por métodos parasitológicos directos. Este período se extiende por dos a cuatro meses y sólo un 5% de los infectados presenta manifestaciones clínicas generales.

Los pacientes agudos sintomáticos presentan fiebre acompañada de anorexia, astenia, mialgias, cefalea y ocasionalmente artralgias. El cuadro febril suele persistir por un período de dos a cuatro semanas. Otros síntomas inespecíficos frecuentes incluyen hepatoesplenomegalia, edema generalizado, adenomegalia, irritabilidad, somnolencia y diarrea.

Los signos de puerta de entrada o chagomas de inoculación, son lesiones cutáneas, más frecuentes en la cara y extremidades por ser los sitios más expuestos a los triatominos. Muy típico es el de la región ocular llamado signo de Romaña-Mazza, que se presenta como edema bipalpebral, unilateral, de color rosado violáceo claro, indoloro y duro, con aumento de tamaño de la glándula lagrimal accesoria (dacrioadenitis).

Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, con aspecto furúnculoideo y de color rosado violáceo e indurados; tienen una duración variable que puede extenderse hasta por 15 días (Apt y cols., 2008).

Las expresiones clínicas graves de la fase aguda son miocarditis y meningoencefalitis. Sólo del 1 al 2 % de los casos se detectan en esta fase (Flores y cols., 2009, Salazar y Marín, 2006).

1.10.2. Fase indeterminada

Una vez superada la etapa aguda comienza la fase indeterminada, una transición entre la fase aguda y la crónica en la cual prácticamente no existen manifestaciones clínicas y donde el sistema inmune controla la multiplicación del parásito, producto de esto, en la fase crónica la parasitemia suele ser baja (no detectable por métodos parasitológicos directos). El diagnóstico se realiza por medio de las técnicas serológicas y ocasionalmente por la detección o aislamiento e identificación del parásito en cultivo, inoculación de animales de laboratorio o xenodiagnóstico (Salazar y Marín, 2006).

1.10.3. Fase crónica

A la etapa indeterminada sigue la fase crónica durante la cual el parásito persiste en forma intracelular en regiones determinadas del organismo como el bazo, corazón, colon o nervios periféricos (según el tropismo de la cepa). Esta etapa puede prolongarse por años de forma asintomática hasta que se evidencian clínicamente las patologías asociadas a la enfermedad como son la cardiomegalia, megaesófago y megacolon.

Las manifestaciones cardíacas se presentan predominantemente en miocardio con evolución a insuficiencia cardíaca congestiva. Las manifestaciones clínicas dependen de la gravedad de las lesiones miocárdicas, de la presencia de insuficiencia cardíaca y del tipo de arritmias. Se ha estimado que la tercera parte de las personas infectadas tienen cardiopatía, disnea, palpitaciones e insuficiencia cardíaca, pero también puede ocurrir la muerte súbita.

Numerosos informes sudamericanos han establecido relación entre megaesófago y enfermedad de Chagas. Los megaesófago y megacolon ocurren hasta en un 90% en algunas áreas epidémicas de Brasil, Argentina, Chile y Bolivia y raro en Centroamérica y México (Rassi y cols., 2010). En México se hace referencia a una tesis profesional que data de 1964, en donde se reunieron los primeros nueve casos de megaesófago; en 1993, el grupo del doctor Ocampo fue el primero en informar de una paciente de 45 años con megaesófago y xenodiagnóstico positivo en Jalisco (Díaz y cols., 2000).

Sin embargo, aún no se han podido explicar satisfactoriamente las diferencias regionales en la prevalencia de los diferentes síndromes chagásicos.

1.11. Inmunopatología

La respuesta básica del hospedero a *Trypanosoma cruzi* parece ser una consecuencia directa de la multiplicación del parásito; esta multiplicación origina lesión por destrucción de las células del hospedero y/ o por mecanismos de sensibilización, las alteraciones degenerativas que pueden ocurrir en células no parasitadas son consecuencia de trastornos metabólicos inducidos por el proceso inflamatorio o por fenómenos de autoinmunidad (Salazar y Marín, 2006).

Los mecanismos clásicos de inmunidad adaptativa parecen tener un papel crucial, se sabe que el IFN γ , la IL 2 y el TNF producido por células Th1 (Células T cooperadoras tipo 1) juegan un papel protector (figura 8), mientras que la IL 10 e IL 4 producidas por Th2 favorecen la infección pues inhiben la acción tripanocida de los macrófagos activados, que favorece el establecimiento de la infección y que están relacionadas con la susceptibilidad del hospedero a *T. cruzi* (Montiel y Díaz, 2002).

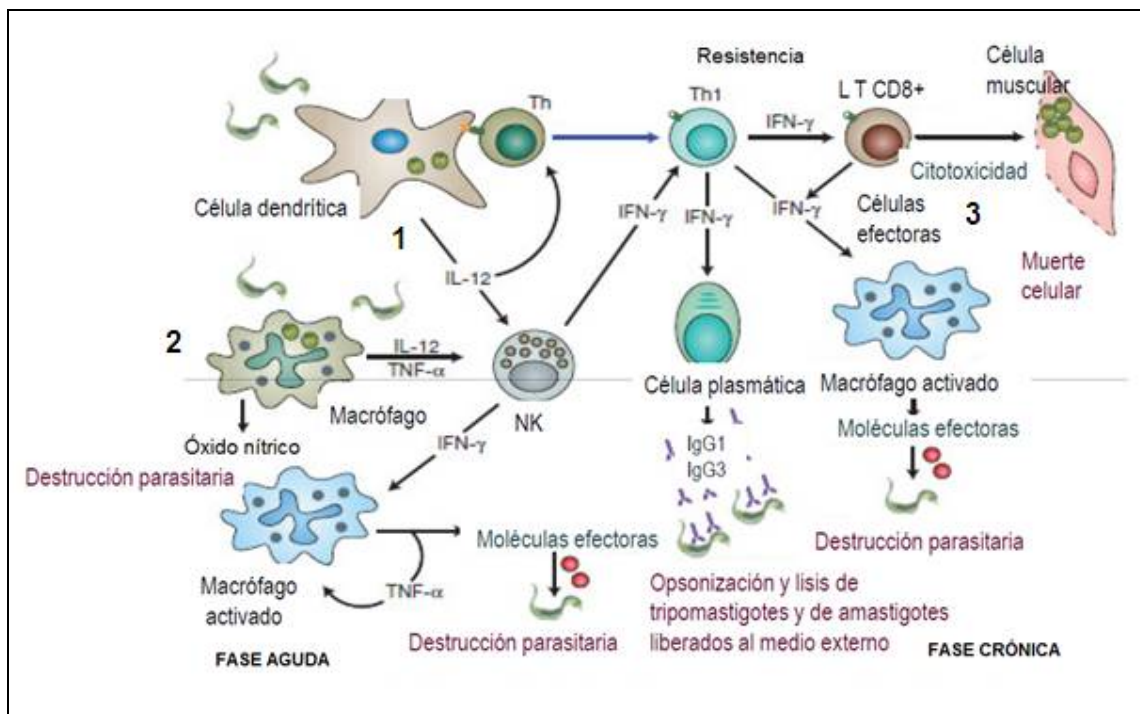


FIGURA 8. Respuesta inmune en fase aguda y crónica en la enfermedad de Chagas. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press (Junqueira, 2010).

1. El mecanismo clásico propuesto para la fase aguda de la infección involucra que *T. cruzi* ponga en funcionamiento la síntesis de IL- 12 por macrófagos, y que además se permita la síntesis de IFN- γ por células NK. Esta citocina volverá a aumentar la IL- 12 y la síntesis de IFN- α , así como la producción de óxido nítrico por macrófagos clásicamente activados contribuyendo con la eliminación del parásito (Sathler, 2009).

2. Los macrófagos son células activas en el control y muerte de parásitos por mecanismos oxidantes y no oxidantes (Stempin y Cerban, 2007). Aunque también pueden servir como células hospederas que facilitan la replicación y la sobrevivencia de patógenos (Cárdenas y cols., 2000). La IL-10 es una citocina que presenta funciones inmunosupresoras, inhibiendo la producción de IFN- γ por los macrófagos, más allá de disminuir la producción de NO (Manso y Arruda, 2009).

Estudios fenotípicos y funcionales han demostrado que las células NK aumentan la capacidad citotóxica. Esto puede soportar la hipótesis de que las células NK contribuyan en el control efectivo del parasitismo tisular en pacientes en fase indeterminada.

3. En la etapa crónica se incrementan los linfocitos T CD8+, pero disminuyen los CD4+. Cuando la respuesta inmune es protectora, la inflamación del miocardio suele ser menor y, por consiguiente disminuye la incidencia de necrosis y fibrosis miocárdica. La fuerte y descontrolada activación de células NK y monocitos pro- inflamatorios, puede llevar a daño tisular y desarrollo de enfermedad crónica severa.

Datos obtenidos de modelos experimentales han demostrado que células inflamatorias, como macrófagos, células T y las citocinas producidas desempeñan funciones importantes en la respuesta protectora. En este contexto, varios estudios vienen mostrando que las citocinas y otros mediadores de la inflamación (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, factor de agregación plaquetaria, etc.), desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune durante la infección por *T. cruzi*, encontrándose involucradas tanto en la resistencia a la infección, como en los mecanismos relacionados a la evolución de la enfermedad de Chagas (figura 9).

A. La progresión a la fase crónica va acompañada de un aumento en la respuesta celular, donde se observa un aumento en la frecuencia de células T CD4+ y CD8+ circulantes activadas. La frecuencia elevada de células T activadas CD4+CD28- en la sangre periférica de pacientes chagásicos está asociada con

B. la expresión de TNF- α e IL-10 en pacientes de las formas cardíaca e indeterminada, respectivamente, sugiriendo diferentes papeles funcionales para esas células.

Los niveles séricos de TNF están correlacionados a la gravedad de la disfunción cardíaca en pacientes chagásicos crónicos, sugiriendo que el desequilibrio en la producción de TNF se encuentra directamente relacionado a la progresión de la miocarditis chagásica crónica.

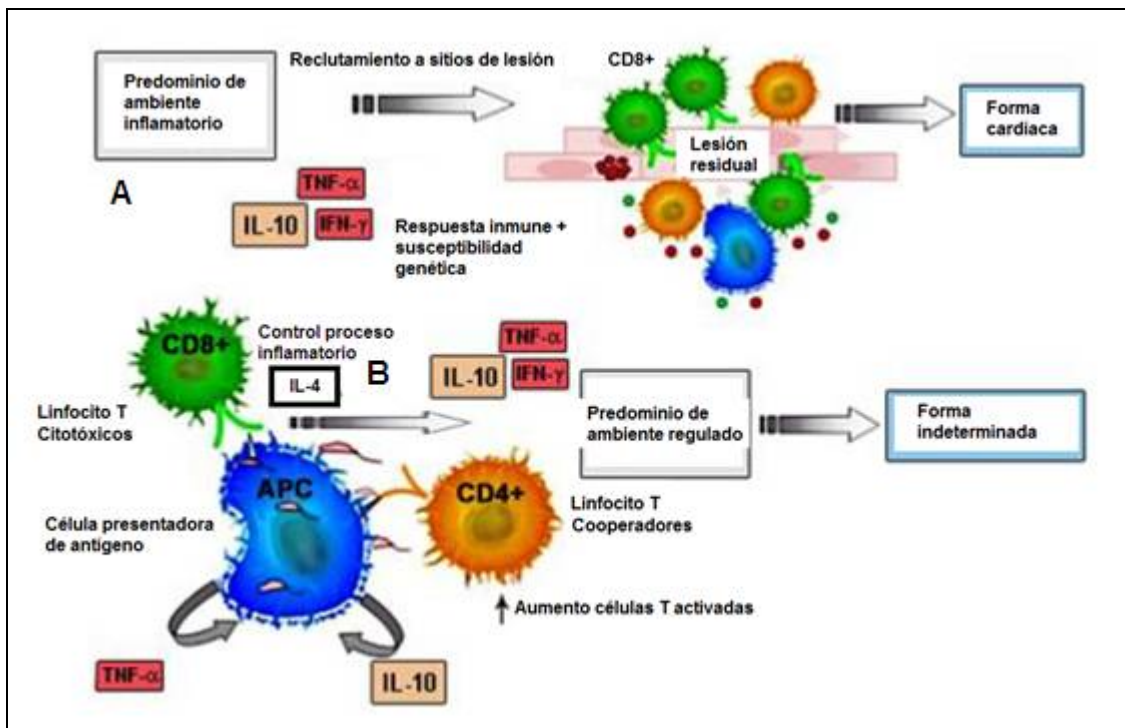


FIGURA 9. Respuesta inmune en las formas cardíaca e indeterminada en la enfermedad de Chagas. Tomado de Menezes y col. URL: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=170

C. B. La IL-4 tiene varias funciones, entre ellas estimula la proliferación de células B, regula las reacciones alérgicas e inhibe la activación de macrófagos, aumenta la fagocitosis y la actividad microbicida de macrófagos infectados por *T. cruzi*; en la fase crónica de la infección es fundamental para el control del proceso inflamatorio en el tejido cardíaco.

Las citocinas proinflamatorias IFN γ y TNF también podrían modular la expresión de moléculas como las de adhesión celular y las quimiocinas, involucradas en el control del crecimiento del *T. cruzi* en macrófagos, así como en el control del reclutamiento y de la migración celular lo que contribuye con la cronicidad de la inflamación.

Análisis funcionales de linfocitos T de individuos chagásicos revelan que esas células producen grandes cantidades de citocinas IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ con relación a individuos no infectados, sugiriendo la existencia simultánea de reactividad celular anti y pro inflamatoria frente a la presencia constante de estímulo antigénico. Bahia-Oliveira y colaboradores verificaron que los pacientes chagásicos tratados (curados) presentaban una mayor producción de IFN- γ que los no curados, sugiriendo un papel protector para esa citocina en el proceso de cura (Cruz, 2005).

1.12. Estrategias de tratamiento.

No existe un fármaco ideal para el tratamiento específico de la Enfermedad de Chagas. Los fármacos actualmente disponibles y aceptados por casi todos los ministerios de salud de Latinoamérica son el Benznidazol (desarrollado en 1974 y producido en Brasil; 100 píldoras de 100 mg) y el nifurtimox (o “Lampit” de 1974, actualmente producido solo por la OMS, píldoras de 120 mg). Estas drogas comenzaron a utilizarse en fase aguda y más tarde en fase crónica de la enfermedad, en población infantil y joven (Rodríguez y Perotti, 2011).

Los objetivos del tratamiento específico contra la infección por *T. cruzi* son eliminar al parásito de las personas infectadas para disminuir la probabilidad de desarrollar patología cardíaca y digestiva, cortar la cadena de transmisión de *T. cruzi*, disminuir el número de niños nacidos con el protozoario y aumentar el número de donantes de sangre y órganos (TDR/GTC, 2005).

El Benznidazol inhibe la síntesis de proteínas originando una degradación de la biosíntesis de macromoléculas y el Nifurtimox (derivado del nitrofurano) estimula la formación del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno, lo que posee acción tripanocida, sin embargo este mecanismo de acción también explica los efectos tóxicos del medicamento (Werner y Zulantay, 2011). La reacción adversa más común de estos fármacos es la intolerancia gastrointestinal, la cual se manifiesta como anorexia, náuseas, vómito y dolor abdominal. Los efectos neurológicos incluyen insomnio, desorientación, nerviosismo y neuritis periférica. Son raras las alucinaciones y las convulsiones (Villagrán y De Diego, 2008).

La administración de estos medicamentos debe ser vigilada estrechamente ya que la frecuencia de efectos secundarios es muy alta (Sosa, 2009), la tabla 4 muestra el esquema de tratamiento de acuerdo a distintos contextos clínicos (Rodríguez, 2005).

Tabla 4. Esquemas de tratamiento de medicamentos anti chagásicos.

TRATAMIENTO	FASE AGUDA, CONGÉNITO	ACCIDENTAL	FASE CRÓNICA RECIENTE
BENZNIDAZOL	5- 7.5 mg/kg/d; <40 kg hasta 7.5 mg/kg/d.	5 mg/kg/d	5 mg/kg/d
NIFURTIMOX	8- 10 mg/kg/d;< 40kg hasta 12 mg/kg/d	8 mg/kg/d	8 mg/kg/d
TIEMPO	Vía oral, 30- 60 días (hasta 90 días) consecutivamente, dividido en 2 o 3 dosis diarias.	Tratamiento inmediato, sólo por 10- 15 días consecutivos.	30- 60 días, dividido en 2 o 3 dosis diarias.

Algunas estrategias para la búsqueda de nuevos tratamientos tripanocidas incluyen el tamizaje de compuestos como inhibidores de síntesis de ergosterol, inhibidores del metabolismo de pirofosfato o inhibidores de las purinas; también se están desarrollando estudios para crear nuevas formulaciones de Benznidazol y Nifurtimox en solución, suspensión y comprimidos para uso pediátrico (Sosa, 2009). En la última década, se han realizado varios estudios enfocados a encontrar una vacuna, identificándose antígenos, rutas de inmunización, adyuvantes y mecanismos inmunológicos capaces de conferir protección contra la infección por *T. cruzi*. Sin embargo, hasta el momento la inmunidad conferida no ha sido capaz de prevenir la infección.

Aunque el Nifurtimox y Benznidazol tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, provocando la cura parasitológica hasta en un 80% de los pacientes tratados oportunamente. Diagnosticada en el embarazo, la enfermedad de Chagas congénita es fácilmente tratable en recién nacidos, con tasas de curación de casi el 100 % (Carabarán y cols., 2013). La eficacia de estos fármacos también es reconocida durante la fase crónica reciente (por ejemplo niños hasta 12 años de edad), accidentes de laboratorio o quirúrgicos, sin embargo durante la fase crónica tardía de la enfermedad, estas drogas tienen muy baja actividad tripanocida, de tal manera que más del 80% de los pacientes tratados son resistentes al tratamiento. Por otra parte, estudios en pacientes crónicos tratados con Benznidazol tuvieron una significativa reducción en cambios

electrocardiográficos y manifestaron una baja frecuencia de deterioro en su condición clínica, aunque la cura parasitológica fue nula (Sosa, 2009).

Aunque la eficacia del tratamiento etiológico contra la infección por *T. cruzi* sea demostrada, las herramientas para su evaluación son todavía de implementación e interpretación complejas. Un tema importante que aún necesita ser discutido es la definición de cura de pacientes que recibieron tratamiento etiológico. Hasta ahora, el criterio universalmente aceptado es el obtenido por la conversión negativa de la serología convencional. Sin embargo el inconveniente son aquellos pacientes en quienes la enfermedad ha evolucionado de tiempo atrás y la evidencia de la conversión negativa sólo puede observarse muchos años más tarde. Por esa razón es importante utilizar diferentes ensayos serológicos.

En México se tiene dificultad de importación por no encontrarse en el Cuadro Básico de Medicamentos y es necesaria la gestión a nivel secretarial para lograr agilidad en los trámites de importación a través de OPS-OMS o de Bayer México.

1.13. Medidas de prevención y control

Está ampliamente demostrado que la distribución de los vectores y su domesticación obedece a múltiples variables ambientales (nicho ecológico), así como demográficas y socioculturales, por esta situación el conocimiento de factores determinantes para su dispersión es importante para estratificar áreas de riesgo y para la selección de estrategias de vigilancia y control.

Las iniciativas intergubernamentales para mejorar la prevención, el control y la atención de la enfermedad de Chagas en América Latina, basadas en el control de los vectores, transfusiones de sangre y en el diagnóstico y tratamiento de los casos, son: la Iniciativa del Cono Sur, iniciada en 1991 (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay); la Iniciativa de los Países Andinos, que arrancó en 1997 (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela); la Iniciativa de los Países de Centroamérica, creada en 1997 (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y en 2012 se integra México) y la Iniciativa de los Países Amazónicos para la vigilancia y el control de la enfermedad de

Chagas, iniciada en 2004 (Guayana francesa, República Bolivariana de Venezuela) (OMS, 2010).

En México las intervenciones y acciones para prevención y control de la enfermedad de Chagas incluyen:

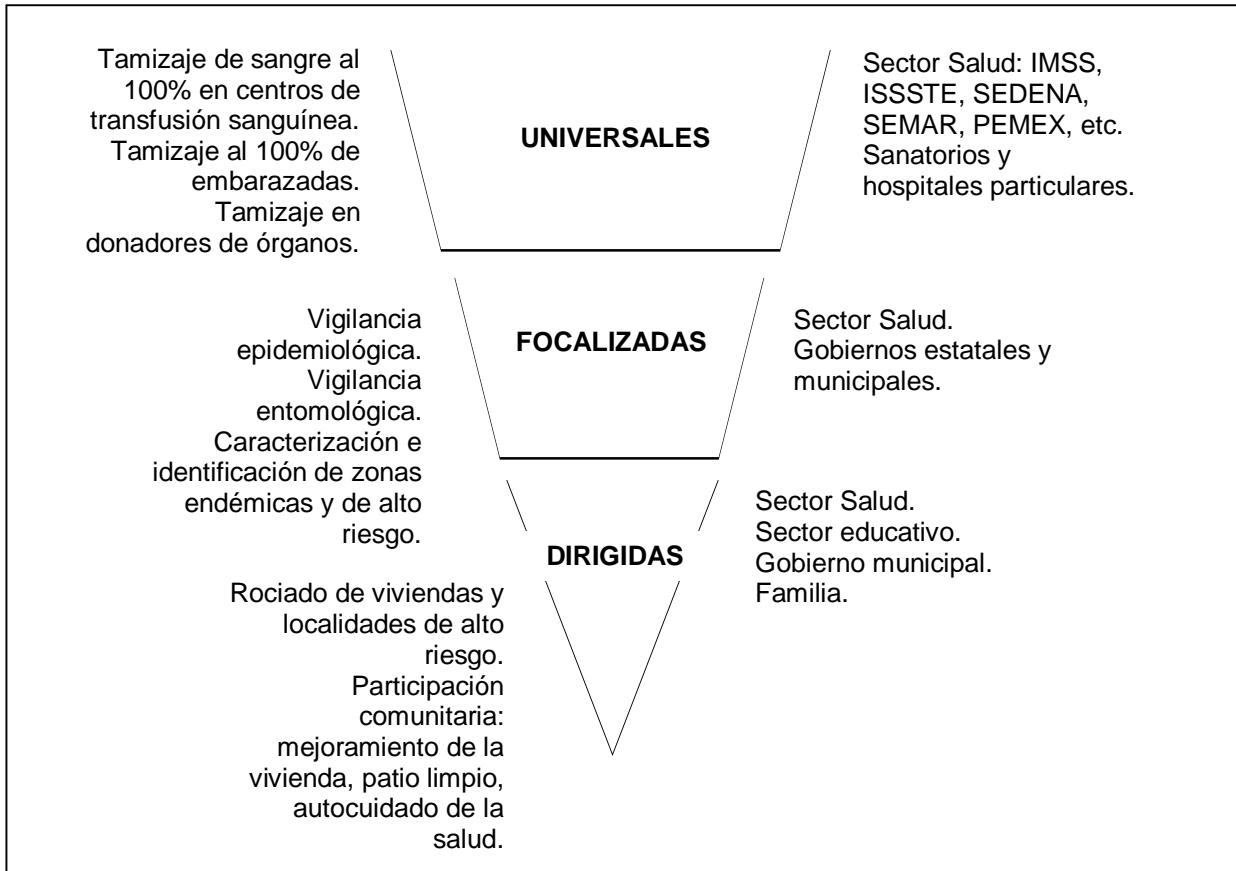


FIGURA 10. Intervenciones y acciones para prevención y control de la Enfermedad de Chagas. Fuente: SINAVE/ DGE/ SALUD, 2012

Y entre las medidas disponibles para el control vectorial se incluye:

- La aplicación de insecticidas piretroides (deltametrina 5% o lambdacialotrina 10%) en la casa donde ocurrió la transmisión y donde habita el enfermo, incluyendo casas vecinas, así como en posibles refugios del vector como perreras, gallineros y cobertizos anexos a la vivienda, verificando la existencia de triatominos antes y después del rociado con fines de evaluación.
- El mejoramiento de la vivienda: consiste en rellenar fisuras en paredes, pisos de concreto o tierra compactada, sustitución de techos de teja y palma por tejas de

c) cerámica o láminas y limpieza periódica así como evitar almacenaje de cosechas dentro de la vivienda.

