17
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

EXTRACCION DE ANTIGENOS METABOLICOS Y SOMATICOS DE *Trypanosoma cruzi* DE CUATRO CEPAS MEXICANAS PARA LAS PRUEBAS DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A N

NORMA LETICIA BAUTISTA LOPEZ

ROSA LAURA PARRA TORRES

MEXICO, D. F. 1987.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

	Páginas.
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.	
Historia de la enfermedad	1
Distribución geográfica	2
Agente etiológico	3
Agente transmisor	5
Ciclo de vida del agente etiológico	6
Patogenia y patología	8
Diagnóstico	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	
Trypanosoma cruzi	19
Medios de cultivo	19
Curva de crecimiento	20
Obtención de antígenos metabólicos	20
Obtención de antígenos somáticos	20
Métodos químicos	21
Metodos inmunológicos	21
RESULTADOS	23
DISCUSION	25
CONCLUSIONES	31
LISTA DE TABLAS	32
LISTA DE FIGURAS	37
GLOSARIO	57
BIBLIOGRAFIA	59

Introducción y Antecedentes

HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas que es producida por *Trypanosoma cruzi*, fue descubierta en Minas Gerais, Brasil en 1907 por el médico brasileño Carlos Chagas, mientras observaba el contenido intestinal de un insecto hematófago *Pastrongilus megistus* de la familia Reduvidae. Chagas mandó varios de estos insectos vivos al Instituto Oswaldo Cruz, en donde se les alimentó con sangre de marmotas y cobayos. Un mes después, en la sangre de estos animales aparecieron los tripanosomas.

Chagas pensó que los parásitos realizaban una especie de esquizogonia en los pulmones, por lo que los denominó *Schizotrypanum* y *cruzi* por su maestro Oswaldo Cruz (21), pero como este nombre estaba basado en un concepto falso el mismo Chagas lo retiró e incluyó a la especie en el género *Trypanosoma*. Hoy día, mundialmente se conoce a la tripanosomiasis americana como "Enfermedad de Chagas". Sus investigaciones continuaron con el mismo insecto de la familia Reduvidae, hasta que fue llamado para atender un caso humano, en el cual encontró en una gota de sangre los mismos parásitos que en los animales estudiados y demostró que la enfermedad era endémica en ciertas zonas de Brasil. A lo largo de la historia ha sido el único caso en el que el agente etiológico y el insecto transmisor se descubrieron antes de que fuera diferenciada la propia enfermedad como entidad nosológica (18).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

La distribución geográfica del hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* se confina al Hemisferio Occidental, abarcando desde Canadá hasta el sur de Argentina, calculándose que existen unos siete millones de personas infectadas por *T. cruzi* y unos 25 millones de personas expuestas a la infección por vivir en zonas endémicas de este padecimiento según el grupo de expertos de la O.M.S. (18).

Los casos de enfermedad de Chagas se han reportado en Brasil, Chile, Argentina, Paraguay, Uruguay, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Guayana Francesa, Venezuela, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Estados Unidos y Canadá (18). En algunas investigaciones realizadas en Brasil se ha reportado que el 30% de la población adulta muere por infección de *T. cruzi*.

En la República Mexicana se considera como área endémica probable, todo el territorio que se encuentra entre los 0 y 1800 m.s.n.m., es decir las dos terceras partes del territorio nacional, ya que en poblaciones localizadas en las altitudes mencionadas se han encontrado triatominos infectados por *T. cruzi* dentro de la habitación humana. Se han reportado 150 casos de enfermedad de Chagas comprobados parasitológicamente y más de mil comprobados por serología en los Estados de Oaxaca, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Morelos, Nayarit, Guanajuato, Yucatán, Veracruz, Estado de México, Sonora y Querétaro (33, 89, 90).

Sin embargo, en México la enfermedad es poco conocida y no se le ha dado la importancia necesaria, debido a la escasez de encuestas epidemiológicas que tengan por objeto localizar a) focos endémicos; b) personas que han tenido contacto con *T. cruzi*; c) individuos con susceptibilidad de contraer la enfermedad y d) transmisores infectados; conocer estos elementos es de gran importancia para evitar que aparezca la enfermedad disminuyendo así el riesgo de propaga-

ción, lo que permitiría además establecer los sistemas de control y prevención necesarios (31).

AGENTE ETIOLOGICO.

El agente etiológico de esta enfermedad es *Trypanosoma cruzi*, cuya ubicación taxonómica según Levine, 1980 (51) es:

Reino	Protista	
Subreino	Protozoa	
Phylum	Sarcomastigophora	Honigber y Balamuth
Subphylum	Mastigophora	Diesing
Clase	Zoomastigophorea	Calkins
Orden	Kinetoplastida	Honigberg
Suborden	Trypanosomatina	Kent
Familia	Trypanosomatidae	Doflein
Género	*Trypanosoma*	Gruby
Especie	*T. cruzi*	Chagas

Trypanosoma cruzi es un organismo pleomórfico en su ciclo de vida y consta de las siguientes fases:

a) Forma de amastigote.- se desarrollan en las células musculares y otros tejidos, donde se dividen por fisión binaria sucesiva agrupándose en cavidades pseudoquísticas conocidad como nidos de amastigotes. Su cuerpo es esférico a ovoide de 1.5 a 4 μm de diámetro mayor, en su citoplasma se encuentra el núcleo, el cinetoplasto con aspecto bacilar y carece de flagelo libre (fig. 1).

b) Forma de promastigote.- su aspecto es fusiforme de 14 a 20 μm de longitud y de 1.5 a 4 μm de anchura, con un núcleo central, el cinetoplasto se encuentra cerca del extremo anterior del cuerpo y el flagelo que no se encuentra

adherido al cuerpo emerge anteriormente. Esta forma se encuentra en el interior del intestino del redúvido y en medios de cultivo (fig. 2).

c) Forma de epimastigote.- su aspecto es fusiforme, con 20 a 25 μm de longitud 2 a 4 μm de anchura, su cinetoplasto es prenuclear, su núcleo es central, el blefaroplasto se encuentra cerca del núcleo, el flagelo se adhiere al cuerpo formando una membrana ondulante corta en la porción anterior para salir libre en el extremo anterior del cuerpo. En esta forma se dividen activamente en el intestino de triatominos para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, de igual forma de dividen en los medios de cultivo (fig. 3).

d) Forma de tripomastigote.- se encuentra en la proción rectal del intestino del insecto vector (tripomastigote metacíclico) y en la sangre de los mamíferos (tripomastigote sanguíneo) (fig. 4). Utilizando la técnica de Giemsa se puede evidenciar que esta forma es delgada, fusiforme, de 16 a 20 μm de longitud, 3 a 7 μm de anchura y su terminación posterior es puntiaguda. El núcleo ovalado se encuentra en posición central y se tiñe de violeta profundo a negro, posee una sola mitocondria que recorre todo su citoplasma y que presenta una zona definida llamada cinetoplasto, el cual es postnuclear, voluminoso y ovalado, se tiñe de manera similar al núcleo y representa el ADN de la mitocondria. Adyacente al cinetoplasto se encuentra el blefaroplasto puntiforme y un cuerpo parabasal, orgánulo originado del blefaroplasto con una estructura semejante al aparato con una estructura semejante al aparato de Golgi (98). El flagelo se adhiere al cuerpo formado una membrana ondulante amplia, saliendo en el extremo anterior del organismo. Esta forma de tripomastigote no se reproduce en la sangre. Generalmente cuando muere adopta la forma de C o de S y por tal razón tiene esta apariencia en los fotis teñidos (44, 49) (fig. 5).