1.14. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

La demostración de la presencia del parásito constituye el diagnóstico de certeza de la infección. Sin embargo, sólo es posible detectar eficientemente la forma circulante de *Trypanosoma cruzi* durante la fase aguda de la infección. En etapas posteriores, el diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de anticuerpos específicos.

Los métodos de diagnóstico son seleccionados basándose en la historia natural de la enfermedad. En la fase aguda, los métodos parasitológicos (o directos) son los más adecuados; mientras que en la fase crónica, cuando la parasitemia suele ser baja e incluso indetectable, el diagnóstico se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos contra el parásito (métodos indirectos).

En la figura 11 se observa que la cinética de anticuerpos se caracteriza en un inicio por la presencia de anticuerpos clase IgM mientras que los de clase IgG aparecen tardíamente en la fase aguda y acompañan el progreso de la infección hasta la fase crónica en donde persisten (Salazar y Marín, 2006), siendo esta clase de anticuerpos los que son detectados por los métodos serológicos.

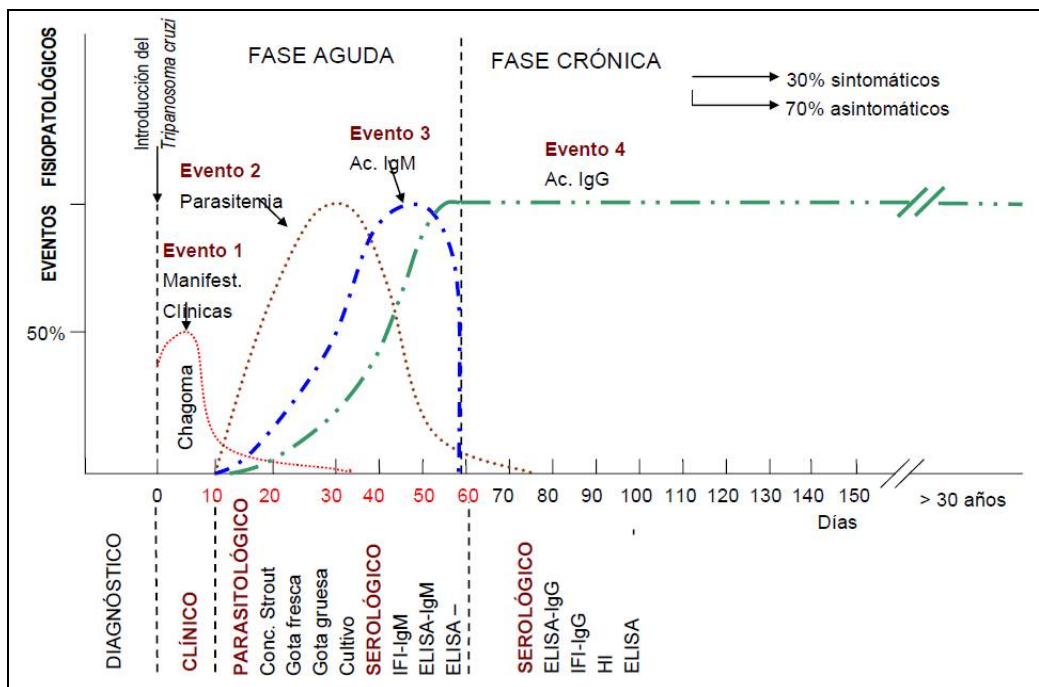


FIGURA 11. Historia natural de la Enfermedad de Chagas en el hombre. Fuente: “NORMA TÉCNICA PARA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”. Equipo Técnico Ministerio de Salud. Dirección de Regulación y Legislación en Salud Unidad de Salud Ambiental. El Salvador, Marzo 2011.

Métodos parasitológicos (directos)

Los métodos directos o parasitológicos, se basan en la demostración de la presencia del parásito en sangre circulante, entre estos métodos se encuentran los siguientes:

El **examen de sangre en fresco** consiste en examinar directamente con el microscopio una gota de sangre del individuo con sospecha de infección, buscándose las formas tripomastigotes; es la prueba más sencilla, rápida y económica que permite demostrar la presencia del parásito en las formas aguda y congénita de la enfermedad de Chagas,

Las **técnicas de concentración** como la técnica de **microconcentración** consisten en concentrar los parásitos en una muestra de sangre mediante centrifugación. Los elementos de la sangre se separarán en un gradiente de densidad, concentrándose los glóbulos rojos en la parte inferior del capilar, sobre ella se ubica un anillo blanquecino de 1 mm de altura conformado por los glóbulos blancos y en la parte superior líquida transparente se encuentra el plasma. En donde los tripanosomas presentes en la muestra se ubicarán entre los glóbulos blancos y el plasma.

La técnica de **Concentración de Strout** se basa en la concentración de los parásitos en la muestra sanguínea por centrifugación y examen (al microscopio) del sedimento del plasma centrifugado.

El **Hemocultivo** consiste en sembrar una muestra de sangre en medio de cultivo Novy, Mc Neal y Nicole con la finalidad de amplificar el número de parásitos presentes y confirmar el diagnóstico. El tiempo que se requiere para demostrar la positividad del cultivo, depende de la densidad parasitaria de la muestra sembrada y de la adaptabilidad del parásito al medio. Generalmente esto ocurre después de 1 a 2 meses.

El **Xenodiagnóstico** permite la multiplicación *in vivo* y consiste en hacer picar a la persona sospechosa de infección por el vector libre de infección (ninfas de III o IV estadio), de preferencia la especie de triatomino de mayor importancia en la región. Es aplicable tanto en la forma clínica aguda como en la crónica (Vega y Náquira, 2005).

El examen parasitológico puede lograrse en todos los casos agudos e infecciones congénitas hasta 6 semanas después de la infección y sólo es posible en 40 % de los casos crónicos, la tabla 5 muestra la sensibilidad de los métodos parasitológicos disponibles en diagnósticos de fase aguda y en menor grado de fase crónica.

Tabla 5. Desempeño de los métodos parasitológicos.

MÉTODO	SENSIBILIDAD (%)	FASE CLÍNICA
Directo	80- 90/ <10	Aguda/ crónica
Frotis	<60/ <10	Aguda/ crónica
Gota gruesa	<70/ <10	Aguda/ crónica
Strout	90- 100/ <10	Aguda/ crónica
Microstrout	90- 100/ <10	Aguda/ crónica
Microhematocrito	90- 100/ No valorado	Aguda/ crónica
Hemocultivo	90- 100/ 20- 50	Aguda/ crónica
Xenodiagnóstico	90- 100/ 20- 50	Aguda/ crónica

Salazar 2006. Modificado de *The Control of Chagas' Disease. WHO Technical Report Series No. 811. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1991.*

Una novedad en la identificación de *T. cruzi* es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene sensibilidad de 100% y especificidad de 96%, utilizando los oligonucleótidos KNS-1 y KNS- 2 obtenidos a partir de secuencias del ADN en los minicírculos del cinetoplasto. Con esta nanotécnica es factible medir de 0.8 a 1.5

moléculas del minicírculo, es decir, 1/ 12, 000 partes del parásito, a través de sondas específicas, siendo esta tecnología muy útil en estudios clínicos, en encuestas epidemiológicas y en vigilancia en bancos de sangre (Vega y Náquira, 2005).

Métodos serológicos (indirectos)

Permiten la detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*, se pueden dividir a su vez en: pruebas convencionales, en las que el antígeno es el parásito completo, extractos solubles (o parcialmente purificados) y pruebas no convencionales con antígenos recombinantes, péptidos sintéticos, antígenos multiepítopos o con mezclas de ellos.

En el algoritmo de diagnóstico se siguen considerando las recomendaciones de la OMS de las normas MT Mercosur (Res 42/ 00) y de OPS, que recomiendan un par serológico para alcanzar una sensibilidad del 98 a 99.5% para la detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* (Vega y Náquira, 2005).

En 2002, la OMS recomienda para tamizaje o *screening* un método de alta sensibilidad (>99%) y para diagnóstico un par serológico. En Argentina y Brasil se recomienda en tamizaje y en diagnóstico el par serológico y en México en base a la NOM-032-SSA2-2010 para confirmación del diagnóstico por laboratorio cita que al menos dos pruebas serológicas de formato diferente deben utilizarse, así por ejemplo si empleamos el binomio ELISA e IFI, la primera altamente sensible y la segunda de elevada especificidad que complementa y ratifica el resultado obtenido, en conjunto se alcanza una sensibilidad y especificidad del 95 al 98%.

En México los métodos serológicos disponibles son los recomendados por los grupos de expertos internacionales y de acuerdo a su composición antigénica presentan diferentes características de desempeño (tabla 6).

Tabla 6. Desempeño de las pruebas serológicas disponibles en el mercado en base a su composición antigénica.

	Método	Fracciones antigénicas	Sensibilidad	Especificidad	Empresa
1	ELISA	Ag crudo (cepas Y, Tulahuen y MNV2)	100%*	100%*	Bioschile
2	ELISA	Ag purificados	100%*	>90%*	Lab. Lemos
3	ELISA	Ag crudo (epimastigotes, cepa Y)	96%*	98%*	IICS
4	ELISA	Ag crudo (epimastigotes, cepa Y)	100%*	99.5%*	Biomérieux
5	IFI	Ag crudo (epimastigotes)	100 %	100 %	InDRE
6	ELISA	CRA + FRA	100%	100%	Bio-Manguinhos
7	ELISA Ag rec	Ag1, Ag2, Ag30, SAPA, Ag13 y Ag36	100%*	99.6%*	Wiener
8	ELISA	TcD, TcE, PEP-2 y TcLo1.2 (multiepitope)	100%*	97.4-99.5%*	Biokit
9	ELISA	TcD, TcE, PEP-2 y TcLo1.2 (multiepitope)	100%	98.9%	Biomérieux
10	ELISA PS	B13, 1F8 y H49	99.7%	98.6%	
11	Inmunodot	Ag1, Ag2, Ag30 y SAPA	99.6%	99.1%	Gador
12	Inmunofiltración PS	Ag2, TcD y TcE	96.8%	94.6%	Diamed
13	AP PS	Mezcla de péptidos sintéticos	Fujirebio
14	Inmunocromatografía	Mezcla de Antígenos recombinantes	98.5-100%	94.8-98.6%	Chembio
15	Inmunoblot rec+PS	CRA, FRA, Tc-24, SAPA, MAP, TcD y Ag39	100%	99.3%	Innogenetics
16	Inmunoblot rec+PS	CRA, FRA, Tc-24, SAPA, MAP, TcD y Ag39	99.4%	98.1%	Innogenetics
17	Western blot	TESA (<i>Trypomastigote Excreted-secreted Antigens</i>)	100%	98.5%	Biomérieux

1 - 5: Pruebas convencionales; 6 - 10: Pruebas mejoradas con Antígenos recombinantes y/o PS; 11 - 14: Pruebas rápidas No Convencionales; 15 - 17: Pruebas suplementarias. AP: Aglutinación de partículas, Ag rec: antígenos recombinantes, PS: péptidos sintéticos, (*): Valores que constan en los informes técnicos de los conjuntos diagnósticos (WHO, 2010).

Existe otro grupo de métodos conocidos como pruebas suplementarias, y es en este grupo donde se ubican técnicas como la Inmunolectrotransferencia (*Western Blot*) y la radioinmunoprecipitación (RIPA), sin embargo su disponibilidad se limita por el momento a universidades e instituciones de investigación.

En un principio la **Inmunolectrotransferencia (IET)** o *Western Blot* surgió en el contexto de los métodos de análisis de ácidos nucleicos. Entre los padres de la técnica destaca Ulrich K. Laemmli, quien primero describió la electroforesis discontinua en geles que contenían SDS (dodecil sulfato sódico). Después Towbin y cols., describieron la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a hojas de nitrocelulosa (Towbin y cols., 1979), pero quien fue esencial para llegar hasta este protocolo fue sir Edwin Southern, el inventor del *Southern blot*, proseguida por el *Northern blot* y el *Western blot*,

ésta última utilizando gel, nitrocelulosa y varias hojas de *blotting paper*, revolucionando así la biología molecular, a mediados de los años setenta (De la Fuente y cols., 2007).

El fundamento es interesante, la electroforesis en geles de poliacrilamida combina la migración de moléculas por medio de la creación de un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida, lo que separa las moléculas por peso y carga, tiene un alto poder resolutivo sobre todo en la caracterización de moléculas en mezclas complejas ricas en proteínas (De la Fuente, 2007). La presencia de SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de éstas, así los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa; el DTT permite la separación de proteínas desnaturadas y reducidas (debido a la ruptura de puentes disulfuro) (García, 2000). La transferencia a membranas de nitrocelulosa tiene lugar mediante el paso de corriente eléctrica (a pH neutro), como consecuencia, las moléculas proteicas se movilizan hacia la membrana de nitrocelulosa (fase sólida) donde se fijan por adsorción pasiva.

Finalmente en la inmunodetección, en una primera fase las moléculas proteicas son identificadas por la interacción con anticuerpos específicos presentes en el suero, posteriormente antigamaglobulinas específicas ligadas a una enzima (conjugado) se adicionan a la tira sensibilizada y finalmente el revelado de la actividad enzimática se hace con sustratos cromogénicos, este tipo de sustratos dan productos insolubles y coloreados (precipitado) en la membrana, proporcional a la cantidad del complejo antígeno anticuerpo presentes; no requieren equipo especial para la visualización ya que en la membrana permanece el producto azul/ morado insoluble, siendo un sistema rápido y muy sensible en la detección y caracterización de proteínas.

En el Laboratorio de Chagas, InDRE se desarrolló la IET con el objetivo de identificar complejos moleculares con potencial como marcadores serológicos o de pronóstico, los resultados llevaron a un Procedimiento Operativo Estandarizado con la finalidad de implementarla en el laboratorio como apoyo al algoritmo de diagnóstico (con fines de confirmación) y referencia (solución de discrepancias). Durante la investigación para la búsqueda y selección de moléculas de alto rendimiento en detección de individuos en Fase Crónica Asintomática, se encontró que moléculas de entre 66.6 a 76.7 kDa poseían la

mayor capacidad para clasificar correctamente a este grupo. De las 6 regiones identificadas, con un peso molecular relativo promedio de 71, 107, 129, 148, 163 y 208 kDa en aislados mexicanos, la banda de peso relativo 72 kDa mostró alto potencial para inmunodiagnóstico de la infección con *T. cruzi* en FCA con especificidad y sensibilidad del 100 %.

2. Documentando la utilidad diagnóstica de los resultados

Los Sistemas de Gestión de la Calidad se basan en normativas que regulan y normalizan un conjunto de actividades de planificación, control, prevención de errores y mejora continua (OPS, 2005).

En México, la norma vigente es la NMX-EC-15189- IMNC-2008, Laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y la competencia (NMX-EC-15189- IMNC-2008/ ISO 15189: 2007). Contiene en su estructura dos componentes fundamentales: los requisitos del sistema de gestión y los requisitos técnicos. La sección de requisitos técnicos abarca todo el proceso analítico, desde la etapa pre-examen hasta la post- examen, en el numeral [5.5], específicamente el [5.5.1] **Procedimientos de examen** cita que “Si se utilizan procedimientos desarrollados por el laboratorio, estos deben validarse apropiadamente para el uso al que están destinados y ser completamente documentados” haciendo referencia a los estudios de validación.

La figura 12 esquematiza las actividades a realizar y aspectos a considerar al llevar a cabo la evaluación de procedimientos de examen o de medida.

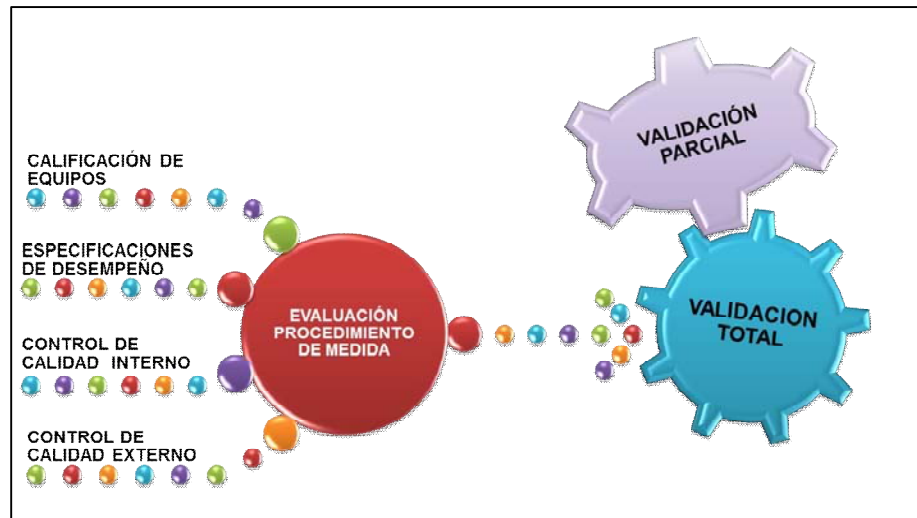


FIGURA 12. Evaluación de procedimientos de medida o de examen en el laboratorio
(Adaptado de Migliarino, 2010).

2.1. Calificación de equipos

La NMX- EC- 15189- IMNC- 2008 numeral [5.3.2] cita que “se debe demostrar que el equipamiento (tanto en su instalación como en su uso de rutina) es apto para lograr el desempeño requerido y debe cumplir con las especificaciones pertinentes para los análisis involucrados”.

En el InDRE, el departamento de Ingeniería Biomédica cuenta con programas que establecen los mecanismos de calibración, de recalibración periódica y de mantenimiento preventivo y correctivo de los dispositivos médicos. El éxito de dichos programas depende de una buena planificación, así como de la disponibilidad de recursos financieros, por tanto una gestión de equipos adecuada impactará positivamente sobre la calidad de los resultados generados.

2.2. Especificaciones de desempeño

La variación es consecuencia de la interacción de métodos, dispositivos médicos, personal, medio ambiente, materiales y reactivos (OPS, 2005), por lo tanto se tienen que establecer las especificaciones de desempeño del método, que son el valor esperado y su tolerancia, esta se entiende como la variabilidad aceptable, que permite al método desempeñarse satisfactoriamente. Las especificaciones de desempeño se establecen

durante la fase de establecimiento del Procedimiento Operativo Estandarizado, que culmina con su **validación**, el cual debe ser **verificado** para su implementación en la rutina.

2.3. Evaluación de procedimientos de medida

En la selección y aplicación de pruebas de diagnóstico, es imprescindible demostrar su validez confirmada con evidencias objetivas y documentadas de que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico, estableciendo las características de desempeño y limitaciones del método (EURACHEM Working Group, 1998). La validación es importante ya que la Planificación de Calidad (*Quality Planning* o QP) se establece a partir de procesos validados que satisfacerán las necesidades del cliente (Westgard, 2010).

La validación se sustenta en la validez diagnóstica de la prueba en su escenario de aplicación.

Para determinar la validez diagnóstica se realiza un estudio comparativo, en donde se reta la prueba a validar contra el material de referencia (patrón oro o “*gold standard*”) que clasifica correctamente los sujetos con y sin la enfermedad (Vera y cols., 2005). El resultado de esta comparación se expresa con los índices de sensibilidad y especificidad, o combinaciones de éstos índices como los cocientes de probabilidad o los valores predictivos (Trullols, 2006 Zamora y Abaira, 2008). La tabla 7 muestra los requerimientos mínimos en la validación de métodos cuantitativos y cualitativos.

Los individuos seleccionados que componen la población de referencia deben estar distribuidos a lo largo del espectro de la enfermedad y también es necesario conocer la precisión que señala la reactividad cruzada con infecciones provocadas por organismos cercanos filogenéticamente (Zamora y Abaira, 2008).

Tabla 7. Requerimientos mínimos para la validación y/ o verificación de métodos cuantitativos y cualitativos aplicados a diagnóstico.

TIPO DE MÉTODO	VALIDACIÓN	VERIFICACIÓN
CUANTITATIVOS	Precisión Veracidad Linealidad Interferencias analíticas Límite inferior Intervalos de confianza Selectividad Sensibilidad analítica Especificidad analítica Incertidumbre	Precisión Veracidad Linealidad Límite inferior Verificación de intervalos de referencia Interferencia analíticas Sensibilidad analítica Especificidad analítica Incertidumbre
CUALITATIVOS	Efecto matriz Interferencias analíticas Capacidad discriminante Sensibilidad Especificidad Tasa de falsos positivos y negativos Límite de corte y su incertidumbre Límite de detección	Sensibilidad Especificidad Valor predictivo positivo Valor predictivo negativo Tasa de falsos positivos Tasa de falsos negativos Exactitud relativa

El proceso de validación requiere la consideración de facilidad de ejecución, los recursos operacionales y características operativas (Trullols, 2006) del método. Los diseños de validación prospectivos son adecuados cuando se desarrolla un nuevo método analítico (TDR, 2007, Trullols, 2006) mientras que la validación retrospectiva se aplica a métodos ya validados en donde el objetivo principal es verificar si el método aún conserva el funcionamiento o desempeño adecuado. Un nivel superior de validación es la comparación interlaboratorios, en que varios laboratorios estiman la propiedad de la muestra, por ejemplo en métodos de ensayo con amplias perspectivas de aplicación.

La revalidación se lleva a cabo con la introducción de un cambio que pueda afectar el desempeño del método analítico, esta podrá ser total o parcial, dependiendo del tipo de cambio efectuado (Morales de la Cruz, 2004).

Requisito para la **verificación** lo comprende el estudio de validación realizado por el fabricante o desarrollador, la verificación asegura que el desempeño del ensayo es de acuerdo a las especificaciones de fabricante lo cual garantiza la utilidad diagnóstica de los resultados. Es importante utilizar paneles y controles de tercera opinión (Migliarino, 2010).

La aplicación combinada de los protocolos EP 12 A2 y EP 15 A2 permite realizar un estudio de validación eficiente y de bajo costo. Los parámetros operativos son determinados de acuerdo a las directrices del EP 12 A2 y los componentes de precisión siguiendo la guía EP 15 A2 (Migliarino, 2010).

2.4. Control de calidad

Para planificar el control de calidad son indispensables los resultados de la validación (y/o verificación) ya que proporciona los parámetros críticos a controlar para asegurar el desempeño de la metodología y utilidad clínica del resultado obtenido (Trullols, 2006).

2.4.1. Control de Calidad Interno

El Control de Calidad Interno o Control de Calidad Interlaboratorio es esencial para detectar problemas que surgen durante la operación rutinaria de los métodos de laboratorio. El CCI es de utilidad porque permite monitorear la imprecisión en las condiciones de trabajo, comparándose el desempeño del laboratorio con sí mismo en función del tiempo (Westgard, 2010) mediante la inclusión de un Suero Control Interno (CI) de baja reactividad que permita identificar las desviaciones en el procedimiento de medida en muestras con reactividades cercanas al umbral de corte.

2.4.2. Control de Calidad Externo

Un programa de evaluación externa de la calidad es una herramienta donde un grupo de laboratorios analiza la misma muestra o panel de muestras en las mismas condiciones de rutina de sus laboratorios y presentan sus resultados a un centro organizador o proveedor que analiza los datos, calcula las medias y desviaciones estándar para caracterizar el desempeño de un grupo de laboratorios, generándose reportes que permiten comparar el desempeño de un laboratorio individual con el del grupo y algunas veces con valores *target* establecidos por métodos de referencia o por laboratorios de referencia. Los programas de evaluación externa de la calidad pueden combinar las características de programas de comparación y de evaluación de la competencia, éstos últimos requieren que se analice un grupo de cinco muestras de tres veces a cuatro veces al año. Los resultados luego se clasifican como aceptables o no aceptables en base a las regulaciones aplicables, para así, evaluar y documentar el desempeño del laboratorio (Westgard, 2010).

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico serológico de las enfermedades parasitarias enfrenta muchos retos, en particular la enfermedad de Chagas que no dispone de un diagnóstico confirmatorio debido a la carencia de un estándar o método de referencia. Las pruebas existentes, a pesar de su variabilidad, se recomiendan por los grupos de expertos de OMS/OPS dada su utilidad clínica demostrada en estudios multicéntricos (OMS, 2007).

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se recomienda un par serológico de diferente principio, pero una limitante es la presencia de resultados discrepantes (no concluyentes) que se pueden observar hasta en un 12% (dependiendo de la prueba seleccionada), situación que ha llevado a la necesidad de emplear una tercera prueba en la solución de discrepancias. En el Laboratorio de Enfermedad de Chagas, se estandarizó la técnica de Inmunolectrotransferencia (*Western blot*), que combina el poder resolutivo de la electroforesis y la especificidad de los anticuerpos para descubrir moléculas inmunodominantes en mezclas antigénicas complejas y se identificó una molécula de peso relativo de 70 a 75 kDa como marcador serológico de infección mostrando una especificidad y sensibilidad del 100 %, estos parámetros operativos deben ser verificados antes de implementar la metodología en el algoritmo serológico.

HIPÓTESIS

Si el marcador de 72 kDa es altamente específico y sensible en la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en individuos crónico asintomáticos, entonces esperamos que este marcador serológico sea válido para el uso previsto.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la validez del marcador de 72 kDa para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en individuos asintomáticos.

Objetivos particulares

1. Verificar las características de desempeño: sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, presencia de reactividad cruzada e imprecisión de la Inmunoelectrotransferencia (IET).
2. Establecer la utilidad de la IET en la resolución de discrepancias.

CAPÍTULO 2

DISEÑO EXPERIMENTAL

Verificación del método

2.1. Tipo de estudio

- ESTUDIO RETROSPECTIVO, TRANSVERSAL, COMPARATIVO, ESTUDIO DE VALIDACIÓN.

2.2. Estrategia utilizada

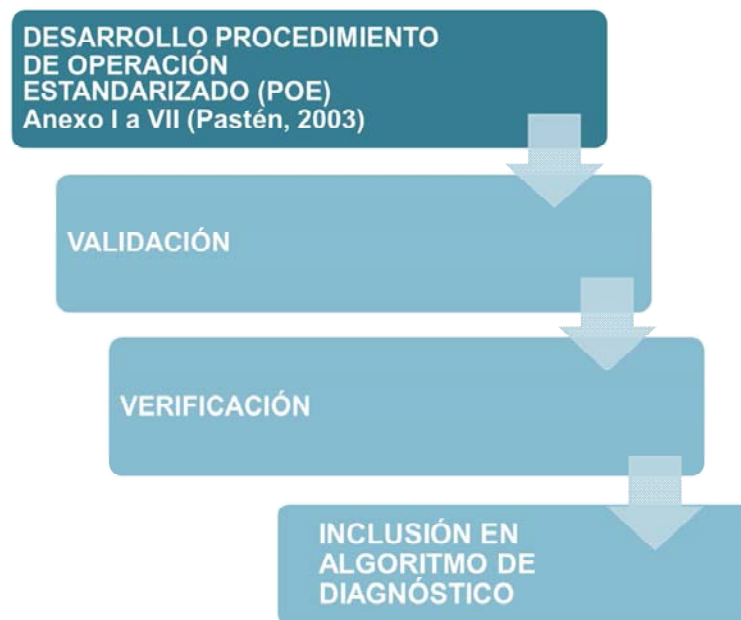


FIGURA 13. Diagrama de flujo que muestra la estrategia utilizada en el desarrollo de la IET en LeCh-IndRE

2.3. Panel de referencia

Se utilizó un panel de referencia constituido por 159 miembros estratificados como sigue:

Panel 1(PA-08): Constituido por 25 sueros no diluidos; 18 reactivos y 7 no reactivos a 16 pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* (anexo IX).

Panel 2 (PMT 203): Panel de tercera opinión, constituido por 14 plasmas no diluidos y sin conservadores, 13 reactivos y 1 no reactivo a *Trypanosoma cruzi*, provenientes de Estados Unidos, Centro, Sur de América y México, caracterizados con 9 pruebas serológicas (anexo X).

Panel 3 (PA-10): Constituido por 75 sueros de individuos no reactivos a *Trypanosoma cruzi*, confirmados por tres técnicas serológicas diferentes (HAI- InDRE, IFI- InDRE, ELISA- InDRE) (anexo XI).

Panel 4 (LEISH): Constituido por 15 sueros de individuos mestizos mexicanos con diagnóstico clínico y serológico reactivos a leishmaniosis cutánea localizada (tabla 13).

Panel 5 (TOXO): Constituido por 15 sueros de individuos mestizos mexicanos con diagnóstico clínico y serológico de toxoplasmosis (tabla 14).

Panel 6 (TB): Constituido por 15 sueros de individuos mestizos mexicanos con tuberculosis pulmonar activa confirmada por cultivo Löwenstein- Jensen (tabla 15).

2.4. Sueros control

Los sueros control tienen un patrón de inmunodetección conocido. La presencia de este patrón valida la eficacia del ensayo realizado en la jornada de trabajo.

- Control positivo alto (suero P5): suero reactivo a tres técnicas serológicas convencionales (tabla 8) y con antecedentes epidemiológicos.

Tabla 8.Características del suero control positivo P5

No. Unidad	
HAI (plasma)	1:256
IFI (plasma)	1:256
HAI (conversión a suero)	1:512
IFI (conversión a suero)	> 1:128
ELISA (conversión a suero)	1.325, 1.240
No. clave	05

- Control positivo Anti- *Trypanosoma cruzi* (ACCURUN® 190): control reactivo diseñado para ser utilizado con equipos y/ o técnicas *in vitro* con el propósito de vigilar su funcionamiento. Está fabricado a partir de suero o plasma humanos reactivos a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* y no reactivos para HBsAg, anti HIV-1/2, anti- HTLV y anti- HCV. Los controles ACCURUN no tienen valores asignados. Los niveles de reactividad de las pruebas variarán de acuerdo al fabricante del reactivo y a los distintos procedimientos, números de lote y laboratorios. Este control contiene estabilizadores (EDTA, agentes amortiguadores) y 0.1% de ProClin© (5-cloro- 2- metil- 4- isotiazolin- 3- ona y 2- metil- 4- isotiazolin- ona) como conservador.
- Control positivo débil: elaborado con suero obtenido por termocoagulación a partir de plasma humano reactivo a *Trypanosoma cruzi* y no reactivo a los marcadores serológicos de hepatitis y VIH. Tiene valores asignados de 2 a 2.5 veces la relación absorbancia/ valor de corte. Contiene Bronidox L5 como conservador (No. Cat. InDRE 300641001).
- Control negativo: suero de individuo confirmado como no reactivo a las técnicas serológicas convencionales.

Recomendaciones generales

1. En general, se recomienda hacer fracciones, de los controles, de 0.5 a 1 mL en crioviales de plástico con tapón de rosca y sello. Almacenar al menos a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La fracción de trabajo se almacena a $2-8^{\circ}\text{C}$ que no deben usarse después de la fecha de caducidad. Se recomienda cambiar la fracción de trabajo de forma periódica, por ej., de forma mensual.
2. Atemperar de 10- 15 minutos la fracción a utilizar. No se recomiendan ciclos múltiples de congelación- descongelación pues favorecen la desnaturalización de proteínas. Antes de utilizar, mezclar suavemente hasta alcanzar la homogeneidad, evitando la formación de burbujas. Tapar los controles inmediatamente después de su uso y regresarlos a la red fría.
3. Alteraciones en la apariencia física de los controles puede indicar inestabilidad o deterioro, si se observa descartar la fracción.
4. Los controles se deben procesar como las muestras a analizar.

2.5. Muestras de desafío de la IET

Grupo constituido por 115 muestras séricas de individuos mestizos mexicanos con resultados discrepantes entre resultado de origen (LESP) y algoritmo InDRE (referencia) entre 2011 y 2012.

2.6. Criterios de inclusión

- Cantidad suficiente, al menos 1 mL
- De calidad adecuada: sin hemólisis, lipemia y contaminación bacteriana
- De reactividad conocida
- Con respaldo documental.

2.7. Criterios de exclusión

- Cantidad insuficiente
- Con hemólisis, lipemia y/ o contaminación bacteriana
- Sin datos de reactividad conocida
- Sin respaldo documental.

2.8. Tratamiento de resultados

Los patrones de inmunodetección en las membranas de nitrocelulosa se digitalizaron en el programa Image J 1.34s, se cambió el formato a escala de grises, posteriormente se determinó el peso molecular (PM) de la banda de interés(en kDa) empleando el programa Sigma Gel para Windows y se creó una base de datos en Microsoft® Excel 97- 2003 con información relativa a cada panel y miembro: número de suero, clave, estatus, edad y género del paciente, procedencia de la muestra sérica y presencia o ausencia de la banda de interés (peso relativo 72 kDa).

El estudio de verificación se realizó en tres fases:

Fase 1: Estudio comparativo para verificar los parámetros operativos de la IET siguiendo el protocolo EP 12 A2 (CLSI, 2008).

Fase 2: Estudio de reactividad cruzada para determinar la especificidad diagnóstica con respecto a organismos cercanos filogenéticamente como *Leishmania sp.* y otras enfermedades de alta prevalencia (toxoplasmosis y tuberculosis pulmonar activa).

Fase 3: Estudio de imprecisión para determinar los parámetros de imprecisión intra serie y total, del marcador de peso relativo promedio 72 kDa siguiendo el protocolo EP 15 A2 (CLSI, 2005).

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

3.1. Obtención de extracto crudo (antígenos totales) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

La fuente de antígeno fue un extracto soluble rico en proteínas (1.540 mL) obtenido a partir de 0.1895 g de masa húmeda de cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa D); después de la extracción se cuantificó la concentración de proteínas por método de Lowry.

3.2. Cuantificación de proteínas por método de Lowry

La tabla 9 muestra los resultados de absorbancia a 500 nm para la construcción de la curva de calibrado de BSA (figura 14), incluye dilución 1/ 50 de la muestra analizada.

Tabla 9. Resultados de absorbancia curva de calibrado de BSA

Tubo	Albúmina sérica bovina en μg	Absorbancia
1	0	0
2	5	0.019
3	10	0.034
4	20	0.060
5	40	0.097
6	80	0.187
7	100	0.236
8	200	0.397
10	Dilución 1/ 50	0.237

Lectura a 500 nm.

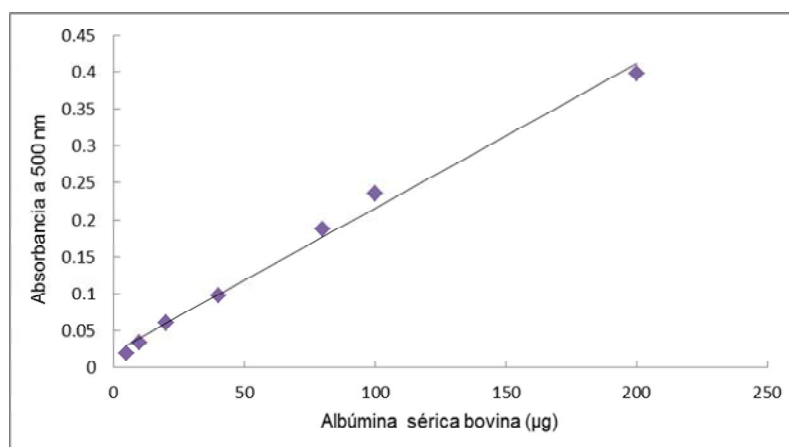


Figura 14. Curva de calibrado de BSA para cuantificación de proteínas por método de Lowry.

Para conocer la concentración de proteínas se aplicó el modelo de regresión lineal:

Regresión lineal: $y = mx + b$
 $y =$ absorbancia a 500 nm
 $x =$ albúmina sérica bovina en μg
 $m = 1.98 \times 10^{-3}$ (0.00198).
 $b = 0.01569$
 $r = 0.99539$

Al interpolar el resultado de absorbancia de la dilución 1/50 se obtuvo 114.6799 μg de proteína. Este valor corresponde a la concentración de proteínas de la muestra a la dilución ensayada, este valor tiene que ser multiplicado por el factor de dilución para conocer la concentración de la muestra sin diluir.

Multiplicando por factor dilución (1/ 50 FD: 50):

$$114.6799 \mu\text{g} (50) = 5733.995 / 1000 \mu\text{g} = \mathbf{5.7339 \text{ mg/ mL de extracto crudo.}}$$

El extracto obtenido fue empleado para realizar la IET obteniéndose los siguientes resultados.

3.3. Perfiles de inmunodetección y resultados nominales

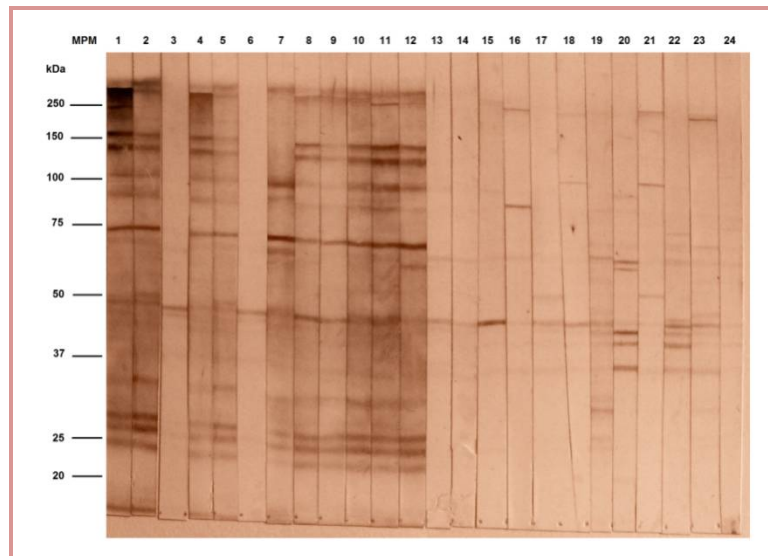


FIGURA15. Perfil de inmunodetección.Tira de nitrocelulosa **1 y 4:** control positivo alto P5, **2 y 5:** control positivo débil, **3 y 6:** control negativo 054, **7 a 12:** sueros del panel PA-08, reactivos al marcador de 72 kDa (sueros001, 002, 004, 006, 010, 011), **13 a 24:** sueros del panel PA- 10, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros021, 046, 054, 063, 072, 079, 083, 084, 085, 086, 087, 088).

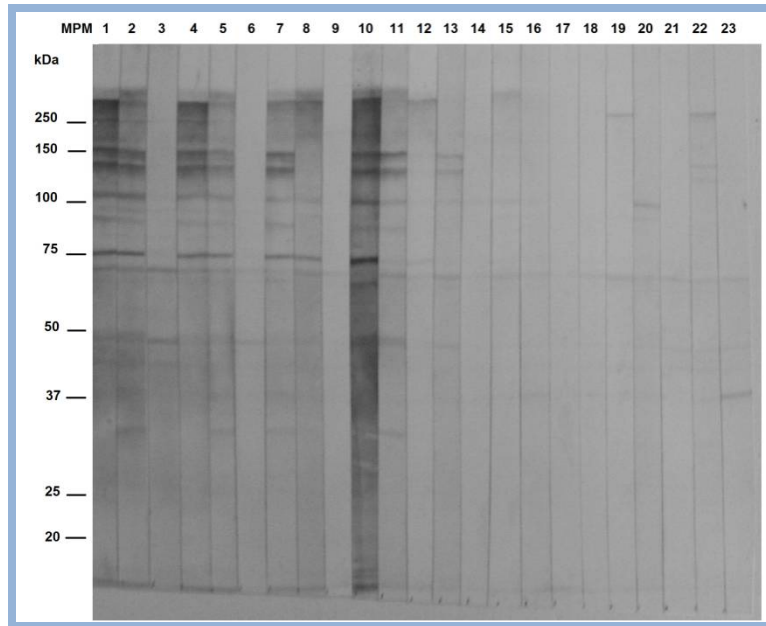


FIGURA 16. Perfil de inmunodetección.Tira de nitrocelulosa **1 y 4**: control positivo alto P5, **2 y 5**: control positivo débil, **3 y 6**: control negativo 054, **7, 8, 10, 11 y 12**: sueros del panel PA- 08, reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 013, 014, 019, 023, 024), **9**: suero del panel PA- 08, no reactivo a marcador de 72 kDa (suero 016), **13 a 23**: sueros del panel PA- 10, no reactivos a marcador de 72 kDa (sueros 149, 162, 198, 232, 233, 234, 243, 271, 272, 273, 310).

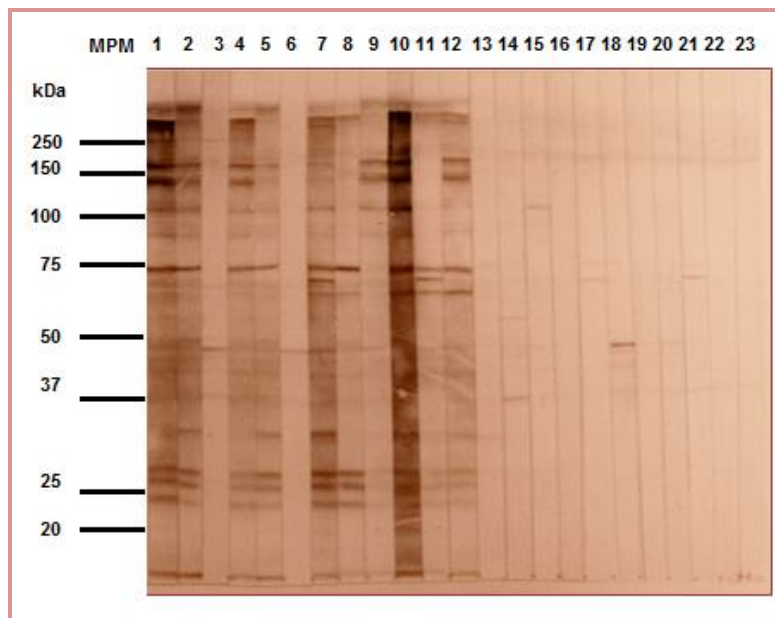


FIGURA 17. Perfil de inmunodetección.Tira de nitrocelulosa **1 y 4**:control positivo alto P5, **2 y 5**: control positivo débil, **3 y 6**: control negativo 054, **7 a 12**: sueros del panel PA- 08, reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 029, 030, 033, 035, 036, 040), **13 a 23**: sueros del panel PA- 10, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 403, 416, 418, 430, 431, 448, 449, 452, 454, 460, 465).

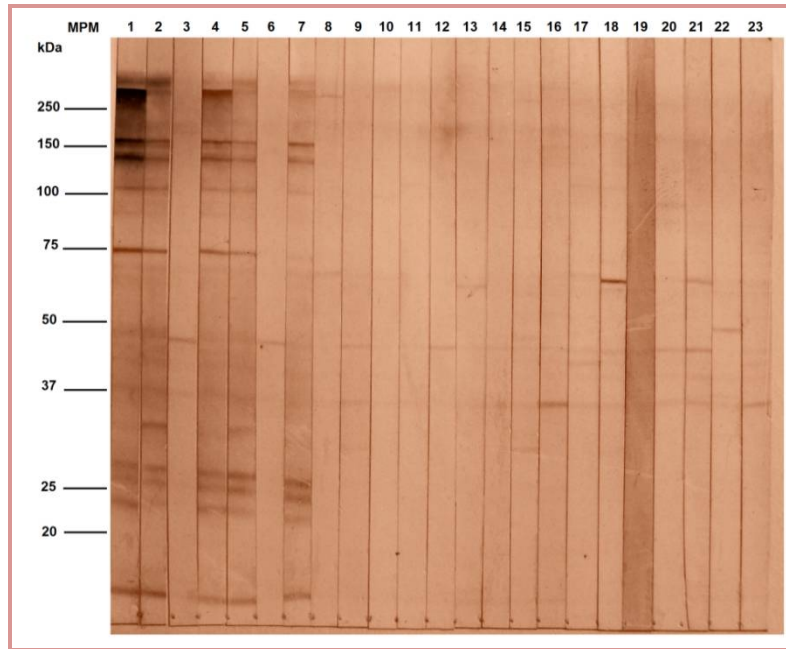


FIGURA 18. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1 y 4:** control positivo alto P5, **2 y 5:** control positivo débil, **3 y 6:** control negativo 054, **7:** suero del panel PA- 08, reactivo al marcador de 72 kDa (suero 046), **8 a 13:** sueros del panel de PA- 08, no reactivos al marcador de 72 kDa(sueros049, 050, 052, 053, 054, 055),**14 a 23:** sueros del panel PA- 10, no reactivos a marcador de 72 kDa(sueros 476, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 498, 499, 500).

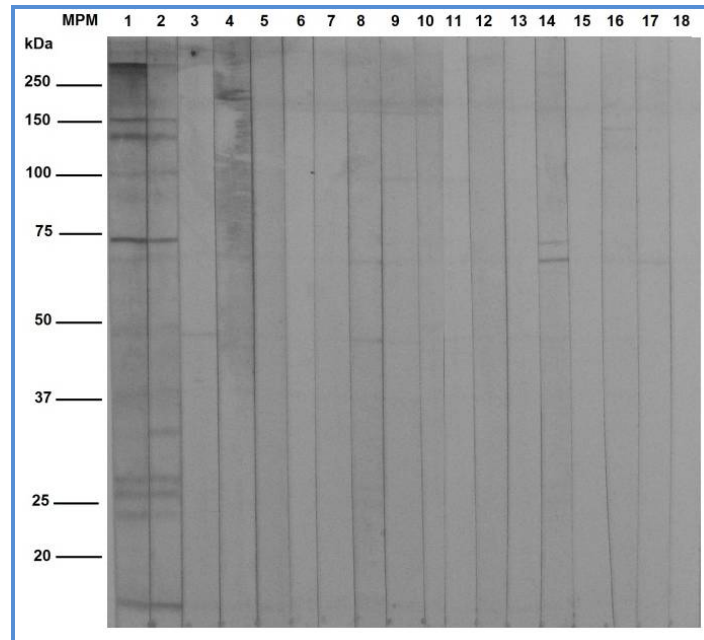


FIGURA 19. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1:** control positivo alto P5, **2:** control positivo débil, **3:** control negativo 054,**4 a 18:** sueros del panel PA- 10, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 089, 090, 096, 111, 112, 114, 123, 311, 329, 331, 351, 363, 375, 391, 392).