AGENTE TRANSMISOR.

El vector de esta parasitosis es un insecto hematófago cuya ubicación taxonómica es:

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae
Género	*Triatoma*
Especie	*T. barberi* Usinger, 1939
	T. dimidiata maculipennis Stal, 1859

En México se han encontrado triatominos infectados con *T. cruzi* en casi todos sus estados, siendo el género *Triatoma* el principal transmisor, más no el único ya que se han encontrado otros géneros como *Paratriatoma*, *Dipetalogaster*, *Pastrongylus* y *Eratyrus* (89).

Los triatominos miden de 2 a 5 cm de longitud, su cuerpo es aplanado en sentido dorsoventral, de color negro a pardo, su cabeza es larga y cónica, por detrás de los ojos se localizan los ocelos y por delante de éstos un par de antenas muy delgadas. Su probóscide es larga y se encuentra doblada en ángulo agudo hacia la porción ventral del abdomen que también es alargado. Generalmente ostentan colores brillantes que van del rojo al amarillo según la especie, alternando con colores obscuros, además dorsalmente presentan un par de alas (fig. 6).

Sus hábitos son intradomiciliarios, nocturnos, algunos pueden planear sin alcanzar grandes alturas y como característica peculiar de los triatominos es defecar casi inmediatamente después de alimentarse ocurriendo más rápidamente en ciertas especies (17, 93).

CICLO DE VIDA DEL AGENTE ETIOLOGICO.

El ciclo de vida de *T. cruzi* (fig. 7) comprende dos fases: una fase en el hospedero vertebrado que se lleva a cabo en el hombre o mamíferos como armadillo, tlacuache, roedores, perro, gato, mono, etc., y otra fase en el interior del vector y son las siguientes:

I.- Fase en el hospedero vertebrado.- la mayor parte de las infecciones en el hombre y otros mamíferos sucede cuando los redívidos o transmisores se alimentan y defecan sobre la piel del huésped, en las heces depositadas van los tripomastigotes metacíclicos que penetran por la discontinuidad de la piel ocasionada por la picadura o por las escoriaciones producidas por el rascado (fig. 7 A), ya que el redúvido durante su picadura provoca una reacción debida a los componentes proteícos (anticoagulantes y anestésicos) de la saliva inyectada, produciéndose una lesión pápulo-edematosa-pruriginosa, de algunos centímetros de diámetro, dura, indolora o levemente dolorosa, circundada por un edema elástico, llamada Chagoma de inoculación. Con mayor frecuencia las formas infectantes penetran por mucosas fotadas con los dedos contaminados con las heces del redúvido y conjuntivas; en ésta última se presenta un signo que se considera patognomónico de la enfermedad llamado Signo de Romaña, que consiste en un edema bipalpebral unilaterial; elástico e indoloro, de coloración rosa violáceo.

Los mamíferos reservorios pueden infectarse por la ingestión del insecto parasitado, así como el hombre, ya que en algunos de los Estados de la República como Guerrero se ha reportado que este insecto es ingerido con fines afrodisiacos (90).

Una vez que los parásitos han penetrado, invaden los histiocitos del corion de la piel y células del tejido adiposo subcutáneo. En el momento de introducirse a las células, el parásito pierde su flagelo y membrana ondulante, redondeándose y adoptando la forma de amastigote (fig. 7 B). Dentro de estas células se reproducen activamente por fisión binaria (fig. 7 C) produciendo la muerte y lisis de la célula parasitada (fig. 7 D). Cuando los parásitos son liberados pueden seguir dos caminos: invadir células del sistema linfomonocitario (fig. 7E) o distribuirse por vasos sanguíneos o linfáticos (fig. 7 F) llegando a ganglios linfáticos axiales, inguinales y mesentéricos, pulmón, bazo, hígado, médula ósea, músculo cardiaco, cerebro, tiroides, suprarrenales, órganos sexuales y mucosa intestinal (fig. 7 G) originándose disfunción de los órganos afectados, ocasionada por la multiplicación intensiva del parásito y que puede producir la muerte. Las células se rompen y los parásitos salen a torrente circulatorio donde se pueden encontrar temporalmente en forma de tripomastigote (fig. 7 H). Estos organismos pueden volver a parasitar células del sistema linfomonocitario (fig. 7 I) o ser ingeridos por un redúvido al alimentarse de sangre humana o del vertebrado (fig. 7 J) iniciándose la segunda parte del ciclo.

II.- Fase en el vector.- en el interior del redúvido el tripanosoma irá desarrollándose intensamente en la luz del tubo digestivo y en el aparato excretor (tubos de Malpighi). Los tripomastigotes snaguíneos pasan por las fases de epimastigote donde se dividen, amastigote y promastigote capaces de originar millares de tripanosomas (fig. 7 K).

A medida que se aproxima a la porción rectal el protozoario se va diferenciando nuevamente en formas largas y flageladas (fig. 7 L) denominados tripomastigotes metacíclicos, aptas para infectar a un nuevo hospedero, iniciándose así nuevamente el ciclo (10, 19, 44).

PATOGENIA Y PATOLOGIA.

Se han descrito dos fases clínicas en la enfermedad de Chagas:

a) Fase aguda.- su duración es de 20 a 30 días, observada con mayor frecuencia en niños menores de 5 años de edad, caracterizada por el signo de entrada (Chagoma de inoculación o Signo de Romaña). Se presenta fiebre, linfoadenopatía generalizada, hepato y esplenomegalia además de afecciones cardiacas.

A medida que avanza el tiempo los síntomas se acentúan y sobreviene la muerte en dos a cuatro semanas, o bien la enfermedad se torna crónica.

b) Fase crónica.- común en adultos, aunque puede observarse en niños que han sobrepasado la fase aguda.