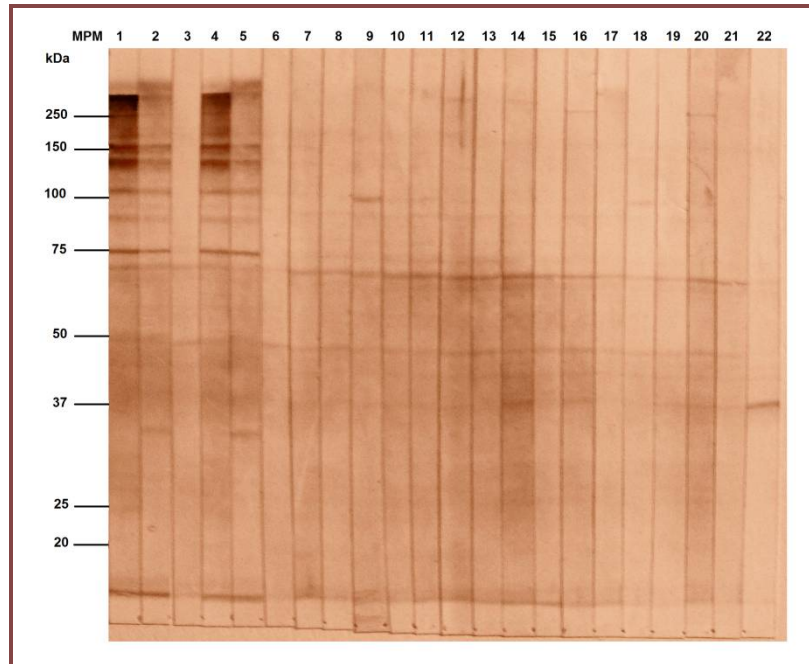


FIGURA 20. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1 y 4**: control positivo alto P5, **2 y 5**: control positivo débil, **3 y 6**: control negativo 054, **7 a 21**: sueros del panel TB, no reactivos a marcador de 72 kDa, **22**: suero del panel TOXO, no reactivo a marcador de 72 kDa (suero 30).

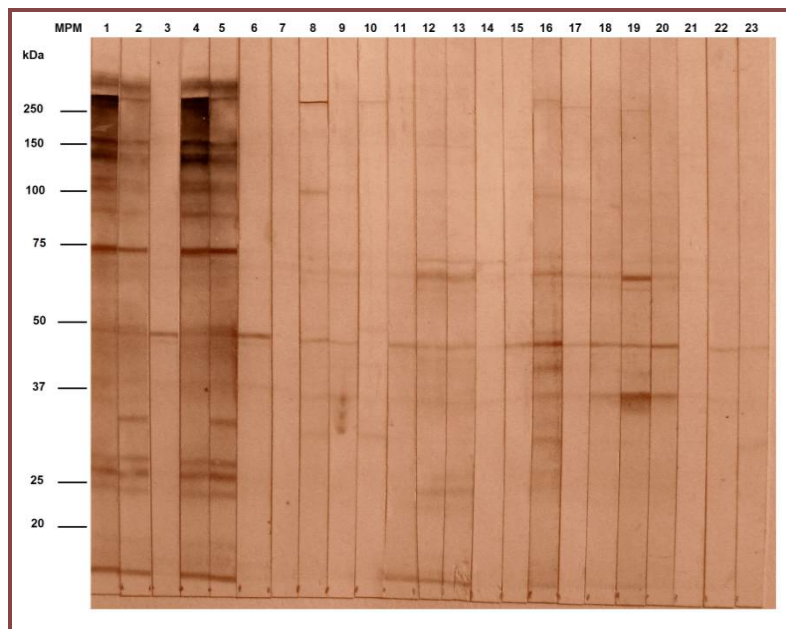


FIGURA 21. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1 y 4**: control positivo alto P5, **2 y 5**: control positivo débil, **3 y 6**: control negativo 054, **7 a 21**: sueros del panel LEISH, no reactivos al marcador de 72 kDa, **22 y 23**: sueros del panel TOXO, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 44 y 45).

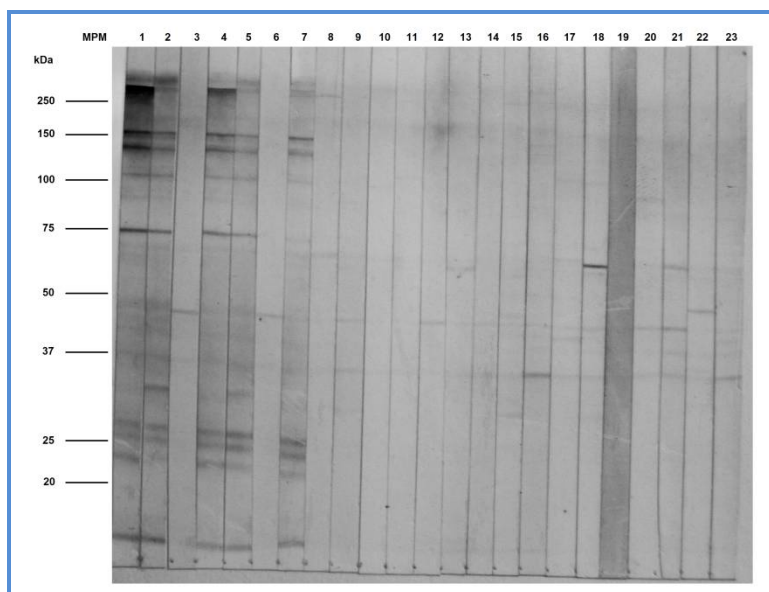


FIGURA 22. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1 y 4:** control positivo alto P5, **2 y 5:** control positivo débil, **3 y 6:** control negativo 054, **7 a 23:** sueros del panel PA- 10, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 046, 049, 050, 052, 053, 054, 055, 476, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 498, 499, 500).

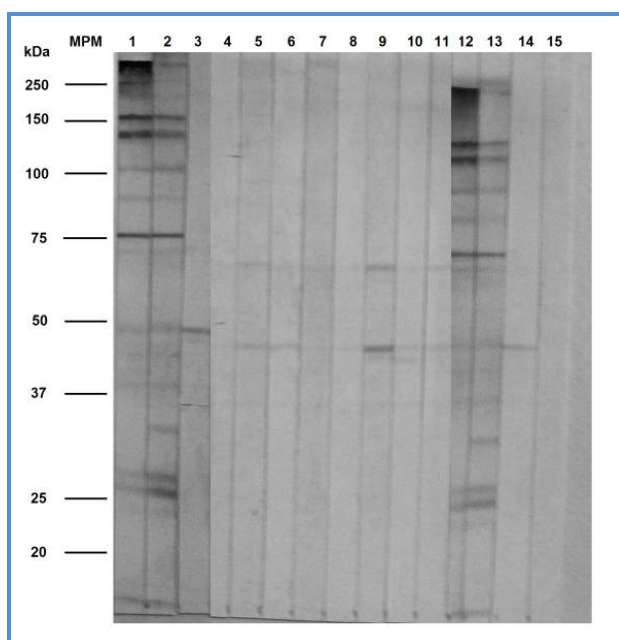


FIGURA 23. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1 y 12:** control positivo alto P5, **2 y 13:** control positivo débil, **3 y 14:** control negativo 054, **5 a 11:** sueros del panel PA- 10, no reactivos al marcador de 72 kDa (sueros 466, 467, 469, 470, 472, 473, 474, 475), **15:** suero del panel TOXO, no reactivo a marcador de 72 kDa (suero 2).

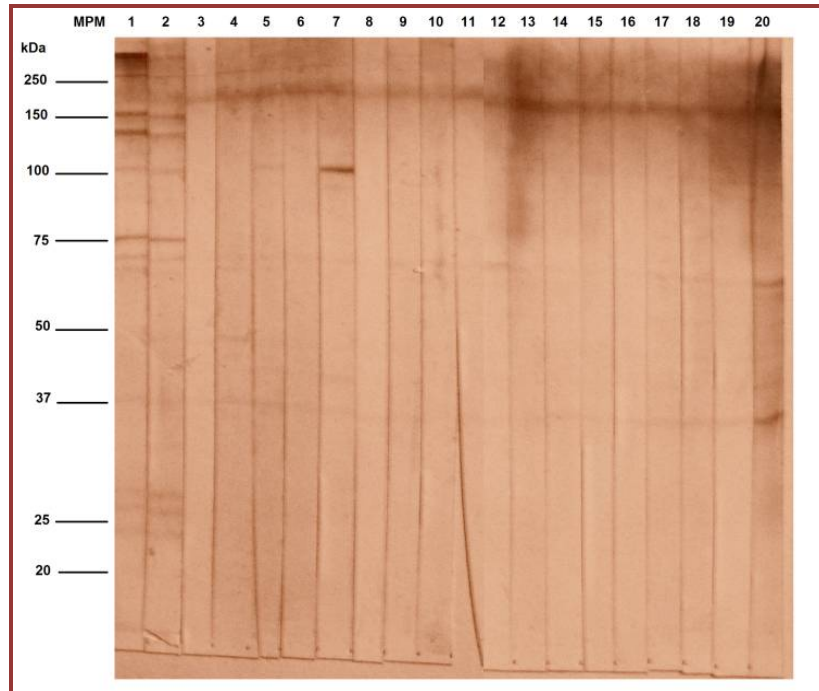


FIGURA 24. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1**: control positivo alto P5, **2**: control positivo débil, **3**: control negativo 054, **4 a 11**: sueros del panel PA- 10, no reactivos a marcador de 72 kDa (sueros 501, 569, 577, 587, 588, 631, 632, 633), **12 a 20**: sueros del panel TOXO, no reactivos a marcador de 72 kDa (sueros 7, 8, 12, 14, 16, 21, 23, 27, 28).

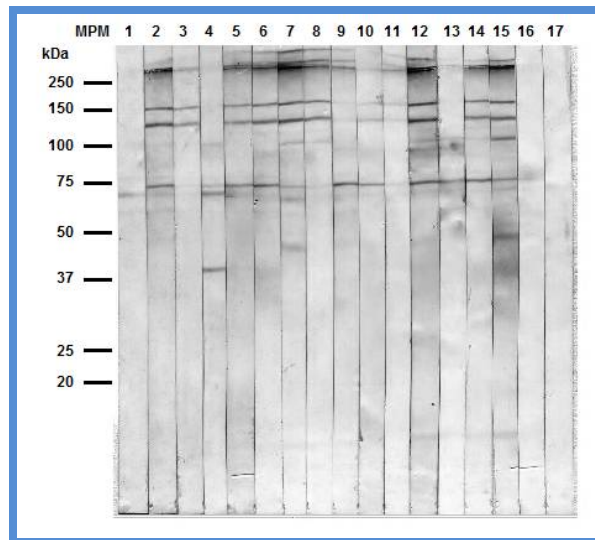


FIGURA 25. Perfil de inmunodetección. Tira de nitrocelulosa **1**: control negativo 054, **2**: control positivo alto P5, **3**: control positivo débil Accurun 190, **4 a 16**: plasmas del panel PMT203, reactivos al marcador de 72 kDa, **17**: plasma del panel PMT203, no reactivo al marcador de 72 kDa.

Tabla 10. Resultados nominales de la IET (*Western blot*) del panel PA- 08.

SUERO	CLAVE	CARACTERIZACIÓN	MARCADOR 72 kDa
1	PA001-08	REAC	PRESENCIA
2	PA002-08	REAC	PRESENCIA
3	PA004-08	REAC	PRESENCIA
4	PA006-08	REAC	PRESENCIA
5	PA010-08	REAC	PRESENCIA
6	PA011-08	REAC	PRESENCIA
7	PA013-08	REAC	PRESENCIA
8	PA014-08	REAC	PRESENCIA
9	PA016-08	NREA	AUSENCIA
10	PA019-08	REAC	PRESENCIA
11	PA023-08	REAC	PRESENCIA
12	PA024-08	REAC	PRESENCIA
13	PA029-08	REAC	PRESENCIA
14	PA030-08	REAC	PRESENCIA
15	PA033-08	REAC	PRESENCIA
16	PA035-08	REAC	PRESENCIA
17	PA036-08	REAC	PRESENCIA
18	PA040-08	REAC	PRESENCIA
19	PA046-08	REAC	PRESENCIA
20	PA049-08	NREA	AUSENCIA
21	PA050-08	NREA	AUSENCIA
22	PA052-08	NREA	AUSENCIA
23	PA053-08	NREA	AUSENCIA
24	PA054-08	NREA	AUSENCIA
25	PA055-08	NREA	AUSENCIA

REAC Suero Reactivo a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*, NREA Suero No Reactivo a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*, en base a resultados de caracterización de panel (anexo IX). Los resultados de ELISA- T, están expresados como la razón S/ Co, que indican reactividad a antígenos totales de *T. cruzi*.

Tabla 11. Resultados nominales de la IET (*Western blot*) del panel PMT 203.

SUERO	CLAVE	CARACTERIZACIÓN	PROCEDENCIA	MARCADOR 72 kDa
1	PMT203-01	REAC	México	PRESENCIA
2	PMT203-02	REAC	Estados Unidos	PRESENCIA
3	PMT203-04	REAC	México	PRESENCIA
4	PMT203-05	REAC	Guatemala	PRESENCIA
5	PMT203-06	REAC	Nicaragua	PRESENCIA
6	PMT203-07	REAC	Nicaragua	PRESENCIA
7	PMT203-08	REAC	Honduras	PRESENCIA
8	PMT203-09	REAC	Salvador	PRESENCIA
9	PMT203-10	REAC	Argentina	PRESENCIA
10	PMT203-11	REAC	Honduras	PRESENCIA
11	PMT203-12	REAC	Venezuela	PRESENCIA
12	PMT203-13	REAC	Bolivia	PRESENCIA
13	PMT203-14	REAC	Argentina	PRESENCIA
14	PMT203-15	NREA	Honduras	AUSENCIA

REAC Suero Reactivo a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*, NREA Suero No Reactivo a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*, en base a resultados de caracterización de panel (anexo X).

Tabla 12. Resultados nominales de la IET (*Western blot*) del panel LEISH.

SUERO	CLAVE	PROCEDENCIA	GÉNERO	EDAD	IFI- LEIS	MARCADOR 72 kDa
1	LEISH267	Chiapas	M	29	1:32	AUSENCIA
2	LEISH269	Campeche	M	10	1:64	AUSENCIA
3	LEISH278	Campeche	M	14	1:16	AUSENCIA
4	LEISH273	Chiapas	M	85	1:16	AUSENCIA
5	LEISH314	Campeche	M	38	1:16	AUSENCIA
6	LEISH340	Campeche	M	4	1:32	AUSENCIA
7	LEISH341	Campeche	F	1	1:32	AUSENCIA
8	LEISH342	Campeche	M	21	1:64	AUSENCIA
9	LEISH343	Campeche	M	60	1:16	AUSENCIA
10	LEISH348	Campeche	M	60	1:16	AUSENCIA
11	LEISH360	Chiapas	M	28	1:64	AUSENCIA
12	LEISH361	Chiapas	M	29	1:32	AUSENCIA
13	LEISH363	Chiapas	F	39	1:16	AUSENCIA
14	LEISH364	Chiapas	F	6	1:64	AUSENCIA
15	LEISH369	Campeche	M	50	1:64	AUSENCIA

Las abreviaturas y connotaciones utilizadas son las mismas que en la tabla 6. Sueros NREA confirmados por serología. Los resultados IFI- LEIS, son títulos que indican reactividad positiva a *Leishmania sp.*

Tabla 13. Resultados nominales de la IET (*Western blot*) del panel TOXO.

SUERO	CLAVE	PROCEDENCIA	GÉNERO	EDAD	IFI- TOXO	MARCADOR 72 kDa
1	TOXO002	México	F	21	1.64	AUSENCIA
2	TOXO007	Oaxaca	F	NR	1:32	AUSENCIA
3	TOXO008	Oaxaca	F	24	1:128	AUSENCIA
4	TOXO012	Oaxaca	F	15	1:32	AUSENCIA
5	TOXO014	Oaxaca	F	28	1:64	AUSENCIA
6	TOXO016	Oaxaca	F	32	1:1024	AUSENCIA
7	TOXO021	Oaxaca	M	46	1:512	AUSENCIA
8	TOXO023	Oaxaca	F	37	1:2048	AUSENCIA
9	TOXO027	Veracruz	F	26	1:256	AUSENCIA
10	TOXO028	Veracruz	M	42	1:256	AUSENCIA
11	TOXO030	Chiapas	F	27	1:1024	AUSENCIA
12	TOXO031	Colima	M	99	1:16	AUSENCIA
13	TOXO036	Chiapas	M	20	1:16	AUSENCIA
14	TOXO044	Veracruz	F	32	1:128	AUSENCIA
15	TOXO045	Veracruz	M	1	1:2048	AUSENCIA

Las abreviaturas utilizadas son las mismas que en la tabla 6. Sueros NREA confirmados por serología. Los resultados IFI- TOXO, son títulos que indican reactividad positiva a *Toxoplasma gondii*.

Tabla 14. Resultados nominales de la IET (*Western blot*) del panel TB.

SUERO	CLAVE	PROCEDENCIA	GÉNERO	EDAD	ELISA- TB	MARCADOR 72 kDa
1	TB233	México, D.F	F	58	5.06	AUSENCIA
2	TB237	México, D.F	F	59	2.16	AUSENCIA
3	TB241	México, D.F	M	53	2.91	AUSENCIA
4	TB243	México, D.F	M	51	2.36	AUSENCIA
5	TB246	México, D.F	M	99	1.90	AUSENCIA
6	TB257	México, D.F	F	34	2.97	AUSENCIA
7	TB261	México, D.F	F	41	4.40	AUSENCIA
8	TB263	México, D.F	M	19	4.73	AUSENCIA
9	TB267	México, D.F	M	15	2.78	AUSENCIA
10	TB272	México, D.F	M	24	1.90	AUSENCIA
11	TB280	México, D.F	M	51	4.80	AUSENCIA
12	TB284	México, D.F	M	44	3.57	AUSENCIA
13	TB286	México, D.F	M	30	4.19	AUSENCIA
14	TB290	México, D.F	M	24	2.24	AUSENCIA
15	TB293	México, D.F	M	69	3.46	AUSENCIA

Las abreviaturas y connotaciones utilizadas son las mismas que en la tabla 6. Los resultados ELISA- TB, están expresados como la razón S/ Co, que indican reactividad a *Mycobacterium tuberculosis*, todos confirmados por cultivo en Löwenstein- Jensen.

Tabla 15. Concentrado de resultados.

PANEL	REACTIVO	NO REACTIVO	FEMENINO	MASCULINO	EDAD	TOTAL
PA- 08	18	7	4 (16 %)	19 (76%)	NR	25
PA- 10	0	75	42 (56 %)	33 (44 %)	1-82	75
PMT 203	13	1	NR	NR	NR	14
LEISH	0	15	3 (20 %)	12 (80 %)	1-85	15
TOXO	0	15	10 (66.66 %)	5 (33.33 %)	1-46	15
TB	0	15	4 (26.66 %)	11 (73.33 %)	15-69	15
TOTAL	31	128				159

REACTIVO: Presencia del marcador de 72 kDa. NO REACTIVO: Ausencia del marcador de 72 kDa. El 8% (2) de los componentes del panel PA- 08 no indicó género. * Valor reportado como rango. NR Información no reportada.

La tabla 16 muestra los resultados obtenidos para el suero control alto reactivo en un diseño de prueba de 5 días con 3 réplicas.

Tabla 16. Resultados del estudio de imprecisión, suero control alto reactivo (P5).

ENSAYO SUERO P5					
FECHA	13/05/10	19/05/10	20/05/10	21/05/10	26/05/10
RÉPLICA	1	2	3	4	5
1	74.91	74.23	75.97	73.04	72.79
2	76.95	73.61	72.79	76.12	75.08
3	72.91	75.08	73.09	74.24	76.12
MEDIA	74.92	74.31	73.95	74.47	74.66
DS	2.02	0.74	1.76	1.55	1.70
CV	2.70%	0.99%	2.37%	2.08%	2.28%

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos para el suero control bajo reactivo en el diseño de prueba de 5 días con 3 réplicas.

Tabla 17. Resultados de estudio de imprecisión, suero control bajo reactivo.

ENSAYO SUERO BAJO REACTIVO					
FECHA	13/05/10	19/05/10	20/05/10	21/05/10	26/05/10
RÉPLICA	1	2	3	4	5
1	74.10	75.06	76.84	73.04	72.79
2	75.76	74.76	73.67	76.12	75.08
3	72.58	74.25	74.10	73.35	75.08
MEDIA	74.15	74.69	74.87	74.17	74.32
DS	1.59	0.41	1.72	1.70	1.32
CV	2.15%	0.55%	2.30%	2.29%	1.78%

CAPÍTULO 4
ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Determinación de estimadores de desempeño

El estudio de verificación de la eficacia del marcador de 72 kDa en la detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi* en fase crónica asintomática tiene tres componentes:

1. Estudio comparativo.
2. Estudio de reactividad cruzada.
3. Estudio de precisión.

4.1.1. Estudio comparativo

Los resultados del estudio comparativo se concentran en la tabla 18.

Tabla 18. Tabla de contingencia del estudio comparativo.

REFERENCIA			
RESULTADO DE LA IET	REACTIVO	NO REACTIVO	TOTAL
PRESENCIA MARCADOR	31	0	31
AUSENCIA MARCADOR	0	83	83
TOTAL	31	83	114

Los estimadores de desempeño de la IET se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Estimadores de desempeño IET (anexo VIII).

ESTIMADORES	
SENSIBILIDAD	100 %
ESPECIFICIDAD	100 %
FALSOS POSITIVOS	0 %
FALSOS NEGATIVOS	0 %
PREVALENCIA	27.19 % (19.28 a 36.33 %)
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	100 % (88.78 a 100%)
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	100% (95.65 a 100 %)

Se muestran los resultados para cada estimador de desempeño de la IET, así como la prevalencia condicionada a la población de estudio.

4.1.2. Estudio de reactividad cruzada

Los resultados del estudio de reactividad cruzada se concentran en la tabla 20, se observa que de los 45 sueros analizados ninguno mostró reactividad al marcador de 74 kDa, lo que corresponde al 0% de reactividad cruzada.

Tabla 20. Tabla de contingencia del estudio de reactividad cruzada.

RESULTADO DE LA IET			
PANEL	REACTIVO	NO REACTIVO	TOTAL
LEISH	0	15	15
TOXO	0	15	15
TB	0	15	15

Los sueros de individuos no chagásicos, reactivos a antígenos totales se confirmaron utilizando antígenos recombinantes y en todos los casos no se confirmó la reactividad (tabla 21).

Tabla 21. Resultados de los paneles LEISH, TOXO y TB con las pruebas ELISA- T y ELISA- R.

SUERO	ELISA-T	SUERO	ELISA-T	SUERO	ELISA-T
LEISH267	0.2	TOXO002	0.2	TB233	0.4
LEISH269	0.7	TOXO007	0.3	TB237	0.3
LEISH273	0.3	TOXO008	0.2	TB241	0.9
LEISH278	0.2	TOXO012	0.3	TB243	0.3
LEISH314	0.4	TOXO014	0.3	TB246	0.7
LEISH340	1.0	TOXO016	0.3	TB257	0.5
LEISH341	0.8	TOXO021	0.6	TB261	0.5
LEISH342	0.2	TOXO023	0.3	TB263	0.5
LEISH343	0.2	TOXO027	0.2	TB267	0.3
LEISH348	0.8	TOXO028	0.3	TB272	0.6
LEISH360	0.5	TOXO030	0.2	TB280	0.4
LEISH361	0.3	TOXO031	0.1	TB284	1.0
LEISH363	0.8	TOXO036	0.2	TB286	0.3
LEISH364	0.3	TOXO044	0.1	TB290	0.8
LEISH369	0.4	TOXO045	0.2	TB293	0.2

ELISA- T: de antígenos totales, valor de corte 0.314; ELISA- R, antígenos recombinantes, valor de corte 0.147. Los resultados están expresados como la razón S/ Co. ELISA- R: LEISH340: 0.2, LEISH348: 0.2, TB241: 0.1, TB284: 0.3.

4.1.3. Estudio de imprecisión

Se determinó, en un suero alto y otro bajo reactivo, la repetibilidad (s_r) o imprecisión intra- serie y la precisión intra-laboratorio o imprecisión total (s_i) de la molécula de 72 kDa, utilizando la planilla en Excel diseñada por Douglas Chesher (www.aacb.asn.au).

Con los resultados del suero control alto reactivo (tabla 16), se requirió la planilla para cálculo de imprecisión que se muestra a continuación (figura 26).

Analito	CONTROL ALTO REACTIVO PRESENCIA/AUSENCIA			
Unidades	(kDa)			
Método	IET			
Serie	Fecha	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	13/05/2010	74.910	76.950	72.910
2	19/05/2010	74.230	73.610	75.080
3	20/05/2010	75.970	72.790	73.090
4	21/05/2010	73.040	76.120	74.240
5	26/05/2010	72.790	75.080	76.120
	Media	74.462	PRESENCIA/AUSENCIA	
	Número de días	5		
	Réplicas por día	3		
			CV	
	Imprecisión Intra-serie	1.614	2.2%	
	Imprecisión Total	1.368	1.8%	
	Imprecisión Intra- serie esperada	2.23386	5.00%	Límite de Verificación 3.0224909 Dentro de lo esperado
	Imprecisión Total esperada	2.23386	5.00%	2.8256351 Dentro de lo esperado
	Niveles	1		

FIGURA 26. Planilla: cálculos de precisión con el suero control alto reactivo P5. Herramienta diseñada por Douglas Chesher (Chesher, 2008, planilla disponible en www.aacb.asn.au).

La figura 27 muestra la planilla para cálculos de imprecisión para el suero control bajo reactivo empleando los datos de la tabla 17.

Analito		CONTROL BAJO REACTIVO PRESENCIA/AUSENCIA			
Unidades		(kDa)			
Método		IET			
Serie	Fecha	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
1	13/05/2010	74.100	75.760	72.580	
2	19/05/2010	75.060	74.760	74.250	
3	20/05/2010	76.840	73.670	74.100	
4	21/05/2010	73.040	76.120	73.350	
5	26/05/2010	72.790	75.080	75.080	
	Media	74.439			
	Número de días	kDa	PRESENCIA/AUSENCIA		
	Réplicas por día	5			
		3			
	Imprecisión Intra-serie		CV		
	Imprecisión Total	1.434	1.9%		
		1.215	1.6%		
	Imprecisión Intra-serie esperada	2.23316	5.00%	Límite de Verificación	Dentro de lo esperado
	Imprecisión Total esperada	2.23316	5.00%	3.0215437	Dentro de lo esperado
	Niveles	1		2.8264433	esperado

FIGURA 27. Planilla: cálculos de precisión con el suero control bajo reactivo. Herramienta diseñada por Douglas Chesher (Chesher, 2008, planilla disponible en www.aacb.asn.au).

4.2. Solución de discrepancias

Para evaluar la utilidad de la IET se realizó un análisis retrospectivo a partir de 4135 muestras séricas remitidas al LeCh para control de calidad (verificación de diagnóstico local) en el periodo 2011 y 2012, de estas, un grupo de 115 muestras (2.7%) mostraron resultados discrepantes entre resultado de origen (LESP) y algoritmo InDRE (referencia), la tabla 25 la eficiencia diagnóstica.

La tabla 22 muestra los datos obtenidos y la tabla 23 muestra el cálculo de estimadores de desempeño de la RNLSP.

Tabla 22. Tabla de contingencia para análisis de discrepancias.

ALGORITMO InDRE (REFERENCIA)			
DIAGNÓSTICO INICIAL	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2703	86	2789
Negativo	29	1317	1346
Total	2732	1403	4135

Los números en **negritas** comprende los resultados no concluyentes (115) con un equívoco del 2.7 % y una eficiencia diagnóstica de la RNLSP de 97.3 %.

Tabla 23. Estimadores de desempeño de la RNLSP.

ESTIMADORES		IC (95 %)
SENSIBILIDAD	98.94%	98.48- 99.29
ESPECIFICIDAD	93.87%	92.48- 95.07
VPP	96.92%	96.21- 97.53
VPN	97.85%	96.92- 98.55

TFP= 6.12 %, TFN= 1.06 %.

Del 2.7% de muestras con resultados equívocos tenemos que 60 (52.17%) muestras se resuelven con algoritmo InDRE, 6 (5.22%) se resuelven con IET (puesto que no pudieron concluirse con el algoritmo InDRE) y un grupo de 49 casos de los 115 estudiados (42.6%) procesados por algoritmo InDRE fueron comprobados (confirmados) por IET.

**CAPÍTULO 5
DISCUSIÓN**

Se han realizado estudios para evaluar las bondades de las pruebas disponibles de detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* observándose resultados variables; hasta el momento no se dispone de una técnica o material de referencia que aseguren su utilidad diagnóstica debido posiblemente a diferencias en la distribución geográfica de los genotipos de *T. cruzi*, variabilidad de la respuesta inmune del individuo infectado, principios de las metodologías empleadas y/o los antígenos que utilizan y heterogeneidad en los diseños de investigación, entre otros (Afonso y cols., 2012). Se sabe que pueden existir variaciones en el mosaico antigénico de superficie de *Trypanosoma cruzi* cuando los extractos se preparan por diferentes metodologías y que esta situación puede dar como resultado una respuesta distinta entre individuos de regiones geográficas diferentes (Robledo, 2010), sin embargo pese a este escenario, son recomendadas por la OMS dada su utilidad diagnóstica.

En este contexto, el Laboratorio de Chagas, InDRE desarrolló el método de Inmunoelectrotransferencia (IET), un método de análisis cualitativo, convencional, indirecto, cuya respuesta es la presencia o ausencia de determinado perfil electroforético; estudiado por años y con estudios previos se demostró su eficacia en la detección de anticuerpos contra antígenos específicos de *T. cruzi*.

En la literatura existen reportes sobre la detección de anticuerpos anti- GP72 independientemente de la fuente antigénica y origen geográfico de los mismos, en sueros de pacientes en fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas (Salazar y Marín, 2006) por lo que posiblemente se trate de una proteína conservada (Carmelo y cols., 2006), por su parte Nogueira y Schechter describieron otra glucoproteína de 75 kDa presente en el estadio que se desarrolla en el transmisor (Nogueira y cols., 1981).

Como parte del proceso de implementación de la IET en el diagnóstico de rutina, es requisito por normatividad llevar a cabo el estudio de validación y verificación, para ello planteamos una evaluación que nos permitió determinar y verificar los parámetros operativos de desempeño del marcador serológico de 72 kDa en detección de anticuerpos anti- *T. cruzi*.

El estudio de verificación se llevó a cabo en tres fases: un estudio comparativo, de reactividad cruzada y un estudio de imprecisión, mediante la aplicación combinada de dos protocolos emitidos por la CLSI, el EP 12 A2 y EP 15 A2.

El protocolo EP12 A2 provee lineamientos para la evaluación de características operativas de pruebas cualitativas y está orientado a auxiliar al usuario en la determinación del desempeño de esta en sus propias condiciones de trabajo (CLSI, 2008) mediante estudios comparativos con un criterio de verdad (*diagnostic accuracy criteria*) o *gold standard*. Debido a la complejidad de la interacción de *T. cruzi* con su hospedero y a que ningún antígeno recombinante por sí solo alcanza la eficiencia de los extractos totales en el inmunodiagnóstico (Flores y cols., 2009), nuestra referencia o *gold standard* fue un panel caracterizado con 16 pruebas de composición antigénica diferente y el panel SERACARE PMT (203) M2 caracterizado con siete pruebas de formato y composiciones antigénicas variables con la inclusión de IFI y RIPA como pruebas confirmatorias. Algunos investigadores en Brasil y Estados Unidos plantean la posibilidad de que los antígenos semi purificados TESA utilizados en la prueba TESA-*blot* y la RIPA pudieran considerarse como pruebas de referencia, ya en un estudio se encontró que TESA- *blot* mostró los mejores resultados para resolver resultados inconclusos de serología en infección chagásica (Modolo y cols., 2007).

Con los resultados obtenidos en la primera fase (estudio comparativo) se construyó una tabla de contingencia y considerando que partimos de una referencia cierta calculamos los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo condicionados a esta población de estudio. Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron del 100%. La sensibilidad nos indica la capacidad de la prueba para identificar a individuos con infección en fase indeterminada y la especificidad valora la utilidad de la prueba para identificar muestras no reactivas y por tanto, individuos sin infección chagásica en fase crónica asintomática.

Los valores predictivos mostraron un 100% para ambos parámetros: el valor predictivo positivo estima la probabilidad de que el individuo con resultado positivo o reactivo a la presencia de la molécula de 72 kDa tenga la infección, mientras que el valor predictivo negativo estima la probabilidad de que un individuo con resultado negativo o no reactivo a la presencia de la molécula de 72 kDa esté libre de infección.

En el estudio de las características o parámetros de desempeño, especialistas recomiendan la inclusión de muestras con evidencia serológica a otras enfermedades y puesto que uno de los principales problemas en los ensayos convencionales de detección de anticuerpos anti- *T. cruzi*, es el fenómeno de reactividad cruzada que suele existir con sueros de pacientes con leishmaniosis, fue importante valorar la reactividad cruzada del marcador serológico de 72 kDa en esta enfermedad y otras de alta prevalencia como toxoplasmosis y tuberculosis. Se cita en la literatura que *Trypanosoma cruzi* comparte 30% de sus antígenos solubles con *Leishmania donovani* y *Leishmania mexicana*, algunos epítomos semejantes son moléculas de glicoproteínas con residuos de galactosa y proteínas del citoesqueleto como la tubulina (Palacios y cols., 2000); también se sabe que comparte algunos determinantes antigénicos con *Mycobacterium tuberculosis* (Robledo, 2010). La molécula de 72 kDa, posible glicoproteína de superficie, se ha encontrado sólo en las formas epimastigote y tripomastigote metacíclico (Nogueira y cols., 1982) y es posiblemente una proteína de choque térmico (HSP70) altamente inmunogénica (Cuervo y cols., 2004). En este estudio no se observó la banda de 72 kDa en los 3 grupos de sueros estudiados para demostrar reactividad cruzada. En el ensayo de ELISA con antígenos totales (*in house*) observamos que el 6.7% sueros de pacientes con leishmaniosis y tuberculosis mostraron una razón de Do/Co entre 0.9 y 1.1 que corresponde a la zona de incertidumbre. Al retar con antígenos recombinantes fueron clasificados como no reactivos a *Trypanosoma cruzi*, consistente con lo observado en IET, por lo tanto los estimadores de reactividad cruzada fueron del 0%.

Como parte del estudio de verificación del método debemos confirmar la imprecisión, este término se refiere a la variación alrededor del valor del marcador de 73.70 kDa \approx 74 kDa (media obtenido), que debe tener un coeficiente de variación (CV) \leq 5% el cual fue establecido en la fase de estandarización. Para este fin nos apoyamos en el protocolo EP 15 A2 (CLSI, 2005) que permitió determinar, mediante un diseño de 5 días con 3 réplicas, la imprecisión intra- serie (repetibilidad) y la imprecisión total (precisión dentro del laboratorio) de la IET.

Con los resultados de las réplicas y utilizando la planilla de Douglas Chesher (Chesher, 2008) se obtuvo un valor de imprecisión intra- serie (repetibilidad) de 1.614 kDa (CV 2.2%) para el control alto reactivo y de 1.434 kDa (CV 1.9%) para el control bajo reactivo, estos

datos corresponden al grado de dispersión de los valores alrededor del valor central (marcador de 74 kDa) e indican la precisión o grado de acuerdo entre resultados de mediciones sucesivas obtenidas bajo condiciones idénticas de medición (Chesher, 2008 y OGA, 2007), es decir durante una serie de trabajo, lo que significa que, si el peso molecular promedio de la banda de interés es de 74 kDa, esperamos que cuando realizamos un ensayo bajo las mismas condiciones de medición, la banda de interés se ubicará entre 72.5 y 75.5 kDa, con respecto a los marcadores de peso molecular, así mismo esta información nos indica el grado de precisión del proceso de electroforesis, y que por tanto el sistema es reproducible.

El valor de imprecisión total (precisión dentro del laboratorio) del control alto reactivo fue de 1.368 kDa (σ), CV 1.8% y de 1.215 kDa, CV 1.6% para el de baja reactividad, esto quiere decir que el marcador de interés estará ubicado entre 72.7 y 75.3 kDa. Este parámetro es la medida de la precisión de los resultados del método de ensayo en condiciones diferentes, sea diferente analista/ observador, diferentes días, o con diferentes equipos y lotes de reactivos, dentro del mismo laboratorio (OGA, 2007). Finalmente, la planilla para cálculos de imprecisión de Chesher nos sirvió para determinar la imprecisión intra- serie e imprecisión total esperada del método para el control reactivo alto y el control de baja reactividad con un error máximo permitido de 5%, siendo de 2.23386 kDa y 2.23316 kDa respectivamente, es decir que los niveles máximos permitidos de ubicación del marcador estará entre los 71.77 y 76.23 kDa y con estos resultados de imprecisión de la IET podemos asegurar su adecuada interpretación cualitativa.

La reproducibilidad no fue determinada ya que el procedimiento o técnica de IET sólo será utilizada en el InDRE como Laboratorio de Referencia.

Las pruebas empleadas en serología pueden llevar a resultados no concluyentes, discrepancias diagnósticas o con la referencia. En la práctica se ha observado que cuando el diagnóstico se basa en dos o más métodos serológicos, los resultados no concluyentes (o discrepancias diagnósticas) tienden a aumentar, con presencia de falsos positivos, falsos negativos y reactividad cruzada. Se sabe qué factores como la calidad de la muestra, heterogeneidad en características de desempeño de las pruebas empleadas, influenciada a su vez, por la naturaleza del antígeno ([URL http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/strain.html](http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/strain.html)), formato de las pruebas y aspectos

operativos como: facilidad de ejecución, posibilidad de automatización, reproducibilidad, costo, estabilidad de los reactivos, entre otros, influyen en la presencia de resultados discrepantes y no concluyentes.

Sin embargo, también es cierto que cuando se realizan dos pruebas simultáneamente (par serológico adecuadamente seleccionado) de acuerdo a recomendaciones de grupos de expertos de la OMS se proporciona una certeza diagnóstica del 98 al 99.5%.

Demostrada la reproducibilidad y confiabilidad de la IET, y conociendo que la asociación de ensayos tienden a proporcionar resultados discrepantes y además de difícil interpretación, fue necesario conocer la utilidad de la IET en la solución de discrepancias y resultados no concluyentes en el diagnóstico de pacientes crónico asintomáticos. En la literatura encontramos que existe una discrepancia cuando una muestra clínica presenta una conclusión diagnóstica diferente de la esperada; para Umezawa un diagnóstico es no concluyente cuando sólo una de tres pruebas serológicas utilizadas es positiva (Modolo y cols., 2007).

En el LeCh, InDRE, el algoritmo de diagnóstico de Enfermedad de Chagas es un sistema conformado de ensayos inmunoenzimáticos en dos formatos diferentes e IFI; la bondad de este sistema radica en que al realizar dos ensayos inmunoenzimáticos de composición antigénica diferente se incrementa la sensibilidad y al estudiar las muestras con pruebas en serie (con la inclusión de IFI) se mejora la especificidad; encontrando especificidades superiores a 99.93% en pruebas en pares y de 100% si consideramos ELISA, IFI y HAI juntos (de Araujo y cols., 2012).

Sabemos que las pruebas que emplean antígenos crudos o extractos totales de *T. cruzi* al ser más sensibles pueden llevar con mayor frecuencia a resultados falsos positivos. La Inmunofluorescencia indirecta detecta anticuerpos específicos que reaccionan con el antígeno de membrana del parásito y la hemaglutinación indirecta detecta anticuerpos que reaccionan con antígenos sub celulares o citoplasmáticos; mientras que los ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA) recombinantes, utilizan por ejemplo antígenos pertenecientes a los estadios de tripomastigote y epimastigote sintetizados a partir de fragmentos conservados de diferentes cepas de *T. cruzi*, de ahí que cada una de estas pruebas opere en diferentes sistemas de especificidad (Souza, 2012).

Con el análisis retrospectivo del 2.7 % de discrepancias en LeCh entre 2011 y 2012 se comprobó que la IET presenta el mejor desempeño en la clasificación y resolución de casos discrepantes respecto del algoritmo InDRE y el empleado en la RNLSP, confirmándose también el 100% de las muestras que habían sido procesadas con el algoritmo convencional InDRE.

Estos resultados apuntan a proponer la IET como una prueba confirmatoria, importante propuesta sobre todo cuando se trata de avances en el estudio de una enfermedad cuyo impacto social y económico en el país es enorme, sabemos que es una zoonosis parasitaria que causa discapacidad; por tanto este avance para el diagnóstico confirmatorio implicaría un impacto vital en el ámbito individual y colectivo. Cuando se analizan los derechos y obligaciones que marcan las leyes, normativas y programas en vigor en materia de salud, así como las políticas de salud actuales en México se considera necesario un análisis y reconocimiento de la enfermedad de Chagas, como un problema de salud serio a mediano y largo plazo.

Enfrentarlo es ya un reto desde 1940, cuando fuera detectado por primera vez en México, y desde ese momento, el fin ha sido aminorar los daños presentes y futuros en la población, tener servicios de salud que respondan más organizadamente, incrementar la posibilidad de detección oportuna, tratamiento y seguimiento de los casos hasta su curación, tratamiento paliativo en los casos crónicos y acceso a los servicios de segundo y tercer nivel para su vigilancia y control, específicamente servicios de cardiología, gastroenterología y neurología, disminuir o evitar la continuidad de la infección con la reducción del número de casos falsos negativos, con la subsecuente reducción de costos, entre otras acciones.

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

La Inmunolectrotransferencia (IET) es una metodología con valores de imprecisión intra serie y total menores a 5%, por tanto es un sistema altamente reproducible y confiable en la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en individuos crónico asintomáticos.

Se verificó que el marcador de 74 kDa (72.58- 76.95 kDa) es altamente sensible y específico en la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en individuos crónico asintomáticos, por tanto es un marcador serológico válido para el uso previsto.

El marcador serológico de 74 kDa muestra una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del 100%.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el uso de la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET) mejora la capacidad diagnóstica del algoritmo InDRE, es de utilidad en la solución de discrepancias, los resultados muestran que el marcador serológico de 74 kDa es de utilidad en la confirmación de infección en individuos en fase crónica asintomática y que por tanto la IET puede ser propuesta como técnica confirmatoria.

Como producto se generó un inserto que describe el Procedimiento de Operación Estandarizado para su posible implementación en otros laboratorios.

PERSPECTIVAS

Demostrar la utilidad de la IET como prueba confirmatoria mediante un estudio clínico controlado.

Implementación de la Inmunoelectrotransferencia en otras instituciones del país, laboratorios de la RNLSP.

BIBLIOGRAFÍA

Afonso AM, Ebel MH, Tarleton RL. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis **6** (11): e1881. Doi:10.1371/journal.pntd.0001881.

Ancca J, Vega S, Pinto J y Náquira C (2009). Caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* aislados de triatominos de áreas endémicas a la enfermedad de Chagas en el Perú. Rev. Ibero- latinoam. Parasitol **1**: 8- 14.

Apt W, Heitmann I, Jercic MI, Jofré LM, Muñoz P, Noemí IH, San Martín AM, Sapunar J, Torres M y Zulantay I (2008). Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y la adolescencia. Rev Chil Infect **25** (3): 194-199.

Carabarán A, González MC, Rodríguez O, Baylón L, Rosales JL, Reyes PA, Arce M (2013). Chagas disease (American tripanosomiasis) in México: An update. Acta Tropica **127**: 126- 135.

Cárdenas ME, Torres D y Pardo MJ (2000). Macrófago y Oxido Nítrico en la Tripanosomiasis Americana. MEDUNAB **3** (7): 24- 30.

Carmelo E, Zurita AI, González AC, Martínez E y Valladares B (2006). Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune. Revista Ibérica de Parasitología **66** (1-4): 39- 46.

Carrada T (2004). *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clín **51** (4): 205- 219.

Centro Nacional de Metrología (CENAM), Entidad Mexicana de Acreditación (ema) (2008). Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, D. F. Pp. 7- 14.

Centro Nacional de Metrología (CENAM), Entidad Mexicana de Acreditación (ema) (2008). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean la técnica de gravimetría de masa. México, D. F. Pp. 21- 23 y 26- 38.

Chesher D (2008). Evaluating Assay Precision. Clin Biochem Rev **29** (Suppl i): S23- S26.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSi) (2005). Verificación del desempeño de la precisión y veracidad por el usuario; directriz aprobada. Segunda edición. Documento CLSi EP15-A2 **25** (17).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSi) (2008). User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved guideline. Second edition. CLSi document EP12-A2 **28** (3).

Cuervo C, Mayorga DC, Pavia P, López MC, Puerta C (2004). Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. Asociación Colombiana de Infectología **8** (4): 268- 278.

De Araujo G, Louzada F, de Fátima V, Ferreira- Silva M, de Moraes- Souza H (2012). Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood Banks and prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables. Rev Bras Hematol Hemoter **34** (4): 292-7.

De la Fuente A, Rodríguez J, Fonseca E (2007). TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (*Western blot*). Piel **22** (5): 252- 8.

Díaz EM, González E y Medina JL (2000). Tratamiento quirúrgico del esófago chagásico: a propósito de un caso. Rev Med IMSS: **38** (5): 349- 354.

Escario JA y Gómez A (2012) Enfermedad de Chagas: El desenlace de un conflicto entre el Parásito y el Sistema Inmunitario. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **78** (3): 298- 322.