Los síntomas en esta fase se relacionan probablemente con los daños ocasionados en la fase aguda, además dependen de la localización del parásito; se han reportado meningoencefalitis, alteraciones cardiacas, además de señalar dilatación de colon (megacolon) y de esófago (megaesófago) como un resultado del peristaltismo desordenado ocasionado por la destrucción de ganglios autónomos de paredes viscerales.

Las formas cardiacas son las más comunes presentándose miocarditis, alteraciones en la conducción, etc., en las formas neurotróficas se presentan; afasia, paraplejía, hemiplejia, diplejia, parálisis espástica, etc.

En este estado pueden observarse paroxismos febriles, durante los cuales pueden encontrarse tripomastigotes en la sangre. Algunas veces esta etapa puede ocurrir asintomética y sólo es revelada por evidencias electrocardiográficas, radiológicas o serológicas (86).

DIAGNOSTICO.

Para realizar el diagnóstico de esta enfermedad es de suma importancia considerar los aspectos epidemiolígico, clínico y de laboratorio.

En cuanto a los antecedentes epidemiológicos, en este caso son de primordial interés investigar la residencia y procedencia de los pacientes de zonas endémicas de la infección, ya que el cuadro clínico en un principio no es claro y puede pasar inadvertido. Ante un caso sospechoso se debe apoyar el estudio con exámenes de laboratorio y gabinete.

En forma general, considerando las bases fisiopatológicas y la historia natural de la enfermedad de Chagas, el diagnóstico puede orientarse así:

- Fase aguda caracterizada por una alta parasitemia, anticuerpos inespecíficos, inicio de formación de anticuerpos específicos (IgM, IgG), se busca directamente al parásito, por exámenes seriados, en forma indirecta. Se obtiene suero para detección y seguimiento de la curva de anticuerpos específicos y hallazgo de IgM.
- Fase crónica caracterizada por baja parasitemia, presencia de algos niveles de anticuerpos específicos: serología específica. Búsqueda del parásito (métodos indirectos) en casos de serología problemática.

La demostración directa del parásito puede realizarse en gota gruesa, extrayendo sangre fresca periférica por punción digital o de la oreja, observando al microscopio el movimiento activo de los parásitos pudiendo realizarse también un frotis.

Los métodos de demostración indirecta proporcionan una alta sensibilidad pero demora en la obtención de resultados, como el xenodiagnóstico que se efectúa dejando triatominos libres de infección y criados en el laboratorio que se alimenten de sangre del paciente sospechoso de la enfermedad, si existe la infección los tripanosomas se multiplicarán rápidamente en el intestino del triatomino y un examen del contenido intestinal de éste el 10 a 15 días mostrará las formas flageladas del parásito.

El hemocultivo puede utilizarse para observar el desarrollo de los tripa-

nosomátidos en 10 a 15 días en caso de infección, usando medios de cultivo especiales como N.N.N. (Novy, Nicolle y Mac Neal) (61, 62) y otros medios difásicos.

La inoculación en animales como el ratón blanco utilizando sangre de pacientes sospechosos permiten detectar los tripomastigotes en la sangre del ratón después de diez días si la infección exista.

Las pruebas inmunológicas tienen una indicación mayor en la fase crónica de la infección, ya que las más comunes se basan en la detección de anticuerpos del tipo IgG que comienzan a aparecer en la segunda a tercera semana del período agudo. Entre las distintas técnicas de detección de IgG en la fase crónica se destacan la reacción de fijación de complemento, inmunofluorescencia, hemaglutinación y aglutinación directa, que a continuación se señalan:

La reacción de fijación de complemento (RFC) presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de los casos crónicos sintomáticos y asintomáticos.

La reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIF) es la más sensible de las reacciones serológicas, presenta excelentes resultados en diagnóstico de casos agudos y crónicos de la infección. Esta reacción se vuelve positiva en la mayoría de los casos agudos 3 ó 4 semanas antes que las otras reacciones, permitiendo la caracterización de la fase inicial de la infección y de transmisión congénita en la búsqueda de anticuerpos IgM.

La reacción de hamaglutinación indirecta se considera una técnica sensible durante la fase inicial de la infección superior a la de la reacción de fijación de complemento. En la fase crónica su sensibilidad se compara con los resultados obtenidos en la reacción de inmunofluorescencia indirecta.

La reacción de aglutinación directa es una técnica simple y rápida con buenos resultados en la fase crónica de la enfermedad.

Otras técnicas han sido introducidas para el diagnóstico de la enfermedad siendo promisorias las de inmunoperoxidasas semejante a RIF o prueba de floculación, etc. (18, 19, 73, 86, 90).

Para realizar estas pruebas serológicas se utilizan antígenos preparados con *T. cruzi*; esta preparación se utiliza a partir de 1913 cuando Guerreiro y Machado (38) prepararon un antígeno crudo por centrifugación de bazos de perros infectados, obteniendo algunos resultados positivos. Más tarde modificaron el preparado del antígeno tratando a estos extractos con alcohol y suspendiéndolos en solución fisiológica.

Kelser en 1936 (46) consideró que los antígenos preparados por Guerreiro y Machado tenían un escaso poder fijador, un alto poder anticomplementario e inestabilidad, por lo que diseñó un antígeno preparado a partir de cultivos de *T. cruzi* conocido como antígeno hidroglicerinado de Kelser que resultó ser eficaz y representó un gran avance en este campo.

A este se agregaron otras modificaciones con el fin de ir perfeccionándolo, así por ejemplo, Liem en 1938 (52) y Liem y Vanthiel en 1941 (53) recomiendan secar los tripanosomas a 37°C, usando ácido sulfúrico y conservándolo en ampolletas cerradas al vacío en el congelador.

Romaña y Dias en 1942 (75) proponen un antígeno alcohólico tratando de eliminar algunas desventajas de los antígenos acuosos, como el nivel del poder anticomplementario y poder fijador, la inestabilidad y la conservación del antígeno.

Davis en 1943 (23) diseña un nuevo procedimiento de preparación y conservación del antígeno, introduciendo el centrifugado de los medios de cultivo de *T. cruzi*, el uso del merthiolate como conservador y el congelamiento en hielo seco y metilcelosolve.

Los dos últimos antígenos mencionados se caracterizan por un buen poder fijador, escasa actividad anticomplementaria y una mayor estabilidad sobre to-

do el antígeno de Davis, el cual con ligeras modificaciones en su preparación introducidas por Muniz y Freitas en 1944 (59); Romaña y Gil en 1946 (76); Davis y Sullivan en 1946 (24); Pellegrino y Mesquita en 1947 (69); Pedreira de Freitas en 1947 (64); Pellegrino y Borrotchin en 1948 (67); Ramos, *et al* en 1951 (68) y Laranja, *et al* en 1951 (50) mostró gran eficacia al ser probado con sueros de individuos con tripanosomiasis.