EURACHEM Working Group (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. United Kingdom.

Fernandes MC, Flannery AR, Andrews N y Mortara RA (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology* **15** (6): 977- 991.

Flores M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Garate T y Cañavate C (2009). Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clín*. Doi: 10.1016/ j.eimc.2009.07.005

García HM (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* **1** (2): 31- 41.

Grupo de Trabajo Científico/ OMS (2005). *Reporte sobre la Enfermedad de Chagas*. TDR/ GTC/ 09. Buenos Aires, Argentina.

Guzmán C (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Review TRENDS in Parasitology* **17** (8): 372- 376.

Guzmán ES, Zavala JE, Acosta KY y Rosado ME (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed* **10**: 177- 184.

Hardcastle WA y Ellison S (2002). Expression of Uncertainty in Qualitative Testing. Approaches to the Problem. En EURACHEM/ CITAC Conference Discussion Paper. *Measurement Uncertainty and Traceability Workshop*. United Kingdom. Pp. 2- 15.

lida K, Whitlow MB y Nussenzweig V (1989). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. J. Exp. Med. The Rockefeller University Press **169**: 881- 891.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press. **12** article e29.

Kabat EA y Mayer MM (1968). Inmunoquímica experimental. La Prensa Médica Mexicana, México, D. F. Pp. 420.

Ley V, Andrews N, Robbins ES y Nussenzweig V (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J. Exp. Med. The Rockefeller University Press **168**: 649- 659.

Manso MJ y Arruda R (2009). A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro **104** (Suppl. I): 76- 88.

Migliarino GA (2010). Verificación de Pruebas de Laboratorio para Virología. Infocon **28**: 14 y 15.

Ministerio de Salud. Viceministerio de Políticas Sectoriales. Dirección de Regulación. Viceministerio de Servicios de Salud (2011). “Norma Técnica para la Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas”. San Salvador, El Salvador.

Modolo MC, Alves D, Bautista de Carvalho T, Peresi E y Marcondes- Machado J (2007). Definition of a Diagnostic Routine in Individuals with Inconclusive Serology for Chagas Disease. The Brazilian Journal of Infectious Diseases **11** (2): 226- 233.

Montiel G y Díaz G (2002). Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Med. Hosp. Nac. Niños Dr. Carlos Saenz Herrera **37** (1/2): 57-63.

National Pathology Accreditation Advisory Council (NPAAC) (2003). REQUIREMENTS FOR THE VALIDATION OF IN- HOUSE *IN VITRO* DIAGNOSTIC DEVICES (IVDs). Australia.

NMX- EC- 15189- IMNC- 2008/ ISO 15189: 2007. Laboratorios clínicos- Requisitos particulares para la calidad y la competencia.

Norgueira N, Unkeless J y Cohn Z (1982). Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Immunology Proc. Natl Acad. Sci. USA **79**: 1259- 1263.

Oficina de Acreditación Guatemala, C. A. (OGA) (2007). Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo OGA- GEC- 016. Guatemala. Pp 1- 29.

OMS (2010). A 63/ 17 Enfermedad de Chagas: Control y eliminación. Informe de la Secretaría. 63^a Asamblea Mundial de la Salud.

OPS/OMS (2005). Documentos Técnicos. Políticas y Regulación. Curso de Gestión de Calidad para Laboratorios. THS/ EV- 2005/ 008. Washington D. C.

OPS/ OMS (2006). Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/ HDM/ CD/ 425- 06. Montevideo, Uruguay.

Pastén S (2003). Manual de Técnicas de Laboratorio. Laboratorio de Enfermedad de Chagas. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSa. México, D. F.

Palacios X, Belli A y Espino AM (2000). Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel filtro. Rev Panam Salud Pública/ Pan Am J Public Health **8**(6): 411- 417.

Pereira CA, Carrillo C, Miranda MR, Bouvier LA y Canepa GE (2008). *Trypanosoma cruzi*: transporte de metabolitos esenciales obtenidos del hospedador. Medicina (Buenos Aires) **68**: 398- 404.

Ramsey JM, Ordoñez R, Tello A, Pohls JL, Sanchez V, Peterson AT (2003). Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. Instituto Nacional de Salud Pública. Morelos, México.

Rassi AJ, Rassi A, Marín JA (2010). Chagas disease. Lancet **375**: 1388- 1402.

Robledo IA (2010). Importancia de la detección de la enfermedad de Chagas en donadores de sangre militares del Hospital Central Militar. Rev Sanid Milit Mex **64** (39): 116- 120.

Rodríguez H y Perotti C. (2011). Enfermedad de Chagas- situación actual en Latinoamérica. Tendencias en Medicina. Médicos Sin Fronteras

Rodríguez AJ (2005). Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Peru Med Exp Salud Pública **22** (2).

Salazar PM y Marín R.A (2006). Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. Pp. 9, 10, 18, 19, 22.

Salazar PM (2009). Iniciativa México. Memorias, Centenario del descubrimiento de la Enfermedad de Chagas. Facultad de Medicina, UNAM Ciudad Universitaria, México, D. F. Octubre 6- 9. 2009. Pp 36- 38.

Sathler R, Vitelli- Avelar DM, Teixeira- Carvalho A, Martins- Filho OA (2009). Innate immunity and regulatory T- cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro **104** (Suppl I): 246- 251.

Soberon G y Peláez D (1964). Capítulo VII. Hemoflagelados. El género *Trypanosoma* y las tripanosomiasis. En Nociones de Parasitología Médica y Patología Tropical. FMO Librería de Medicina. México, D. F. Pp. 83.

Sosa S (2009). Tratamiento de la infección con *Trypanosoma cruzi* en fase crónica (Enfermedad de Chagas). Memorias, Centenario del descubrimiento de la Enfermedad de Chagas. Facultad de Medicina, UNAM Ciudad Universitaria, México, D. F. Octubre 6- 9. 2009. Pg 119- 122.

Souza RM y Amato V (2012). Discrepancies and consequences of indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo **54** (3): 141- 3.

Stempin CC y Cerban FM (2007). Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. MEDICINA (Buenos Aires) **67**: 737-746.

Terrés AM (2006). Estimación de la incertidumbre y de la variabilidad total en el laboratorio clínico. Rev Mex Patol Clin **53** (4): 185- 196.

The TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel (2007). Evaluating Diagnostics. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. Nature Publishing Group Nature Reviews Microbiology. 517- 526.

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 USA **76** (9): 4350- 4354.

Trullols E (2006). Doctoral thesis. Validation of Qualitative Analytical Methods. Universitat Rovira i Virgili Tarragona, España.

Trullols E, Ruisánchez I, Aguilera E, Lucena R, Cardenas S, Varcárcel M (2006). Robustness in Qualitative Analysis: a Practical Approach. Trends in Anal Chem: 246- 268.

Vega S y Náquira C (2005). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Vera C, Letelier LM, Carvajal J (2005). Guía para el análisis crítico de estudios que evalúan exámenes diagnósticos. Rev Chil Obstet Ginecol **70** (3): 196- 202.

Villagrán ME y De Diego, J.A (2008). LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO, MÉXICO ASPECTOS SOCIOSANITARIOS. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. Pp. 11, 12- 17, 22.

Werner AB y Zulantay I (2011). Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev Med Chile **139**: 247- 257.

Westgard JO (2010). Prácticas Básicas de Control de Calidad. American Association for Clinical Chemistry Press. USA.

World Health Organization (2007). WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Test. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (2010). Anti- *Trypanosoma cruzi* ASSAYS: Operational Characteristics Report 1. Diagnostics and Laboratory Technology. Geneva, Switzerland.

Zamora J y Abaira V (2008). Revisión Metodológica. Análisis de la calidad de los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas. NEFROLOGÍA **28** (Supl 2): 42- 45.

URLs consultadas

CRUZ Alejandro y Pickering JM. *Chagmex* [base de datos en línea]. En Unidad de Informática para la Biodiversidad UNIBIO, Instituto de Biología, UNAM. 2005. [Consulta: 28 Octubre 2009] Disponible en: <http://www.unibio.unam.mx/chagmex>.

MENEZES Cristiane, Teixeira M y Dutra W. *Respuesta inmune en las formas cardíaca e indeterminada de la enfermedad de Chagas* [en línea]. FIOCRUZ Fundación Oswaldo Cruz. [Consulta: 20 Mayo 2013].

Disponible en: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=170.

MORALES DE LA CRUZ César. *Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas cubiertas* [en línea]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2004.

[Consulta: 7 Mayo 2010]. 2.5.2.3. Revalidación. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/morales_cc/morales_cc.pdf.

Trypanosoma cruzi strains and karyotypes. Strain classifications into T. cruzi I y T. cruzi II. Trypanosoma cruzi strain classification [en línea]. En Department of Biochemistry and Molecular Biology. Oswaldo Cruz Institute. [Consulta: 20 Mayo 2013]. Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/strain.html>.

Enfermedad de Chagas. Manejo de Tripanosomiasis Americana. En Boletín Epidemiológico. Sistema Único de Información, número 46, volumen 31, semana 46 del 9 al 15 de noviembre del 2014 [en línea]. Dirección General de Epidemiología. SINAVE/DGE/SALUD. [Consulta: 3 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>.

ANEXOS

I. Material, equipo, reactivos y biológicos

Material y equipo

1. CHAROLAS DE INCUBACIÓN ACCUTRACK.
2. GEL HOLDER CASSETTE. MINI TRANS- BLOT BIO- RAD. Catalog # 1703931. L1703931 Rev B.
3. UNIVERSAL FIT FILTER TIPS NATURAL: Corning Incorporated. 100- 1000 μ L. Rack Non- Pyrogenic, RNase/ DNase Free Autoclavable 100/ Rack, 10 racks/ Case Sterile.
4. AGITADOR ROTATORIO: New Brunswick Scientific Company. G- 2. Serie 96706.
5. BALANZA ANALÍTICA: DENVER Instrument Company. TR 203. Serie D0116204.
6. BALANZA ANALÍTICA: PRECISA. 180 A. Serie 11296.
7. BALANZA GRANATARIA DE DOS PLATILLOS: Cenco.
8. CENTRÍFUGA REFRIGERADA: JOUAN. CR 312. Serie 29407079
9. EQUIPO DE ELECTROTRANSFERENCIA: BIO- RAD. MINIPROTEAN II Cell. Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell. Serie 125BR 27520.
10. ESPECTROFOTÓMETRO: Milton Roy Spectronic 21D.
11. FUENTE DE PODER: BIO- RAD. 200/ 2.0. Serie 162BR15693.
12. MICROPIPETA: AUTOMÁTICA DE 8 CANALES DE 50- 1200 μ L. Eppendorf. Modelo Eppendorf Research pro. Serie 3792759.
13. MICROPIPETAS: UNICANAL, DE 200- 1000 μ L. Microlit, WCS-1000. Serie 99100871.
14. MICROPIPETA: UNICANAL, DE 20- 100 μ L. Gilson, PIPETMAN. Serie. 015907K.
15. MICROPIPETA: UNICANAL, DE 0.5- 10 μ L. Finnpiptette Thermo Electron Corporation. 4027. Serie T65225.
16. PAPEL WHATMAN (Chromatography paper) 1: Basis wieght 87/ gm², thickness 0.16 mm (grosor), medium flow rate.

17. POTENCIÓMETRO: Thermo ELECTRON Corporation. ORION 3 STAR. Serie B03864.
18. SISTEMA DE ELECTROFORESIS VERTICAL: Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES. Mini V-8.10. Serie 224939.
19. TERMOAGITADOR: Felisa. FE- 311. Serie. 9812103.

Reactivos

1. ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRA-ACÉTICO, SAL DISÓDICA DIHIDRATADA. M.W. 372.26. REACTIVO DE PUREZA ELECTROFORESIS. BIO- RAD. 100 g. CAS No. 6381- 92- 6. Cat. 161-0728. Control 210000996.
2. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO: Reactivo ACS $\geq 99\%$. $C_2HCl_3O_2$ MW. 163.39 Sigma- Aldrich. Catálogo T 6399 500 g. Lote 038K0741. CAS 76- 03- 9.
3. ALCOHOL METÁLICO: Reactivo Baker ACS. Ensayo 99.9 %. $CH_3 OH$ MW. 32.04. J. T. Baker. 1 L. Lote A19C70. CAS No. 67- 56- 1.
4. 3', 3'', 5', 5''- TETRABROMOFENOL- SULFONEFTALEÍNA (AZUL DE BROMOFENOL): Sal sódica. $C_{19} H_9 Br_4 O_5 S Na$ MW. 691.9 SIGMA. 25 g. B- 6131 Lote 34H35181. CAS 62625- 28- 9
5. 5- BROMO- 4- CLORO- 3- INDOLIL FOSFATO SAL p- TOLOIDINA: X- Phos- p- tol. PM 433.6. Research Organics Inc. 100 mg. Catalog # 1181B. Lote H12393. CAS 6578- 06- 9.
6. CARBONATO DE SODIO ANHIDRO: Para análisis. $Na_2 CO_3$. MW. 105.99. MERCK. 500 g. Art. 6392. Lote 407236 R.
7. CLORURO DE SODIO. Cristales (ACS) NaCl. MW. 58.44. Omnicem. 500 g. Lote 15304078.
8. CLORURO DE SODIO. Cristales para análisis. NaCl. PM. 58.44. MERCK. 1 Kg. Art. 21578. Lote 7008021578.
9. CLORURO DE MAGNESIO: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. PM 203.31. MERCK. 250 g. Art. 5833. Lote. 008369 R.
10. FENOL FOLIN & CIOCALTEU: 2.0 Normal. SIGMA. 100 mL. Lote 62H5034.

- 11.FLUORURO DE FENILMETILSULFONILO (PMSF): $C_7H_7O_2S$. MW. 174.19 SIGMA. 066K0720 EC 206- 350- 2. CAS 329- 98- 6.
- 12.FOSFATO DE SODIO DIBÁSICO, 7- HIDRATO: Cristal. Reactivo Baker ACS. $Na_2 HPO_4 \cdot 7 H_2O$. PM 268.07. J. T. Baker. 500 g. Lote X14C20. Fosfato de sodio CAS No. 7782- 85- 6.
- 13.FOSFATO DE SODIO DIBÁSICO, 12- HIDRATO: Reactivo Baker ACS. $Na_2 HPO_4 \cdot 12 H_2O$. PM 358.14. J. T. Baker. 500g. Lote Y04C01. Fosfato de sodio CAS No. 10039- 32- 4.
- 14.GLICEROL: Reactivo pureza biología molecular. 99%. MW. 92.09. SIGMA. 500 mL. 056K0079. CAS 56- 81- 5.
- 15.GLICINA: Reactivo pureza electroforesis. MW. 75.07. BIO- RAD. 1 Kg. Catalog # 161- 0718. Control 210003520. CASNr 56- 40- 6.
- 16.HIDRÓXIDO DE SODIO: En lentejas, bajo en carbonato. NaOH J. T. Baker Lote 40078.
- 17.IODOACETAMIDA: $C_2 H_4 INO$ MW. 185.0 SIGMA, I - 6125. Lote 75H5058. [144- 48- 9].
- 18.LAURIL SULFATO (DODECIL SULFATO DE SODIO): 95% $C_{12} H_{25} O_4 S Na$ MW. 288.4. SIGMA. 1 Kg. L-5750 Lot 14H0696.
- 19.NITROCELULOSA: Membrana de 0.2 μm . BIO- RAD Trans- Blot Transfer Medium. Catalog # 162- 0112. Lote 1620112 Rev G. Control 13627.
- 20.PRE- CUT NITROCELLULOSE MEMBRANES: Thermo SCIENTIFIC PIERCE Biotechnology, Inc. 0.2 MICRON, 8 X 12 cm. Prod # 77012. Lote KB 1178822.
- 21.ROJO DE PONCEAU S: Sigma. P- 3504 Lote 110H3737.
- 22.SODIO DIHIDRÓGENO FOSFATO MONOHIDRATO P. A: $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$. PM 137.99. MERCK. 500 g. Lote A957546 720.
- 23.TIOGLICOLATO DE SODIO: 95 %. MW. 82.02. BIOXON. 100 g. Lote L228490M. Cat. 164- 2.
- 24.TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO (TRIS- BASE): Cristales $\geq 99.9 \%$. $C_4 H_{11} NO_3$ MW. 121.1. Roche. 5 Kg. Lote 93401120. CAS # 77- 86- 1.
- 25.POLIOXIETILENO SORBITAN MONOLAURATO (TWEEN 20): BIO- RAD. 100 mL. Catalog # 170- 6531. Lote 210003162..

26. 1-STEP NBT/ BCIP: Thermo SCIENTIFIC PIERCE Biotechnology, Inc. 250 mL. Prod # 34042. Lote KL139382.
27. MINI- PROTEAN TGX: Long Shelf Life Precast Gels for Use with Tris/ Glycine Buffers 10%. Buffer contains 0.02 % NaN_3 IPG well comb; 7 cm IPG strip 10 precast gels. BIO- RAD. Catalog # 456- 1031. S60 10016957 Rev A. Control M082610C2.
28. LAEMMLI SAMPLE BUFFER: BIO- RAD 30 mL. Catalog # 161- 0737 L1610737 Rev D Composición: 62.5 Mm Tris- HCl, Ph 6.8/ 25 % glicerol/ 2 % SDS/ 0.01 % Azul de bromofenol.
29. 10X TRIS/ Glycine/ SDS BUFFER: For SDS- PAGE Applications. BIO- RAD. 5 L. Catalog # 161- 0772. Control 210006868.
30. PRECISION PLUS PROTEIN STANDARD PLUGS, UNSTAINED: BIO- RAD. 2 X 12 plugs, 1 application per plug. Catalog # 161- 0378. Control 310008582.

Biológicos

1. ALBÚMINA SÉRICA BOVINA: Fracción V (liofilizado) 50 g. Roche Diagnostics GmbH REF 10 735 078 001. Lote 70153825.
2. ANTI Ig G HUMANA CONJUGADA CON BIOTINA (H + L). ZyMax de ZYMED. 1 mg/ 1 mL. Lote 01062583.
3. APROTININA: De pulmón de bovino. Roche. 50 mg. REF. 10981532001. Lote 70144531.
4. FOSFATASA ALCALINA CONJUGADA CON ESTREPTAVIDINA: Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. 1.0 mg. Código 016- 050- 084. Lote 59994.

Fuente de antígeno

Como fuente de antígeno se empleó epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado CH30) obtenido a partir de *Triatoma dimidiata* en la localidad de La Laja, Veracruz, en el año 2000.

II. Preparación de reactivos y soluciones (Pastén, 2003)

1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO A PARTIR DE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

TBS, TRIS BASE SALINO 100 mM, NaCl 0.15 M 50 mL.

0.6055 g de Tris base, más 30 mL de agua bidestilada (grado milli Q), ajustar pH a 7.5 con HCl fumante 37% y agregar 0.44 g NaCl, aforar a 50 mL.

TIOGLICOLATO DE SODIO 1: 20, 000.

10 mg de tioglicolato de sodio se agregan 10 mL de TBS (concentración final 1: 1000), de esta solución tomar 1 mL y agregar 19 mL de TBS (concentración final 1: 20,000).

SOLUCIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.

EDTA 1 M pH 8. A 10 mL de agua bidestilada se adiciona 3.72 g de EDTA; almacenar a -20° C en fracciones de 1 mL.

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.333 M. A 10 mL de etanol grado reactivo se adiciona 581 mg de PMSF; almacenar a -20° C en fracciones de 1 mL.

APROTININA 1 mM. A 10 mL de agua bidestilada se adiciona 6.5 mg de aprotinina.

SOLUCIÓN DE TRABAJO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.

PI- A 200 X. 1 mL de EDTA 1 M pH 8.0 y se lleva a volumen final de 5 mL con agua bidestilada y almacenar al menos a -20° C en fracciones de 1 mL.

PI- B 200 X. A 2 mL de etanol grado reactivo se agrega 3 mL de PMSF 0.333 M (si es necesario calentar en baño de agua a 65° C para disolución), fraccionar y almacenar al menos a -20° C.

APROTININA: A 3 mL de aprotinina 1 mM se adiciona 2 mL de agua bidestilada, fraccionar y almacenar al menos a -20° C.

2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY

SOLUCIÓN A (Mezcla de A1, A2 y A3).

A1: Tartrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2 g, aforar a 100 mL.

A2: Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1 g, aforar a 100 mL con H_2O bidestilada.

A3: Carbonato de sodio (NaCO_3) 20 g, aforar a 1000 mL con NaOH 0.1N.

MEZCLA DE TRABAJO: 0.5 mL de A1, 0.5 mL de A2 y 50 mL de A3.

SOLUCIÓN B: Reactivo de Folin (Fenol-Ciocalteu) 1N. La mezcla de trabajo se prepara al diluir volumen a volumen con agua bidestilada.

3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

REGULADOR DE CORRIMIENTO 10X TRIS/ GLICINA/ SDS BIO RAD

Para preparar 1 L de regulador de corrimiento pH 8.3, solución de trabajo, adicionar 100 mL del regulador concentrado 10X a 900 mL de agua bidestilada, homogeneizar, no es necesario ajustar pH y se debe conservar en refrigeración. La concentración final del regulador de corrimiento 1X es 25 Mm Tris, 192 mM de Glicina y 0.1% (p/ v) de SDS.

REGULADOR DE MUESTRA 2x

4x Tris 0.5 M, pH 6.8 + SDS	2.5 mL
SDS	0.4 g
Glicerol	2.0 mL
Ditiotreitol (DTT)	0.31 g
Agua bidestilada	4.7 mL
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 mL

Mezclar un volumen de muestra con un volumen de regulador de muestra 2x. Se recomienda fraccionar en volúmenes de 1 mL y almacenar a -70°C hasta su uso.

PREPARACIÓN DE REGULADOR DE MUESTRA

El uso del regulador de muestra Laemmli (*Laemmli Sample Buffer*), asegura una óptima resolución de bandas en la separación de proteínas por SDS- PAGE con buffer de corrimiento de Tris- Glicina- SDS. Este buffer está basado en el método de Laemmli (1970).

Composición:

62.5 Mm Tris- HCl, pH 6.8

25 % Glicerol

2 % SDS, 0.01 % azul de bromofenol.

Almacenar a temperatura ambiente.

Laemmli Sample Buffer + DTT de concentración 350 mM (54 mg/ mL).

INSTRUCCIONES DE USO

Adición de agente reductor: Adicionar 50 μL de beta- mercaptoetanol por cada 950 μL de regulador de muestra para una concentración final de 5 % β - mercaptoetanol, 710 mM.

Como alternativa, usar DTT o Reactivo de Cleland, usar a una concentración final de 350 mM (54 mg/ mL). Para mejores resultados, no almacenar el regulador de muestra con β - mercaptoetanol.

Diluyente de muestra: Diluir una parte de muestra con una parte del regulador de muestra de Laemmli. Más buffer de muestra puede ser adicionado si es necesario, 1 parte de muestra por 2 de buffer de muestra. Las muestras secas pueden ser disueltas directamente en buffer de muestra.