Muniz y Freitas en 1944 (59) realizaron un estudio comparativo de antígenos preparados con cultivos de *T. cruzi* para la reacción de fijación de complemento, concluyendo que el preparado con merthiolate (23) permitía obtener un antígeno de alto poder fijador y estable por largo tiempo. Más tarde recomiendan una fracción polisacárida aislada de formas de cultivo por el método de Fuller (30), como antígeno para la reacción de fijación de complemento, acreditando esta fracción como un antígeno purificado de estructura sencilla, con alto poder fijador y desprovista del poder anticomplementario.

Pedreira de Freitas y Almeida en 1950 (65) ensayando con una técnica - cuantitativa diseñada por Watdsworth en 1947 (97), obtuvieron buenos resultados con un antígeno tratado con benceno y cloroformo, consiguiendo un antígeno simple, adecuado para la reacción de fijación de complemento, con escasa actividad anticomplementaria y actividad fijadora inespecífica que acentúa la capacidad fijadora específica.

Boyden en 1951 (11) introduce la prueba de hemaglutinación indirecta para el diagnóstico de la enfermedad utilizando el antígeno de Davis reportando resultados satisfactorios.

Pellegrino y Brener en 1952 (66) aislan una fracción polisacárida de acuerdo a la técnica de Fuller, esta con la propiedad de estar desprovista de actividad anticomplementaria y no fijar el complemento en presencia de sueros de pacientes con la enfermedad crónica, con reacción de fijación de complemento con

antígeno de Davis positiva, por lo que la fracción no pudo ser utilizada como antígeno.

Uvo, et al en 1954 llevaron a cabo un estudio comparativo de las técni - cas cuantitativas y cualitativas para el diagnóstico de la enfermedad de Cha - gas, concluyendo que las cuantitativas presentan las siguientes ventajas: a) estandarización de la dosis rigurosa de reactivos para la actividad óptima del antígeno; b) expresión de resultados en valores numéricos que son la reactividad de los sueros; c) alta sensibilidad en diagnóstico de formas crónicas; d) alta especificidad y e) gran estabilidad; que las ubican en un nivel más elevado que a las cualitativas, pero estas últimas por ser más simples tienen grandes ventajas sobre las primeras, sobre todo en la fase de estudio epide - miológico y su empleo a gran escala para encuestas serológicas de la enfermedad.

Stavitsky en 1954 (87) modifica la técnica de hemaglutinación indirecta introducida por Boyden en 1951.

Chaffe, et al en 1956 (20) perfeccionaron un antígeno con éter anhidro en frío usando un buffer salino. La extracción con éter redujo la tendencia del antígeno a reaccionar con sueros de individuos sanos y sifilíticos, pero no pudieron diferenciarse individuos infectados con *Leishmania brasiliensis* de aquellos con tripanosomiasis.

Cerisola y Rosenbau en 1958 (16) probaron un antígeno semejante al usado por Muniz y Freitas en 1944 (54), utilizando agua destilada para producir la lisis de los tripanosomas y nitruro de sodio al 1% como conservador mostrando ser un antígeno con menor actividad anticomplementaria y estable. Fueron probados en la reacción de fijación de complemento realizada por Eagle en 1937 (29) y Assis en 1936 (7) con las modificaciones de Deffis en 1953 (25), sustituyendo así, la técnica de Kolmer de 1945 (48) antes utilizada, con resultados muy posi-

tivos para este antígeno.

Fife y Kent en 1960 (17) a partir de tripanosomas disecados, extraen un antígeno deslipidizado compuesto de carbohidratos y proteínas con actividad específica para la realización de la prueba de fijación de complemento. En este mismo año Maekelt (55) reportó satisfactorios resultados con extractos antigénicos de formas de cultivo de *T. cruzi* tratados con benceno.

Cerisola, et al en 1962 (15) utilizaron su técnica de hemaglutinación indirecta con el antígeno preparado por Cerisola y Rosenbau en 1958 (16) con buen resultado.

Johnson en 1963 (45) fue el primero en trabajar con métodos físicos como la congelación produciendo una protección experimental efectiva en inoculación con adyuvantes en ratones para extraer los antígenos.

Casi al mismo tiempo Goble en 1963 (32) reportó algunos resultados del uso de formas de cultivo con actividad de fijación de complemento con una especificidad mejor que la mostrada por un antígeno somático deslipidizado y similar al antígeno somático proteíco descrito por Fife y Kent en 1960 (47) estableciendo que este exoantígeno es químicamente diferente a los somáticos, ya que esta compuesto por proteínas y carbohidratos con actividad antigénica, mientras que los somáticos son principalmente proteícos.

Seneca y Peer en 1966 (85) y Muniz en 1967 (58) aislaron un antígeno de formas de cultivo de *T. cruzi* lisados por sonicación.

Gónzalez-Cappa et al en 1968 (35) analizaron el efecto de la presión en la preparación de antígenos de *T. cruzi*, obteniendo buenos resultados.

Goncalves y Yamaha en 1969 (34) aislaron de extractos acuosos de *T. cruzi* un polisacárido que reaccionó positivamente en la fijación de complemento con sueros de pacientes con la enfermedad.

Camargo, et al en 1973 (14) obtuvieron componentes polisacáridos de *T. cruzi* con dilución de hidrato de cloral de epimastigotes liofilizados. Estos componentes se ligaron a un compuesto aldehídico de los eritrocitos humanos, los cuales se preservaron por congelación para la prueba de hemaglutinación.

En esta década de los setentas, las técnicas de obtención de antígenos se tornan más elaboradas, buscando la porción antigénica específica del parásito, dejando atrás los extractos deslipidizados y las fracciones subcelulares.

Segura, et al en 1974 (84) reportan que las fracciones subcelulares de epimastigotes sometidas a presión poseen actividad protectora buena y estable.

Neva y Gam en 1976 (60) probaron un antígeno a partir de *T. cruzi* desarrollados en cultivos de células, utilizando centrifugación, congelamientos y descongelamientos en la lisis del parásito, conservándolo a -20°C o liofilizado, mostrando ser sensible en la prueba de fijación de complemento.

Gottlieb en 1977 (37) aisló una fracción polisacárida de extractos agua-fenol de *T. cruzi*, preparando un antisuero en conejos inmunizados con el polisacárido y fue usado en la detacción e identificación de antígenos del parásito circulantes en sangre de ratón infectados con *T. cruzi*.

Más tarde, se purificaron antígenos más específicos con fracciones subcelulares (mitocondrias, flagelo, membranas, ribosomas) para conocer su composición bioquímica por medio de análisis electroforético e inmunoadsorción realizadas por Afchain en 1973 (1); Segura en 1974, 1975 y 1976 (81, 82, 83, 84); Texeira y Santos en 1974 (91); Guimaraes en 1974 (37); Bretaña y O'Daly en 1976 (12); Vankateson en 1977 (95); Pereira en 1978 (70) y Afchain, et al en 1978 (2).

Weisz-Carrington y Nussenzweig en 1979 (99) utilizaron tres cepas de *T. cruzi* para demostrar si los antígenos de superficie de membrana fijaban el complemento, utilizando radioinmunoensayo e inmunofluorescencia en presencia de sueros de ratón y humanos y dos cepas lo fijaron.

Scott y Snary en 1979 (79) aislaron una glicoproteína de la membrana de *T. cruzi* utilizándola en la inmunización de ratones combinada con adyuvante, demostrando la producción de anticuerpos.

Anthony, et al en 1981 (3) aislaron dos antígenos de *T. cruzi* y *T. rangeli*, de membrana y citoplasma dando buenos resultados en la prueba de inmunofluorescencia.

Araujo, et al en 1982 (5) prepararon anticuerpos monoclonales contra *T. cruzi* para aumentar la eficacia en la captura de antígenos de *T. cruzi*.

Scharfstein, et al en 1983 (80) purificaron una glicoproteína de extractos de *T. cruzi* reconocida por anticuerpos de pacientes con enfermedad de Chagas, los anticuerpos se aislaron por cromatografía de afinidad estableciéndose un sistema antígeno-anticuerpo útil para el diagnóstico de este padecimiento.

Los tres años siguientes a 1983, las técnicas de diagnóstico, han sido altamente refinadas para lograr una mayor especificidad en la unión del complejo antígeno-anticuerpo y de esta forma conseguir mayor precisión en las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento (4, 56, 63).

Planteamiento del problema.

Aunque en la actualidad se cuenta con trabajos sobre la preparación de antígenos de *Trypanosoma cruzi* con alta especificidad para realizar las pruebas de fijación de complemento y hemaglutinación indirecta (57), la elaboración de estos antígenos no esta al alcance de todos los laboratorios de serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, debido a la utilización de técnicas muy costosas. El diagnóstico de esta enfermedad en México se realiza con antígenos importados de Argentina principalmente,pudiéndose presentar problemas en cuanto a las variaciones antigénicas de las cepas de *T. cruzi*. Por tal motivo en este trabajo se obtuvieron antígenos metabólicos y somáticos de cuatro cepas mexicanas de *T. cruzi* al final de la fase exponencial de su crecimiento para determinar de que se cepa se obtendrá el antígeno ideal en las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en México.

Objetivos

- Obtener antígenos metabólicos y somáticos de *Trypanosoma cruzi* de cuatro cepas mexicanas a partir de su cultivo en medio de Nakamura.

- Determinar la actividad inmunológica de los antígenos metabólicos y somáticos obtenidos de las cepas Cocula (Jalisco), Juanita (Veracruz), Querétaro (Querétaro) y Santo Domingo (Oaxaca) en las reacciones de fijación de complemento y hemaglutinación indirecta.

Material y Métodos

1) *Trypanosoma cruzi*.

Cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi*: Cocula (Jalisco), Juanita (Veracruz), Querétaro (Querétaro) y Santo Domingo (Oaxaca), fueron utilizadas en el trabajo (tabla I). Se tomaron del cepario existente en el laboratorio de Parasitología, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M., que - furon aisladas de triatominos y son mantenidas en medios de cultivo N.N.N.

2) MEDIOS DE CULTIVO.

A) Medio N.N.N. [Novy, Mac Neal (62); Nicolle (61)]. Se utilizó en el mantenimiento de las cepas, control de esterilidad, viabilidad, inoculación en medio de Nakamura y preparación del inóculo de inmunización en conejas.

Agar nutritivo	14 g
NaCl	6 g
Agua c.b.p.	900 ml

Se esteriliza a 15 lb por 15 minutos, se deja enfriar aproximadamente a 36°C, se agrega la sangre homogenizando, se vacía en tubos estériles (3 a 5 ml) se deja solidificar y se agrega solución Ringer como medio de suspensión de los parásitos y para evitar la desecación del medio sólido.

B) Medio de Nakamura (77). Se utilizó para la obtención de los antígenos y para la realización de la curva de crecimiento de cada cepa de *T. cruzi*.

Extracto de hígado	20 g
NaCl	8 g
Na_3PO_4	20 g
KCl	8 g
Agua c.b.p.	1000 ml
Sangre humana	1000 ml

Se vacia en tubos de diálisis Spectrapor (6000 - 8000 P.M.) a manera de salchicha, se introduce en matraces de un litro y se coloca como sobrenadante solución salina isotónica.

3) CURVA DE CRECIMIENTO.

El crecimiento de *T. cruzi* se detrminó en base al número de organismos viables (con movimiento) utilizando la cámara de Neubauer. Las muestras (1 ml) se obtuvieron de matraces de 250 ml con medio de Nakamura previamente homogenizado, con una población inicial de 6500 organismos/ml.

4) OBTENCION DE ANTIGENOS METABOLICOS (fig. 8).

La obtención de antígenos metabólicos de *T. cruzi* se realizó de acuerdo al método de Toriello y Mariat (92) para el hongo *Sporothrix schenckii*. Los cultivos con organismos al final de la fase logarítmica de crecimiento se trataron con merthiolate 1:10000, fueron centrifugados a 27000 X g por 25 minutos. El sobrenadante se filtró primero por Seitz y luego se esterilizó por medio de membranas Millipore de 0.45 m. En seguida se dializó contra agua destilada por 24 horas a 4°C, en tubos de diálisis Spectrapor (6000 - 8000 P.M.). El antígeno se concentró con sacarosa hasta un décimo de su volumen inicial, dializándose nuevamente y conservándose a -5°C hasta su utilización.

5) OBTENCION DE ANTIGENOS SOMATICOS (fig. 9).

La obtención de antígenos somáticos de *T. cruzi* fue simultánea a la de los metabólicos. Los parásitos obtenidos por centrifugación fueron lavados tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril. Se tomaron 20 mg y se le agregaron 5 g de perlas de vidrio estériles (0.45 - 0.5 mm diámetro) y 2.5 ml de SSI estéril. Se rompieron en vortex por 30 segundos tres veces y todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C (42). El rompimiento de los parásitos se verificó por microscopia óptica (95%).

Las perlas de vidrio fueron eliminadas por centrifugación a 2700 X g. Luego se volvió a centrifugar a 27000 X g, el sobrenadante se dializó por 24 horas a 4°C, se liofilizó y se conservó en congelación a -5°C hasta su utilización.

6) METODOS QUIMICOS.

A todos los antígenos se les determinaron proteínas por el método de Lowry (54) y carbohidratos totales por el método del fenol sulfúrico de Dubois (28).