4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROTRANSFERENCIA

REGULADOR DE TRANSFERENCIA

Tris-base	3.02 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
Agua bidestilada	800 mL

A 500 mL de agua destilada agregar 3.02 g de tris base hasta su disolución, 14.4 g de glicina hasta su disolución y 200 mL de metanol, si no ocurre precipitación ajusta el pH a 8.3 con hidróxido de sodio 1 M y llevar a 1000 mL, se almacena en refrigeración, puede ser usado 3 veces.

REGULADOR SALINO DE FOSFATOS (PBS) 0.01 M pH 7.4

NaCl	0.6 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3.0 g
Na ₂ HPO ₄	12.8 g
o Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	24.12 g

Si es necesario con las mismas sales se ajusta el pH a 7.4, llevar a 1000 mL.

PBS- TWEEN 0.1%.

PBS 0.01M pH 7.4	1 000 mL
Tween 20	1 mL

SOLUCIÓN DE BLOQUEO: PBS-TWEEN 20-0.1%-ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 1%

PBS-Tween 0.01%	50 mL
Albúmina sérica bovina	0.5 g

COLORANTE ROJO DE PONCEAU S

Ácido tricloroacético	3 g
Agua bidestilada	100 mL
Rojo de Ponceau S	20 mg

DILUYENTE SUEROS Y CONJUGADOS

Solución de PBS-Tween 0.1%-albúmina sérica bovina al 1%

III. Obtención de extracto crudo a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

A partir de masa húmeda de epimastigotes (0.1895 g) de *Trypanosoma cruzi* autóctono, cosechados en fase logarítmica (después de cinco semanas de crecimiento) en medio de cultivo líquido libre de sangre, lavados dos veces con solución salina se obtuvo un extracto soluble de epimastigotes.

Por cada gramo de masa húmeda se adicionó 10 mL de una solución de TBS (Tris base salino 100 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.5) - Tioglicolato de sodio 1: 20 000 (como buffer de lisis); se resuspendió y se dejó en reposo por 1 hora a 4°C (con agitación cada 15 minutos) para producir ruptura del parásito y extraer el antígeno, se realizó centrifugación por 15 minutos a 3500 rpm (rotor de 17 cm de diámetro), 4°C. Se filtró el sobrenadante por membrana de 0.45 µm de poro, se guardó una muestra de este sobrenadante (100 µL) para cuantificación de proteínas por método de Lowry y se adicionaron 5 µL de cada inhibidor de proteasas por cada mL de extracto obtenido, se fraccionó y se almacenó al menos a -20 °C hasta su uso.

IV. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Las proteínas pueden determinarse por métodos colorimétricos, en el método de Lowry se mide el color azul producido al agregar el reactivo de fenol de Folin- Ciocalteu a una solución alcalina de estas. La intensidad del color depende de su contenido de tirosina y triptófano, aunque también influyen factores como el tiempo que la proteína está expuesta

al álcali antes de agregar el reactivo de fenol, y la presencia de SH u otros grupos reductores. Este método se hace más sensible con la adición de una pequeña cantidad de Cu^{++} para aumentar el desarrollo de color, lo que permite operar con muestras más pequeñas (Kabat y Mayer, 1968).

A una fracción del extracto crudo obtenido se le determinó concentración de proteínas mediante el método de Lowry, construir una curva de calibrado de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración 1 mg/ mL, que corrió de 5 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y aplicando el modelo de regresión lineal calculamos la concentración de proteínas. Las dilución de la muestra problema (1:50) y de la curva de calibrado se prepararon en agua grado milli Q, se agregaron los reactivos A y B e incubamos siguiendo lo indicado en la tabla 24.

Tabla 24. Construcción de curva de calibrado de BSA.

Volumen	0 μg	5 μg	10 μg	20 μg	40 μg	80 μg	100 μg	200 μg	Tiempo incubación
Agua μL	1000	995	990	980	960	920	900	800	
BSA μL	0	5	10	20	40	80	100	200	
Reactivo A μL	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	10 minutos
Reactivo B μL	300	300	300	300	300	300	300	300	30 minutos

Se realizó lectura a 500 nm de longitud de onda, previa calibración del espectrofotómetro con el tubo 1 (0 μg de BSA) a cero de absorbancia (100% de transmitancia). Se graficó la curva de calibrado, aplicamos la técnica estadística de regresión lineal y calculamos los estimadores de $m=$ pendiente y $b=$ ordenada al origen; despejando x en la ecuación $y= mx + b$, calculamos la concentración de proteínas de la dilución ensayada y para conocer la concentración de proteínas por mililitro del extracto sin diluir, multiplicamos el resultado obtenido por el factor de dilución.

V. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS 10%)

Para geles de 7 x 10 cm, el volumen de muestra utilizada fue la equivalente a 125 µg de extracto crudo puro de la cepa D, se agregó un volumen de regulador de muestra 2X e incubamos en baño maría a 100 ° C durante 5 minutos.

Después se adicionó 5 µL de yodoacetamida al 10% (preparado al momento de uso) para evitar la formación de complejos proteína- proteína.

Se preparó el regulador de corrimiento. Se retiraron los peines del cartucho que contiene el gel y se introdujeron cuidadosamente en la cámara de electroforesis, se agregó el regulador de corrimiento en el tanque.

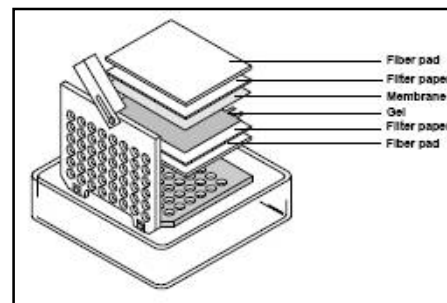
Después se colocó cuidadosamente el extracto antigénico en el carril preparativo y los marcadores de peso molecular (5 µL) en su carril correspondiente. Se ensambló el marco de electrodos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se conectaron los cables a la fuente de poder y se programó el voltaje a 100 Voltios. Cuando el frente iónico alcanzó el final del gel concentrador se ajustó voltaje a 150 Voltios y se dejó correr de 30 a 40 minutos más.

VI. Inmunoelectrotransferencia (*Immunoblotting o Western blot*)

Luego de la electroforesis, electrotransferir las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Para este fin, en un contenedor apropiado vertimos la cantidad suficiente de regulador de transferencia para cubrir las esponjas y papel filtro. Se retiró cuidadosamente el gel y se colocó en un recipiente que contenía regulador de transferencia, se dejó durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Se cortó el papel de nitrocelulosa al tamaño del gel y se hidrató con agua durante 5 minutos, posteriormente se estabilizó con regulador de transferencia durante 5 minutos.

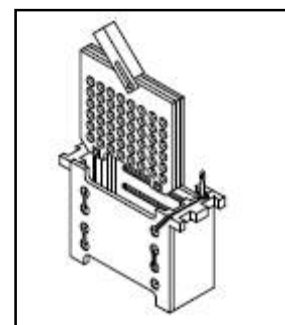
Se empalmó el papel de nitrocelulosa y el gel, entre las esponjas y papel filtro (figura 28).

FIGURA 28. Disposición del gel de poliacrilamida y membrana de nitrocelulosa para electrotransferencia
(Pastén, 2003).



Es fundamental que entre ellos que no existan burbujas, ya que provocarían una deficiente transferencia de proteínas. En el módulo de transferencia se coloca el empalme: esponja, papel filtro, el gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja (figura 29) (vigilando que la nitrocelulosa esté del lado del ánodo).

FIGURA 29. Disposición del módulo de transferencia (Pastén, 2003).



El módulo de transferencia se incorporó al tanque de la cámara de electrotransferencia y se llenó con regulador de transferencia, sin olvidar el refrigerante y una barra magnética. Después conectamos los cables a la fuente de poder, se programó la transferencia a 100 Voltios, durante una hora con agitación. Se recomienda trabajar a 4°C (baño de hielo) para disminuir el calor generado por el campo eléctrico.

Finalizada la transferencia verificamos la eficiencia al incubar la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo de Ponceau S (tinción reversible) durante 20 minutos; la regularidad en la tinción indicó que la transferencia fue apropiada. Eliminamos el exceso de colorante mediante lavados con agua destilada, lo que permitió visualizar los marcadores de peso molecular y los remarcamos con lápiz antes de proceder al desteñido total de la membrana, lo cual fue necesario para continuar con el proceso (Pastén, 2003 y de la Fuente y cols., 2007).

Finalmente saturamos la membrana de nitrocelulosa a fin de bloquear todos los sitios activos que queden libres, y evitar uniones de los anticuerpos (a la membrana) por adsorción. La saturación fue realizada por medio de una solución de PBS- BSA 1 %- Tween 20 0.1 % por 18 horas a 4°C, que impide uniones inespecíficas del anticuerpo. Algunos autores también sugieren el empleo de un suero de la misma especie que aquella de la que provienen los anticuerpos marcados, pero la BSA es en teoría la más adecuada para el bloqueo de proteínas fosforiladas (de la Fuente y cols., 2007). Cortamos tiras de 3 mm y las almacenamos en refrigeración hasta su uso. La tira con los marcadores de peso molecular se reserva para la evaluación tras la inmunodetección. La nitrocelulosa marcada y bloqueada puede guardarse a -20 °C hasta por 60 días.

VII. Inmunodetección

Las tiras de nitrocelulosa individuales se incubaron con una solución de PBS-Tween-20 0.1% (solución de lavado) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación basculante, después se eliminó la solución de lavado y se agregó la muestra de suero y/o controles (positivos y negativos) a una dilución de 1:500 (2 mL del diluyente de muestra PBS-BSA 1%, Tween-20 0.1% mas 4 µL del suero control o problema), se incubó a temperatura ambiente, en agitación basculante por 90 minutos. Al finalizar la incubación, se realizaron 5 lavados (para eliminar los productos no unidos) con PBS -Tween-20 0.1%. El primer lavado fue rápido y los 4 siguientes en agitación basculante, temperatura ambiente por 5 minutos.

Las proteínas inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos primarios específicos, 2 mL de anti IgG humana conjugada con Biotina, dilución 1/ 4000 en PBS-BSA 1%, Tween- 20 por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación basculante. Posteriormente realizamos 5 lavados (como los descritos anteriormente).

La siguiente incubación se realiza con un segundo conjugado, 2 mL de estreptavidina/ fosfatasa alcalina (con actividad enzimática), dilución 1/2000 en PBS-BSA 1%, Tween-20 0.1% por 1 hora en agitación basculante a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación

se hicieron 5 lavados, uno rápido, 2 de 5 minutos con solución de lavado y 2 lavados más con PBS 1X.

Nota: El conjugado anti IgG marcado con biotina, así como la estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina deben ser titulados en cada cambio de lote de reactivo, con base recomendación del fabricante y los perfiles de bandeó esperados para el suero control positivo y negativo.

Agregamos 2 mL de la solución sustrato de fosfatasa alcalina (NBT/ BCIP), la cual se preparó al momento de usarse, y se incubó durante 10 minutos aproximadamente. El paro del revelado se efectuó mediante lavados con agua destilada cuando el bandeó de las sueros control positivos y negativo presentó definición suficiente con respecto a los patrones de reactividad esperados, situación que validó cada serie de trabajo, finalmente secamos al aire para su posterior análisis. La interpretación o lectura se hace localizando e identificando la banda de peso relativo promedio de 72 kDa por comparación con el control reactivo, lo que clasifica la muestra como reactiva a *Trypanosoma cruzi* y si ocurre lo contrario se declara como no reactivo.

VIII. Definiciones

Analito: Especie de interés a determinar en un análisis.

Calificación: Es la comprobación formal, sistemática y documentada de que los instrumentos son apropiados para los fines previstos y que su desempeño está de acuerdo a las especificaciones establecidas por el usuario y el proveedor (CENAM, 2008).

Condiciones de precisión intermedia: condiciones bajo las cuales se obtienen los resultados de réplicas con el mismo método, en materiales presumiblemente idénticos y uno o más factores como tiempo, equipo, operador, varían dentro de un mismo laboratorio.

Condiciones de repetibilidad: condiciones bajo las cuales resultados de ensayos independientes son obtenidos con el mismo método, en materiales presumiblemente idénticos, en el mismo lugar, con el mismo equipo, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo.

Condiciones de reproducibilidad: condiciones bajo las cuales se obtiene resultados replicados en materiales presumiblemente idénticos, en diferentes lugares, con diferentes operadores utilizando equipos diferentes.

Confiabilidad: Aquel resultado de laboratorio preciso y exacto (Terrés, 2006).

Criterio de desempeño: requisito para una característica de desempeño de acuerdo a la cual puede juzgarse que el método de ensayo satisface con el propósito y genera resultados confiables.

Especificidad analítica: Es la capacidad para determinar el analito inequívocamente, en la presencia de componentes que se espera estén presentes (CENAM, 2008).

Especificidad (diagnóstica): Capacidad para detectar a los individuos sanos o la fracción de verdaderos negativos, obtenidos cuando un test es aplicado a muestras negativas ($VN / VN + FP$).

Exactitud de una medición: Grado de concordancia entre el valor aceptado como un valor verdadero convencional o un valor de referencia y el valor encontrado. A la exactitud también se le conoce como veracidad (OGA, 2007).

Tener presente que el término exactitud cuándo se aplica a un conjunto de resultados de ensayo implica una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático común o componente de sesgo que en inglés se conoce como “*bias*”. La exactitud se expresa, por

tanto, como la suma de dos términos, veracidad (proximidad con el valor de referencia aceptado) y precisión (dispersión de los resultados) (Rius y cols., 2009).

Exactitud relativa: Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido (CENAM, 2008).

Fortaleza (*ruggedness*): de un método analítico implica estabilidad del resultado producido cuando hay variaciones en los pasos del método. Es el grado de reproducibilidad para obtener resultados en el análisis de una misma muestra bajo condiciones variadas (de tipo externas), tales como diferente laboratorio, diferentes días, analistas, instrumentos, lotes, reactivos, tiempos de análisis o temperaturas (Trullols y cols. 2006). La fortaleza es normalmente expresada como la falta o carencia de influencia de variables ambientales u operacionales en los resultados del método analítico. Este parámetro es especialmente importante para métodos que van a ser propuestos como métodos normalizados o de referencia (OGA, 2007).

Incertidumbre de medición: parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurado (CENAM, 2008). La forma típica de incertidumbre es de tipo probabilística con el uso de las estimaciones de respuestas falsas, particularmente la “razón” falsa positiva y falsa negativa (Hardcastle y Ellison, 2002).

Intervalo de trabajo: conjunto de los valores de magnitudes de una misma naturaleza que un método de ensayo puede medir con una incertidumbre especificada, en condiciones determinadas. Se denomina también intervalo de medición o rango.

Linealidad: La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del Analito en las muestras de examen.

Mensurando: magnitud particular sometida a medición.

Material de referencia (MR): material o sustancia cuyas propiedades tienen valores suficientemente homogéneos y claramente establecidos como para poder ser utilizados en la calibración de un equipo, la evaluación de un método de ensayo o la asignación de valores a materiales.

Material de referencia certificado (MRC): material de referencia, acompañado de un certificado otorgado por una autoridad, en el cual uno o más valores de sus propiedades

han sido certificados mediante un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de dichas propiedades. Cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre y el nivel de confianza correspondiente.

Método alternativo: método que ha sido validado por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado y es reconocido formalmente como equivalente al método de referencia por un organismo competente de acuerdo a datos experimentales obtenidos, por ejemplo mediante ensayos colaborativos.

Método basado en norma: método descrito en un procedimiento interno del laboratorio, que está basado claramente en un método normalizado y que no supone una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica. Debe mantenerse actualizado en relación con el método de referencia en que se fundamenten.

Método cualitativo: Procedimiento de examen que provee una respuesta binaria o bien únicamente dos respuestas categóricas: presencia o ausencia, positivo o negativo, reactivo o no reactivo, en relación al analito de interés.

Método cuantitativo: Ensayo que presenta un análisis con cifras sobre una escala continua de medición, donde los límites de medición alto y bajo son conocidos y están en relación directa con una cantidad o una actividad relacionada con el analito a medir.

Método desarrollado: método de ensayo desarrollado por el laboratorio o por un fabricante o proveedor de equipos, etc., de forma unilateral y que no dispone del reconocimiento de los métodos normalizados o de los métodos alternativos.

Método normalizado: método publicado como norma internacional, regional o nacional, o por organizaciones técnicas reconocidas (Ejemplos: ISO, AOAC, etc.).

Método de referencia: método investigado a fondo, que describe con claridad y exactitud las condiciones y los procedimientos necesarios para medir los valores de una o más propiedades y que ha demostrado tener una exactitud y precisión apropiadas para el uso que pretende hacerse del mismo, de manera que puede utilizarse para evaluar la exactitud de otros métodos empleados para realizar la misma medición y, en particular, para caracterizar un material de referencia. En general se trata de un método normalizado.

Modificación de método normalizado o alternativo: método normalizado o alternativo que es modificado significativamente para atender a requisitos específicos.

Muestras de control: Material de composición conocida, usado con el propósito de dar seguimiento al proceso analítico, debe ser similar a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema: matriz y estado físico de preparación, así como el intervalo de concentración del analito.

Prevalencia: Frecuencia de datos positivos en una población estudiada.

Precisión de una medición: proximidad entre valores obtenidos por medición de replicados en el mismo o similar material bajo condiciones específicas. La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Dicho de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de la media, que puede ser expresada en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (parámetros de dispersión) (OGA, 2007).

Precisión intermedia: medida de la precisión de los resultados de un método de ensayo en condiciones diferentes de analista/ observador, en diferentes días, o con diferentes equipos y lotes de reactivos, dentro del mismo laboratorio (OGA, 2007).

Procedimiento analítico: es el resultado de la adaptación de un método analítico, disponible en la bibliografía para determinar un analito, al análisis de muestras caracterizadas por la naturaleza de la matriz.

Producto: aquel definido por un conjunto de atributos físicos y tangibles reunidos en una forma identificable.

Rango: El rango de un método analítico, es el intervalo entre el valor máximo y mínimo de la concentración del analito/ el parámetro de la muestra, para el cual ha sido demostrado que el nivel de precisión, exactitud y linealidad del método de análisis es adecuado (OGA, 2007).

Repetibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurado, realizadas en las mismas condiciones de medición. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/ observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto periodo de tiempo, puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza,

coeficiente de variación). A la repetibilidad también se le conoce como precisión intra ensayos o intra calibraciones (OGA, 2007).

Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurado, realizadas en diferentes condiciones de medición (CENAM, 2008). La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza o coeficiente de variación) (OGA, 2007), por lo general se cuantifica en el laboratorio clínico a través del coeficiente de variación porcentual (desviación estándar/ media)* 100.

Robustez (*robustness*): de un método analítico describe la capacidad de permanecer inalterable debido a pequeñas pero deliberadas modificaciones en las variables o parámetros del método (que pertenecen al método de análisis). Proporciona una estimación cualitativa de su confiabilidad cuando el análisis se ejecuta en condiciones normales (Trullols y cols., 2006).

Sensibilidad analítica: La capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de un analito.

Sensibilidad (diagnóstica): Es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad o la fracción de verdaderos positivos, obtenidos cuando un “test” es aplicado a muestras positivas (VP/ VP + FN).

Servicio: producto intangible que generalmente no se experimenta antes de la compra pero permite satisfacciones que compensan el dinero invertido para las necesidades del cliente. Un servicio es también el resultado de un proceso que involucra desde las actividades internas del proveedor, la interrelación proveedor- cliente, comentarios e interpretación de resultados, consultorías, capacitación, estandarización metodológica, transferencia tecnológica, desarrollo de programas de evaluación o herramientas para auditoría interna y control de calidad, supervisión de la red de laboratorios, notificación de casos, entre otros actividades (OPS/ OMS, 2005).

Suero discrepante: Aquel con una conclusión diagnóstica diferente a la esperada.

Tabla de contingencia: Es una tabla de doble entrada que permite analizar la relación de dependencia o independencia entre dos variables cualitativas nominales o factores; donde en cada casilla figurará el número de casos o individuos que poseen un nivel de uno de los factores o características analizadas y otro nivel del otro factor analizado.

Tasa de falsos negativos: es la probabilidad de que una muestra con valor verdadero positivo dé un valor negativo por el test de *screening* ($TFN = FN / (FN + TP)$).

Tasa de falsos positivos: es la probabilidad de que una muestra con valor verdadero negativo dé un valor positivo por el test de *screening* ($TFP = FP / (FP + TN)$).

Valor predictivo negativo (VPN): El porcentaje de los sujetos con un resultado negativo que no tienen la condición de interés.

Valor predictivo positivo (VPP): El porcentaje de sujetos con un resultado positivo que tienen la condición de interés.

Validación: confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (NPAAC, 2003).

Variabilidad analítica: Son todos los factores que intervienen en la obtención de un resultado de laboratorio, desde la toma de la muestra hasta el reporte de los resultados (Terrés, 2006).

Veracidad: Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia.

Verificación: Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método. La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de la validación.

IX. Caracterización del panel PA- 08

Tabla 25a. Caracterización de panel PA- 08 con pruebas de ELISA (equipo comercial).

CLAVE	WIENER ELISA	BIOKIT ELISA	ENZIME CHAGAS INTERBIOL	PHATOZYME CHAGAS OMEGA	CHAGASCREEN ELISA BIO- RAD
PA001-08	5.66	7.18	2.11	3.61	2.88
PA002-08	5.14	4.32	2.03	4.02	3.32
PA004-08	1.15	4.06	1.19	4.84	1.15
PA006-08	1.54	6.43	1.64	3.67	1.47
PA010-08	2.84	7.87	1.62	3.26	2.61
PA011-08	2.66	7.94	2.06	3.27	2.35
PA013-08	2.03	7.37	1.43	3.02	2.47
PA014-08	0.64	1.13	0.92	2.75	2.54
PA016-08	0.24	0.26	0.01	0.19	0.10
PA019-08	7.20	8.44	3.36	4.98	5.63
PA023-08	0.12	2.30	0.78	0.99	0.17
PA024-08	0.51	1.88	0.80	1.35	0.12
PA029-08	6.44	5.66	1.90	3.84	4.76
PA030-08	3.66	4.33	2.05	3.14	1.02
PA033-08	0.74	3.94	0.69	3.49	1.18
PA035-08	6.51	9.89	2.54	4.02	5.07
PA036-08	3.72	5.83	1.62	3.87	2.94
PA040-08	4.54	7.46	2.04	4.56	3.99
PA046-08	0.11	5.84	0.67	2.69	0.97
PA049-08	0.10	0.06	0.04	0.21	0.08
PA050-08	0.12	0.04	0.13	0.22	0.09
PA052-08	0.12	0.06	0.04	0.21	0.08
PA053-08	0.10	0.10	0.10	0.19	0.10
PA054-08	0.13	0.07	0.13	0.16	0.08
PA055-08	0.13	0.13	0.21	0.21	0.09

Los resultados numéricos están expresados como S/ Co, donde el valor de corte (*cut off*) ELISA/ Wiener (Ag crudo) 0.237, ELISA/ Bio Kit (Ag recombinante) 0.334, Enzime Chagas/ Interbiol (Ag recombinante) 0.206, Phatozyme Chagas/ Omega (Ag recombinante) 0.445, Chagascreen ELISA/ Bio Rad (Ag crudo) 0.235.

Tabla 25b.Caracterización de panel PA- 08 con pruebas de ELISA (equipo comercial).