7) METODOS INMUNOLOGICOS.

Obtención de sueros hiperinmunes.

Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda, hembras de aproximadamente 3 Kg de peso siguiendo el esquema de Diehl y Risby (27). Se preparó una suspensión de epimastigotes muertos con merthiolate 1:10000, lavados, aproximadamente 2×10^7 organismos/ml en proporción 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (72). Se aplicó 2 ml de esta suspensión intraperitonealmente a las conejas, una vez cada dos semanas durante 8 semanas. Se tomaron muestras de sangre cada semana, el suero se separó y se guardó en alícuotas de 3 ml con ázida de sodio al 0.01% en congelación (-5°C).

Pruebas inmunológicas.

Se realizó una cinética de inmunización con el suero de las conejas cada semana, utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta, para determinar el momento de mayor producción de anticuerpos.

Los antígenos metabólicos y somáticos obtenidos fueron titulados con suero control positivo de un paciente argentino con enfermedad de Chagas y comparados con un antígeno gentilmente donado por la Dra. Segura de la República de Argentina. Posteriormente estos antígenos se titularon y valoraron con los

sueros de las conejas inmunizadas por la técnica de hemaglutinación indirecta según Avrameas (8) y fijación de complemento según Habel y Salazman (41).

Resultados

Las curvas de crecimiento de la fase epimastigote de las capas de *Trypanosoma cruzi* correspondientes a las cepas Cocula, Juanita, Querétaro y Santo Domingo se pueden observar en la figura 10. En la curva de crecimiento de la cepa Cocula, se notó que el mayor número de organismos en mivimiento se encontraba en los días 31 y 32; en la cepa Juanita el día 28; en la cepa Querétaro los días 28 y 29 y en la cepa Santo Domingo los días 24 y 25. La obtención de los complejos antigénicos se realizaron al final de la fase exponencial de cada cepa, para la cepa Cocula el día 29, para la cepa Juanita el día 26, para la cepa Querétaro el día 26 y para la cepa Santo Domingo el día 22. Los contenidos de proteínas y carbohidratos totales (CHO) de los antígenos somáticos y metabólicos de cada cepa se muestran en las figuras 11 y 12. Estos resultados son el promedio de tres determinaciones para cada cepa. La concentración de carbohidratos en m/ml fue mayor en los antígenos metabólicos que en los somáticos (fig. 11). Los antígenos metabólicos de la cepa Juanita contienen una concentración inferior significativa de carbohidratos en comparación con los antígenos de las otras cepas. La relación CHO/proteínas en los antígenos metabólicos varió de 5/1 para la cepa Cocula, 1/3 para la cepa Juanita, 4/1 para la cepa Querétaro y 3/1 para la cepa Santo Domingo.

En los antígenos somáticos se observó una mayor concentración de proteínas que de carbohidratos, encontrándose en la cepa Juanita un incremento significativo en comparación con las demás cepas. La relación CHO/proteínas fue 1/5 para la cepa Cocula, 1/27 para la cepa Juanita, 1/4 para la cepa Querétaro y 1/6 para la cepa Santo Domingo (fig. 12).

El rendimiento de los antígenos metabólicos fue de 150 ml para cada cepa

a partir de 9 litros de medio de cultivo (1.66%) y para los antígenos somáticos fue de 1.5 g a partir de 20 g de parásitos (7.5%).

Para probar la reactividad de los antígenos, se inmunizaron dos conejas para cada cepa. Se realizó una curva de inmunización con el fin de conocer el día de mayor producción de anticuerpos (tabla II).

La prueba serológica utilizada fue la de hemaglutinación indirecta empleando el antígeno control de Argentina con título de 1:64.

Para la cepa Cocula el título más elevado (1:256) se obtuvo a los 17 días del inicio de la inmunización (fig. 13); para la cepa Juanita al día 62 (1:256), después de la tercera inmunización (fig. 14); para la cepa Querétaro los días 42 (1:256) y 62 (1:256) después de la tercera inmunización (fig. 15) y para la cepa Santo Domingo los días 42 (1:128) y 75 (1:128) después de la tercera y cuarta inmunización (fig. 16).

Conociendo el título de los sueros de las conejas inmunizadas se titularon los antígenos metabólicos y somáticos obtenidos, aplicando las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento (tablas III y IV).

En la prueba de hemaglutinación indirecta el mayor título se consiguió con el antígeno metabólico de la cepa Querétaro (1:256) y luego el de la cepa Juanita (1:128). Al utilizar el antígeno somático para esta misma prueba, los títulos más elevados correspondieron a estas mismas cepas (Juanita 1:128 y Querétaro 1:128) (tabla III, fig. 17).

En la prueba de fijación de complemento, con el antígeno metabólico se reportó el título más elevado con la cepa Juanita (1:128). El antígeno somático se comportó igual (Juanita 1:128) siguiéndole los antígenos metabólicos de las cepas Cocula y Santo Domingo (1:64) (tabla IV, fig. 18).

Las cepas que menor título dieron en ambas pruebas fueron Cocula y Santo Domingo tanto en los antígenos metabólicos como en los somáticos.

Discusión

En la actualidad existe un gran número de trabajos sobre la obtención de antígenos de *Trypanosoma cruzi* encaminados a encontrar la porción glicoproteíca específica con alta actividad antigénica para la detección de anticuerpos en pacientes con enfermedad de Chagas (56, 57, 79), sin embargo, en México los estudios al respecto son muy escasos por no considerarse a esta enfermedad como un problema de salud pública. Actualmente, en el trabajo de Salazar, et al de 1983 (78), se demuestra la existencia del agente infectante, reservorios naturales y del transmisor, así como estudios de la virulencia de las cepas mexicanas del parásito comparables con los resultados sudamericanos (78), surgiendo la necesidad en nuestro país de realizar un estudio consciente y detallado sobre dicha enfermedad y para esto se considera fundamental la obtención de antígenos de cepas mexicanas que se traduzca en un eficiente diagnóstico serológico para la realización de encuestas epidemiológicas que conlleven al conocimiento real del problema de la tripanosomiasis en la República Mexicana.

Como antígenos de *T. cruzi* se han utilizado desde extractos de órganos parasitados (38) hasta cultivo de células (60), pasando por la utilización de medios difásicos semisintéticos (61, 62, 77) ya que no se ha logrado diseñar el medio sintético ideal para el cultivo de tripanosomátidos por desconocerse él o los componentes sanguíneos esenciales involucrados en el desarrollo de los parásitos.

El medio de Nakamura utilizado en el desarrollo de *T. cruzi* en este estudio proporcionó la facilidad de separar a los parásitos del medio de cultivo por ser dializable, lo que además es favorable a la elaboración del antígo-

no del parásito sin componentes de alto peso molecular que puedan intervenir como sustancias inespecíficas.

Cabe hacer mención, que en un principio fue difícil el cultivo del parásito en este medio por ser de fácil contaminación. Además de realizarse diferentes experimentos para determinar la temperatura óptima de crecimiento del parásito encontrándose a 36°C,la que no corresponde a lo que reportan la mayoría de los trabajos, cuya temperatura ideal es de 26 a 27°C; y lo mismo sucedió con el pH de la solución salina del medio, el cual tuvo que ser ligeramente básico (pH 7.6). Es importante señalar, que en la búsqueda de una técnica más accesible, elaboramos el extracto de hígado y poder establecer una comparación de éste con el extracto comercial, encontrando el mismo rendimiento, por lo cual al utilizar nuestro producto se disminuyó el costo de la elaboración de este medio en la producción de antígenos.

Como descrito previamente, existen a la fecha diferentes preparaciones antigénicas que han dado buenos resultados en las pruebas inmunológicas,sin embargo estas son producto de técnicas demasiado laboriosas y costosas,además de sofisticadas (4,9, 56, 57,63).

En nuestro trabajo para poder obtener componentes antigénicos con metodología sencilla, poco costosa y con resultados uniformes se empezó por determinar las curvas de crecimiento del parásito, para que preparaciones antigénicas posteriores, siempre se obtengan de la misma fase de crecimiento y por consiguiente los antígenos pueden ser más uniformes.

Es interesante hacer notar que el mejor rendimiento de microorganismos/ml fue de la cepa Juanita (fig. 10), la que también dió los antígenos con mejores resultados en las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento. Para la obtención de los antígenos se utilizaron parásitos del final de la fase logarítmica, tomando como referencia los trabajos sobre pro-

ducción de antígenos de hongos (6), se observó que efectivamente en esta fase se obtenían los mejores antígenos antes que el parásito empezara a sufrir una autólisis y por consiguiente, los productos de ésta intervinieran desfavorablemente como componentes de la fracción antigénica.

Se observó que todas las cepas alcanzaban esta fase entre los días 22 y 32 de su crecimiento (fig. 10) aunque con diferente número de organismos. El tiempo de aislamiento del parásito del triatomino y su cultivo en el laboratorio no fueron factores determinantes en el crecimiento de estas cepas, ya que la cepa Cocula cuenta con un tiempo mayor de aislamiento, tuvo un crecimiento mayor que la cepa Querétaro que fue recientemente aislada.

En este trabajo se obtuvieron dos tipos de antígenos: metabólicos y somáticos, los primeros ricos en carbohidratos (fig. 11) y los segundos ricos en proteínas (fig. 12), para establecer una comparación y encontrar el que proporcionaba los resultados más satisfactorios en las pruebas de serodiagnóstico y poderlo aplicar en las zonas endémicas de la enfermedad con una técnica de preparación sencilla a bajo costo.

Los primeros exoantígenos aislados de cultivos por Tarrant (88) mostraron tener una actividad fijadora de complemento mejor que la mostrada por los antígenos somáticos deslipidizados y los antígenos somáticos proteícos. Estos resultados nos decidieron a elaborar antígenos metabólicos para compararlos con los somáticos y comprobar si ocurría lo mismo con nuestras cepas. Sin embargo en la prueba de fijación de complemento ambos antígenos (metabólicos y somáticos) dieron el mismo resultado.

Las técnicas de obtención de antígenos parasitarios han sido variadas y mejoradas sin llegar al establecimiento de un patrón,ya que todas ellas presentan tanto ventajas como desventajas. Utilizamos por lo tanto una técnica di-

ferente probada satisfactoriamente en hongos por Toriello y Mariat (92), y que no había sido utilizada con *T. cruzi*, y que tenía las ventajas de fácil elaboración y bajo costo. Sabiendo que los metabolitos responsables de la actividad antigénica en *T. cruzi* se inactivan a 28°C (36) el proceso proporcionó la ventaja de trabajar a 4°C evitándose así este problema.

En cuanto a los antígenos somáticos se han realizado diversos estudios desde que Kelser en 1936 (46) inició esta preparación. Sin embargo, esta técnica todavía es llevada a cabo en muchos laboratorios a pesar de que algunos autores han introducido diferentes modificaciones para la ruptura del parásito. En este trabajo dicha ruptura se llevó a cabo con perlas de vidrio empleada por Romaña y Gil en 1946 (76) proporcionando un método de bajo costo y sencillo (42) sin utilizar aparatos especializados no accesibles a cualquier laboratorio.

Con respecto a la valoración del contenido proteíco de nuestros antígenos, la proporción observada en los antígenos somáticos concuerda con lo ya reportado, donde se establece que del 43-55% del peso seco de *T. cruzi* es proteína, encontrando una pequeña proporción de glucosa y trehalosa (22). Los antígenos metabólicos en su valoración de carbohidratos muestran un valor significativamente alto lo que podría corresponder al catabolismo de carbohidratos principalmente de glucosa descrito por Gutteridge en 1975 (40).

Los antígenos de la cepa Juanita se comportaron de diferente manera en relación con las otras cepas en cuanto a sus propiedades bioquímicas siendo su porcentaje de proteínas elevado tanto en el antígeno somático como en el metabólico y esto se reflejó en las pruebas serológicas aplicadas donde proporcionó los mejores resultados.

Con respecto a la inmunización de las conejas se pudo observar que la cepa Querétaro resultó ser la más inmunogénica, ya que el título de los sue-

ros obtenidos en estos animales fue mucho más elevado que con las otras cepas.

Las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento han sido reconocidas como procedimientos sencillos y específicos para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, por lo cual se eligieron en este trabajo.

La hemaglutinación indirecta se propone como un técnica de rutina conveniente por la preservación y sensibilización de los eritrocitos con glutaraldehído (13) con resultados más constantes y reproducibles que cuando son sensibilizados con ácido tánico, razón por la cual utilizamos eritrocitos sensibilizados con glutaraldehído. En esta prueba, los antígenos metabólicos y somáticos de la cepa Juanita y Querétaro dieron los mejores resultados aún comparados con el antígeno de Argentina. así mismo, los resultados obtenidos sugieren que el antígeno somático de la cepa Santo Domingo es inadecuado para el serodiagnóstico de la enfermedad, ya que siempre dió títulos muy bajos - (fig. 17).