CLAVE	CHAGATEST V 3.0 ELISA WIENER	ELISA BIOSCHILE	ELISA ACCUTRACK CHAGAS	CHAGATEK ELISA	BIOZYMA ELISA
PA001-08	8.35	2.88	10.50	8.88	2.47
PA002-08	8.51	2.57	10.84	9.12	4.24
PA004-08	5.86	2.36	6.35	5.25	3.02
PA006-08	7.80	2.66	7.67	7.41	4.01
PA010-08	8.17	2.68	7.63	7.54	3.66
PA011-08	6.86	2.99	10.07	9.77	5.65
PA013-08	7.00	2.46	7.86	6.90	2.59
PA014-08	8.07	2.06	6.94	5.82	2.87
PA016-08	0.06	0.20	0.33	0.42	0.36
PA019-08	10.77	3.53	0.26	12.29	8.45
PA023-08	1.24	2.11	4.38	3.51	2.39
PA024-08	2.67	1.87	6.06	0.29	3.02
PA029-08	8.61	2.65	9.66	5.16	6.50
PA030-08	7.71	2.45	6.63	7.64	2.43
PA033-08	5.69	1.55	4.31	3.68	2.31
PA035-08	10.06	3.36	10.50	10.34	6.69
PA036-08	8.42	2.02	8.29	6.27	4.82
PA040-08	8.36	2.60	9.17	9.06	4.55
PA046-08	4.95	1.81	5.19	5.54	3.10
PA049-08	0.02	0.22	0.45	0.50	0.42
PA050-08	0.02	0.23	0.28	0.37	0.36
PA052-08	0.02	0.33	0.30	0.36	0.39
PA053-08	0.03	0.16	0.32	0.36	0.33
PA054-08	0.29	0.17	0.26	0.36	0.28
PA055-08	0.02	0.19	0.33	0.38	0.34

Los resultados numéricos están expresados como S/ Co, donde el valor de corte Chagatest ELISA/ Wiener V 3.0 (Ag recombinante) 0.235, Bios Chile (Ag Tul y Mn) 0.652, ELISA Accutrack Chagas (Ag purificado) 0.232, Chagatek ELISA (Ag crudo) 0.185, Biozymia ELISA (Ag recombinante) 0.206.

Tabla 26. Caracterización de panel PA- 08 con HAI y pruebas inmunocromatográficas.

CLAVE	CHAGAS HAI INTERBIOL	CHAGATEST HAI WIENER	CHAGATEST HAI LEMOS	SERODIA CHAGAS FUJIREBIO	CHAGAS STAT-PAK	IMMUNOCOMB II CHAGAS Ab
PA001-08	4	8	2	4	+	+
PA002-08	32	32	32	4	+	+
PA004-08	1	2	2	4	+	+
PA006-08	4	2	1	4	+	+
PA010-08	4	4	1	4	+	+
PA011-08	4	16	8	4	+	+
PA013-08	4	4	4	4	+	+
PA014-08	2	2	0	4	+	+
PA016-08	0	0	0	0	-	ND
PA019-08	8	32	16	4	+	+
PA023-08	4	4	4	4	-	ND
PA024-08	4	4	1	4	+	ND
PA029-08	8	32	4	4	+	+
PA030-08	8	8	1	4	+	+
PA033-08	1	2	0	4	+	ND
PA035-08	2	16	4	4	+	+
PA036-08	4	32	4	4	+	+
PA040-08	4	16	4	4	+	+
PA046-08	1	1	0	4	+	ND
PA049-08	0	0	0	0	-	-
PA050-08	0	0	0	0	-	-
PA052-08	0	0	0	0	-	-
PA053-08	0	0	0	0	-	-
PA054-08	0	0	0	0	-	-
PA055-08	0	0	0	0	-	-

Los resultados numéricos están expresados como S/ Co, donde el valor de corte (cut off) Chagas/ HAI Interbiol (Ag crudo) 1:8, Chagatest HAI/ Wiener (Ag crudo) 1:8, Chagatest HAI/ Lemos (Ag crudo) 1:8, Serodia- Chagas/ Fugirebio Ag PS 1:32. Las pruebas Chagas Stat- Pak Stat (Ag recombinante) e ImmunoComb II Ab (Ag recombinante) son de fundamento inmunocromatográfico, donde (+) indica presencia de anticuerpos anti- *T. cruzi* y (-) indica ausencia a detección de anticuerpos anti- *T. cruzi*. ND, no determinado.

X. Caracterización del panel PMT 203 (Inserto)

Anti-*T. cruzi* Performance Panel Modified PMT203(M2)

A SERACARE PANEL PRODUCT

OVERVIEW

This Data Sheet contains test results specific for Anti-*T. cruzi* Performance Panel PMT203(M2).

Panel members are undiluted aliquots from plasma units collected from blood donors in the United States, Central and South America and Mexico. No preservatives were added. Panel Members 3, 5, 7, and 15 are no longer available. Data provided are for informational use only.

CAUTION: Potentially infectious materials. Follow Universal Precautions. All panel members were found non-reactive for HBsAg, Anti-HIV and Anti-HCV.
For Research Use Only.

Not for use in diagnostic procedures.

Data are offered for informational purposes only. SeraCare Life Sciences does not claim these results can be duplicated exactly.

For assistance, contact SeraCare Technical Support at 508.244.6400

Anti-*T. cruzi* (numeric results are expressed as s/co)¹

Panel Member	Country of origin	ABBOTT PRISM Chagas	biokit bioelisa Chagas	BIOS Chile Chagas III	Fujirebio SERODIA Chagas
PMT203-01	Mexico	4.5	8.2	2.1	Pos
PMT203-02	United States	8.2	8.5	2.0	Pos
PMT203-03	United States				
PMT203-04	Mexico	9.3	5.5	2.6	Pos
PMT203-05	Guatemala	8.7	8.5	3.6	Pos
PMT203-06	Nicaragua	10.4	9.3	3.1	Pos
PMT203-07	Nicaragua	6.8	8.2	2.2	Pos
PMT203-08	Honduras	5.2	9.3	2.9	Pos
PMT203-09	Salvador	6.5	2.0	2.0	Pos
PMT203-10	Argentina	11.7	9.2	4.0	Pos
PMT203-11	Honduras	4.3	3.2	1.5	Pos
PMT203-12	Venezuela	11.5	9.3	2.4	Pos
PMT203-13	Bolivia	14.3	9.3	3.7	Pos
PMT203-14	Argentina	1.1	2.6	0.9	Pos
PMT203-15	Honduras	0.1	0.1	0.1	Neg
Test Date		22-Nov-10	20-Oct-10 03-Dec-10	20-Oct-10 25-Oct-10	25-Oct-10 26-Oct-10
Test Site		RL	SC	SC	SC
Kit Part Code		7K35-48	3000-1236	410014	227442
Kit Lot No.		90096M500	G-0210	1P100277	WM00701
Kit Exp. Date		10-Mar-11	23-May-11	22-Sep-11	31-Dec-11

¹ Immunoassay results are means of duplicates expressed as signal to cutoff ratios (s/co). Ratios ≥ 1.0 are considered reactive and noted in red.

POS = positive; NEG = negative; NA = not available
RL = Reference Lab; SC = SeraCare



DATA SHEET

Anti-T. cruzi
Performance Panel Modified
PMT203(M2)Anti-T. cruzi (numeric results are expressed as s/co)¹

Panel Member	Country of origin	Hemagen Chagas	Ortho T.cruzi ELISA	Wiener Chagatest ELISA
PMT203-01	Mexico	1.3	2.8	5.8
PMT203-02	United States	1.8	4.1	5.9
PMT203-03	United States			
PMT203-04	Mexico	1.8	5.1	8.1
PMT203-05	Guatemala	2.0	6.3	8.1
PMT203-06	Nicaragua	2.0	6.5	8.8
PMT203-07	Nicaragua	1.6	4.1	7.0
PMT203-08	Honduras	2.0	5.0	6.2
PMT203-09	Salvador	1.4	3.3	7.7
PMT203-10	Argentina	2.1	7.6	8.9
PMT203-11	Honduras	1.5	2.8	6.2
PMT203-12	Venezuela	1.8	4.6	8.7
PMT203-13	Bolivia	2.2	7.5	8.3
PMT203-14	Argentina	0.8	1.2	1.4
PMT203-15	Honduras	0.6	0.1	0.0
Test Date		16-Sep-10	16-Sep-10	01-Oct-10 11-Oct-10
Test Site		SC	SC	RL
Kit Part Code		66101L	6901968	1293254
Kit Lot No.		OCG0802	CRU191	1005043380
Kit Exp. Date		28-Feb-11	20-Oct-10	01-Apr-11

¹ Immunoassay results are means of duplicates expressed as signal to cutoff ratios (s/co). Ratios ≥ 1.0 are considered reactive and noted in red. Panel Members 3, 5, 7, and 15 are no longer available. Data provided are for informational use only.
POS = positive; NEG = negative; NA = not available
RL = Reference Lab; SC = SeraCare

DATA SHEET

Anti-T. cruzi
Performance Panel Modified
PMT203(M2)

Anti-T. cruzi confirmatory tests

Panel Member	Country of origin	Chagas RIPA	Chagas IFA		Interpretation
			IgG	IgM	
PMT203-01	Mexico	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-02	United States	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-03	United States				
PMT203-04	Mexico	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-05	Guatemala	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-06	Nicaragua	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-07	Nicaragua	Pos	1:32	<1:20	Past infection
PMT203-08	Honduras	Pos	1:64	<1:20	Past infection
PMT203-09	Salvador	Pos	1:16	<1:20	Past infection
PMT203-10	Argentina	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-11	Honduras	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-12	Venezuela	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-13	Bolivia	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-14	Argentina	Pos	<1:16	<1:20	Antibody not detected
PMT203-15	Honduras	N/A	<1:16	<1:20	Antibody not detected
Test Date		17-Aug-10 18-Aug-10		17-Aug-10	
Test Site		RL		RL	
Kit Part Code		NA		NA	
Kit Lot No.		NA		NA	
Kit Exp. Date		NA		NA	

Panel Members 3, 5, 7, and 15 are no longer available. Data provided are for informational use only.
POS = positive; NEG = negative; NA = not available
RL = Reference Lab; SC = SeraCare

The Data Sheet for this panel in PDF form can be found at www.seracarepanels.com

The printed Data Sheet may be requested by email at info@seracare.com, or by phone at 508.244.6400

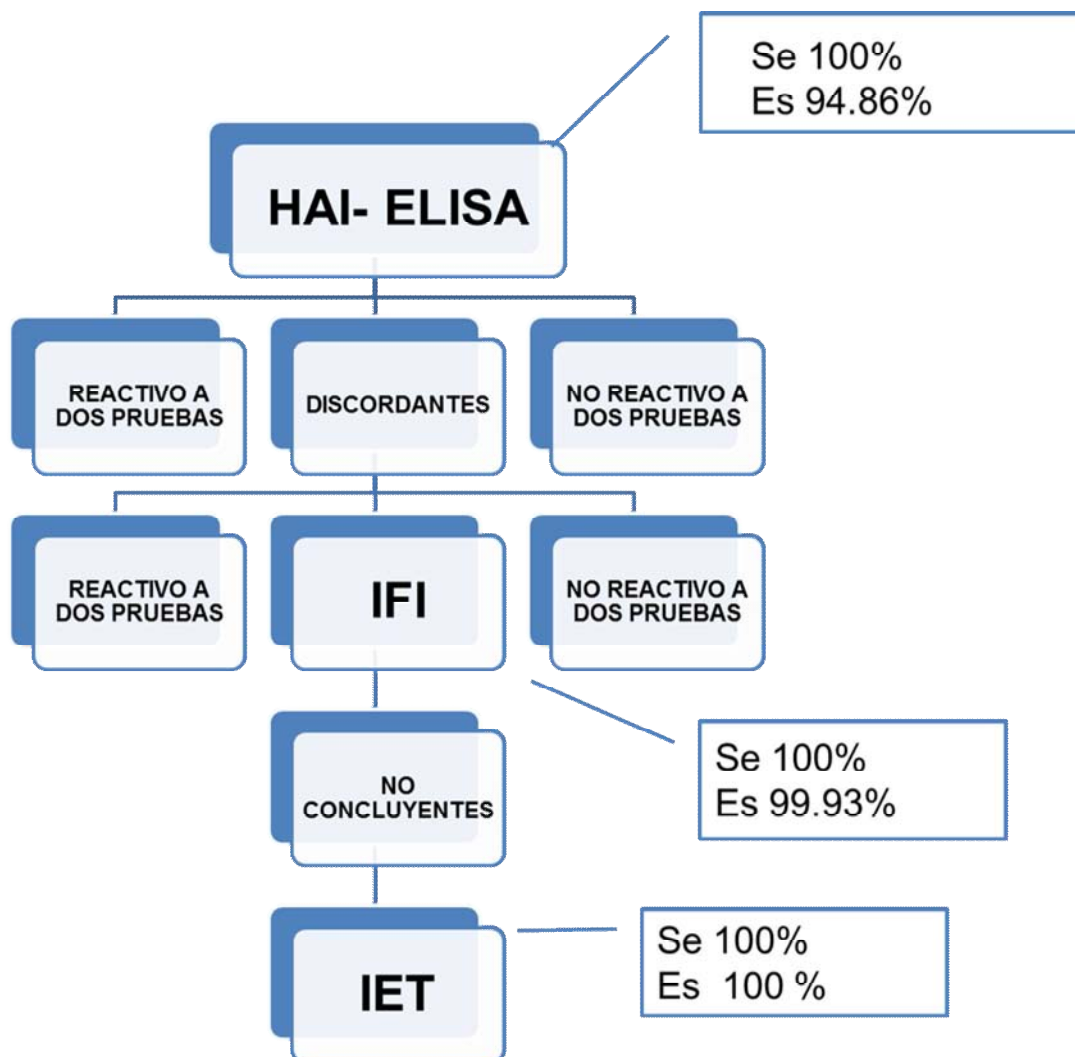


XI. Algoritmo de diagnóstico serológico LeCh- InDRE



El diagrama muestra el algoritmo seguido en la caracterización del panel 3 (PA-10), los miembros de este panel fueron confirmados por tres técnicas serológicas diferentes (HAI- InDRE, IFI- InDRE, ELISA- InDRE, pruebas desarrolladas y validadas en LeCh- InDRE).

XII. Algoritmo de diagnóstico serológico Lech- InDRE (inclusión IET)



El diagrama muestra el algoritmo de diagnóstico serológico con la inclusión de la Inmunolectrotransferencia, como una metodología de utilidad en la solución de discrepancias en la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en pacientes crónico asintomáticos.

XIII. *Western blot* (Inserto)WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS
ANTI- *Trypanosoma cruzi*

Laboratorio Enfermedad de Chagas, Departamento Parasitología, IN-DRE, Secretaria de Salud.

FUNDAMENTO

Las proteínas de *Trypanosoma cruzi* se separan en función de su peso y carga mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, posteriormente se transfieren a un soporte sólido como la membrana de nitrocelulosa, la técnica culmina con el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Este reconocimiento se lleva a cabo con la incubación de las muestras y sueros control, si los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* están presentes, se unirán a las proteínas electro transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Una segunda incubación con un conjugado anti-IgG Humano marcado con biotina reconocerá los complejos Ag-Ac presentes en la membrana, que al incubar con Estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina reconocerá la biotina del conjugado y con la adición de un sustrato cromogénico cuyo producto lleva a la aparición de bandas coloreadas específicas es como concluye la IET.

La Inmunolectrotransferencia (IET) o Western blot es una técnica comúnmente utilizada en el análisis de mezclas complejas de antígenos para investigar variaciones de la respuestas inmunológica o identificar antígenos inmunodominantes reconocidos por anticuerpos específicos en modelos animales o en enfermedades infecciosas humanas. La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis y la especificidad de la inmunodetección.

MATERIAL

- ⊕ Geles de poliacrilamida MINI- PROTEAN TGX al 10% de 7 cm con peine ciego. BIO- RAD. Catálogo #456- 1031.
- ⊕ Marcadores de peso molecular PRECISION PLUS PROTEIN STANDARD. BIO- RAD. Catálogo #161- 0378.
- ⊕ Regulador de muestra para electroforesis. BIO- RAD. Catálogo #161- 0737.
- ⊕ Regulador de corrimiento para SDS- PAGE 10X TRIS/ Glicina/ SDS. BIO- RAD. Catálogo #161- 0772.

- ⊕ Regulador de transferencia TRIS/ Glicina 10X TG. BIO- RAD. Catálogo #161- 0771.
- ⊕ Membranas de nitrocelulosa de 0.2 μm de 8 x 12 cm. Thermo. Producto #77012.
- ⊕ Membranas de nitrocelulosa con proteínas electroeluidas.
- ⊕ Regulador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, 0.01M
- ⊕ Tween 20. BIO- RAD. Catálogo #170- 6531.
- ⊕ Albúmina sérica bovina (ASB) ROCHE, REF 10 735 078 001)
- ⊕ Anti IgG Humana obtenida en cabra conjugada a Biotina
- ⊕ Estreptavidina conjugada a Fosfatasa Alcalina (FA)
- ⊕ Solución reveladora NBT/ BCIP Thermo. PROD #34042
- ⊕ Charolas de 9 carriles para Western blot
- ⊕ Micropipetas de volúmenes variables
- ⊕ Agitador orbital
- ⊕ Suero control positivo Accurun 190. SeraCare
- ⊕ Suero control negativo confirmado.

ALMACENAMIENTO

Almacenar entre 2 y 8 °C, no congelar.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- ⊕ Regulador salino de fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.4

Pesar 0.6 g de NaCl, 3.0 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 12.8 g de Na_2HPO_4 (si se cuenta con $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se requiere 24.12 g), se disuelven en 800 mL y se mide el pH, si es necesario con las mismas sales se ajusta a 7.4, aforar a 1000 mL.

- ⊕ PBS- TWEEN 20 0.1%
- ⊕ PBS- TWEEN 20 0.1%- ASB 1%

CONDICIONES DE USO DE REACTIVOS Y SUEROS CONTROL

Llevar los reactivos a temperatura ambiente al menos 20 minutos.

- ⊕ PBS 1X Solución de trabajo
- ⊕ PBS-Tween 20 0.1%. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ PBS-Tween 20 0.1%-ASB 1%. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ Anti IgG Humana-Biotina 1:4000. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ Estreptavidina-FA 1:2000. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ Solución reveladora. Al momento de su uso.
- ⊕ Suero control positivo 1:500. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ Suero control negativo 1:500. Preparar al momento de su uso.
- ⊕ Suero problema 1:500. Debe ser fresco y libre de factores interferentes (hemoglobina, lípidos, bilirrubinas, etc.). Los sueros deben ser conservados de 2 a 8 ° C para su proceso inmediato, si esto no sucede se deben conservar a -60 ° C hasta su proceso, se debe evitar ciclos de congelación- descongelación.

PROCEDIMIENTO

1. De acuerdo al mapa de trabajo, identificar en la charola de reacción tira y suero correspondiente.
2. Hidratar con PBS-Tween 20 0.1%, 5 minutos, al término eliminar.
3. Siguiendo el mapa de trabajo, agregar 1 mL del suero problema o control a una dilución 1:500 en PBS-Tween 20 0.1%-ASB 1%. Incubar 90 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
4. Lavar 5 veces con PBS-Tween 20 0.1%: un lavado rápido y cuatro de 5 minutos en agitación.
5. Agregar por carril, 1 mL de Anti IgG humana conjugada a Biotina en una dilución 1:4000, en PBS-Tween 20 0.1%-ASB 1%. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
6. Lavar como se indica en 4.

7. Agregar por carril 1 mL de Estreptavidina- FA 1:2000 en PBS-Tween 20 0.1%- ASB 1%. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
8. Lavar 5 veces: 3 con PBS-Tween-20 0.1% y 2 PBS 1X por 5 minutos cada uno.
9. Agregar 1 mL de la solución reveladora e incubar de a 10 a 20 minutos. Una vez observada la intensidad esperada del suero control positivo (Fig. 1a) lavar con suficiente agua destilada y secar al aire para su interpretación.

Nota: en cada cambio de lote de reactivos, se debe buscar la dilución óptima para encontrar la reactividad esperada del suero control de referencia.

RESULTADOS

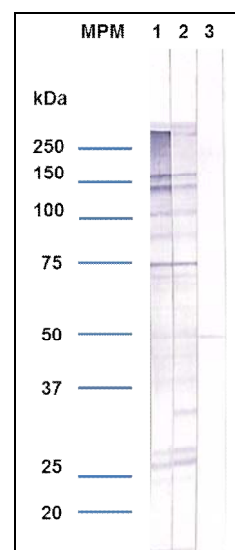


Fig. 1 Perfil de inmunodetección. Tira 1: control positivo alto, 2: control positivo débil, 3: control negativo.

PATRONES DE REFERENCIA

El patrón de referencia se construye a partir del perfil de inmunodetección del suero control positivo y negativo Fig. 1.

VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Si en la reacción de la tira del suero control positivo se observa la banda de 74 kDa entonces el ensayo se acepta como válido. Para este fin se evalúa el patrón de inmunodetección del suero control. La evaluación consiste en investigar la igualdad (similitud) de los mapas de bandeado entre los ensayos realizados y el patrón esperado, si ocurre esto se considera que el proceso es válido. Esta situación respalda que el proceso de electroforesis y transferencia es de acuerdo a lo establecido en el procedimiento operativo estandarizado.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

Si se observa la banda de 72 kDa entonces la muestra se confirma como positiva a anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

La técnica de IET (Western blot) se evaluó con un panel de referencia caracterizado constituido por 150 sueros y 14 plasmas.

En el estudio comparativo se analizaron 31 muestras positivas y 83 muestras negativas. Los parámetros de desempeño obtenidos se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Parámetros de desempeño IET.

ESTIMADORES	
SENSIBILIDAD	100 %
ESPECIFICIDAD	100 %
FALSOS POSITIVOS	0 %
FALSOS NEGATIVOS	0 %
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	100 % (88.78 a 100%)
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	100% (95.65 a 100 %)

El estudio de imprecisión mostró un coeficiente de variación menor del 5% en la imprecisión intra ensayo y total.

Al investigar la reactividad cruzada en 45 muestras séricas, 15 de individuos con leishmaniosis cutánea localizada, 15 con toxoplasmosis y 15 con

tuberculosis pulmonar activa. Ningún suero mostró reactividad al marcador de 72 kDa.

BIBLIOGRAFÍA

⊕ Brett AN (1994). Microsatellite genome screening: Rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeats analysis. *Biotechniques*. **17** (4): 708-713.

⊕ Isolation and analysis of proteins, Chapter 8. In: *Current protocols in immunology* (1995). Supp. 13.

⊕ Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. **76** (9): 4350-4354.

⊕ Towbin H y Gordon J (1984). Immunoblotting and dot immunobinding- current status and outlook. *J Immunol Methods*. **72**: 313-339.

⊕ Harloe E y Lane D (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Pp 505.

⊕ Chesher D (2008). Evaluating Assay Precision. *Clin Biochem Rev Vol* **29**, Suppl (i): S23- S26.

⊕ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved guideline*. Second Edition. CLSI document EP12-A2 (ISBN 1-56238-654-9) **28** (3).

⊕ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). *Verificación del desempeño de la precisión y veracidad por el usuario; directriz aprobada*. Segunda edición. Documento CLSI EP15-A2 (ISBN 1-56238-574-7) **25** (17).