La prueba de fijación de complemento fue considerada por mucho tiempo como la única prueba serológica para detectar la enfermedad de Chagas. Todavía es considerada altamente específica para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*, pero su desarrollo la hace difícil para llevarla a cabo fuera de un laboratorio especializado, sobre todo en hospitales de áreas rurales (71). Sin embargo,la probamos por su tradicional uso y sensibilidad en la valoración de nuestros antígenos,encontrando que los antígenos metabólicos y somáticos de la cepa Juanita dieron los mejores y más altos títulos aún comparados con el antígeno de Argentina. La comparación entre este último con los antígenos metabólicos de la cepa Cocula y Santo Domingo y somático de la cepa Querétaro no presentó ninguna diferencia.

Es interesante hacer notar que las fracciones antigénicas con mejores resultados en todas las pruebas inmunológicas realizadas, fueron aquellas obtenidas de las cepas recién aisladas de triatominos, lo que concuerda con los resultados de diversos autores con fracciones antigénicas de hongos (43).

Conclusiones

Después de analizar los resultados obtenidos, encontramos que el medio de Nakamura resultó ser el más apropiado para el cultivo de las cepas estudiadas de *Trypanosoma cruzi*.

Se propone utilizar la prueba de hemaglutinación indirecta a gran escala en los hospitales rurales, ya que se considera como una técnica de fácil elaboración, que brinda la obtención de resultados relativamente rápidos y uniformes.

Sería importante, que este trabajo marcara la pauta para que se inicien en un futuro cercano estudios seroepidemiológicos exhaustivos de las zonas endémicas que permitan establecer la magnitud del problema de salud que representa la enfermedad de Chagas en nuestro país, sin que la falta de un método de laboratorio adecuado para el diagnóstico serológico obstaculice dicho propósito. De llevarse a cabo esto, proponemos que la cepa Juanita que mostró un alto rendimiento en cuanto al número de organismos y cantidad de proteínas, así como su estabilidad comprobada en las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento, sea la que se utilice en la preparación de un antígeno de amplia distribución.

Por último, conociendo que los antígenos obtenidos son eficientes en el serodiagnóstico, sugerimos que se haga una caracterización de los componentes glúcidos y proteícos de nuestras cepas, ya que observamos que cada una de ellas tiene un comportamiento antigénico diferente.

Lista de tablas

Tabla I. Origen de las cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en la obtención de antígenos metabólicos y somáticos para las pruebas de hemaglutinación indirecta y fijación de complemento.

Tabla II. Títulos de anticuerpos obtenidos en conejas inmunizadas por hemaglutinación indirecta de las cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* estudiadas.

Tabla III. Titulación de antígenos metabólicos y somáticos de *Trypanosoma cruzi* por hemaglutinación indirecta al 100% de hemólisis.

Tabla IV. Titulación de antígenos metabólicos y somáticos de *Trypanosoma cruzi* por fijación de complemento al 100% de no hemólisis.

Tabla I. Origen de las cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en la obtención de antígenos metabólicos y somáticos para las pruebas de Hemaglutinación indirecta y Fijación de complemento.

Cepa *Trypanosoma cruzi*	Vector	Localidad
Cocula	*Triatoma phyllosoma* (Burmeister 1835)	Jalisco
Juanita	*Triatoma dimidiata* (Latreille 1811)	Veracruz
Querétaro	*Triatoma barberi* Usinger 1939	Querétaro
Santo Domingo	*Triatoma barberi* Usinger 1939	Oaxaca

Tabla II. Títulos de anticuerpos obtenidos en conejos inmunizados por Hemaglutinación indirecta de los cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* estudiadas.

Tiempo de inmunización (días)	Cepa Cocula	Cepa Juanita	Cepa Querétaro	Cepa Santo Domingo
0	—	—	—	—
7	—	1:16	1:2	1:2
8	1:16	—	—	—
17	1:256	—	—	—
18	—	1:128	1:4	1:2
24	1:128	—	—	—
26	—	1:32	—	1:2
35	1:16	1:64	1:128	1:64
42	—	1:32	1:256	1:128
44	1:4	—	—	—
53	—	—	1:128	—
57	1:2	—	—	—
62	—	1:256	1:256	1:64
75	—	1:256	1:128	1:128

_____ Máximo título obtenido

Tabla III. Titulación de antígenos metabólicos y somáticos de *Trypanosoma cruzi* por Hemaglutinación indirecta al 100 % de hemólisis.

Cepa *Trypanosoma cruzi*	Título del antígeno metabólico.	Título del antígeno somático.
Cocula	1:32	1:64
Juanita	1:128	1:128
Querétaro	1:256	1:128
Santo Domingo	1:64	1:4

Tabla IV. Titulación de antígenos metabólicos y somáticos de *Trypanosoma cruzi* por Fijación de complemento al 100 % de no hemólisis.

Cepa *Trypanosoma cruzi*	Título del antígeno metabólico.	Título del antígeno somático
Cocula	1:64	1:32
Juanita	1:128	1:128
Queretaro	1:32	1:64
Santo Domingo	1:64	1:8

Lista de figuras

Figura 1. A. Amastigotes. B. Nido de amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 2. Promastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 3. A. Epimastigotes en heces de triatomino. B. Rosetas de epimastigotes en medio de cultivo N.N.N.

Figura 4. A. Tripomastigote metacíclico en heces de triatomino. B. Tripomastigote sanguíneo.

Figura 5. Estructura de tripomastigote.

Figura 6. Agente vector *Triatoma barberi*.

Figura 7. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 8. Obtención de antígenos metabólicos de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 9. Obtención de antígenos somáticos de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas de *Trypanosoma cruzi* en medio de Nakamura.

Figura 11. Concentración de carbohidratos totales y proteínas en antígenos metabólicos de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 12. Concentración de carbohidratos totales y proteínas en antígenos somáticos de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 13. Cinética de inmunización en conejas Nueva Zelanda de la cepa - Cocula. Técnica de hemaglutinación indirecta.

Figura 14. Cinética de inmunización en conejas Nueva Zelanda de la cepa - Juanita por la técnica de hemaglutinación indirecta.

Figura 15. Cinética de inmunización en conejas Nueva Zelanda de la cepa - Querétaro por la técnica de hemaglutinación indirecta.

Figura 16. Cinética de inmunización en conejas Nueva Zelanda de la cepa - Santo Domingo por la técnica de hemaglutinación indirecta.

Figura 17. Títulos de antígenos metabólicos y somáticos de cada cepa de *Trypanosoma cruzi* al 100% de hemólisis en la prueba de hemaglutinación indirecta.

Figura 18. Títulos de antígenos metabólicos y somáticos de cada cepa de *Trypanosoma cruzi* al 100% de no hemólisis en la prueba de fijación de complemento.

A

B

Figura 1. A. Amastigotes B. Nido de amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
Cortesía Dr. Jorge Tay Zavala.

A

B

Figura 3. A. Epimastigote en heces de Triatomino.
B. Rosetas de epimastigotes en medio de cultivo N.N.N.
Cortesía Dr. Jorge Tay Zavala.

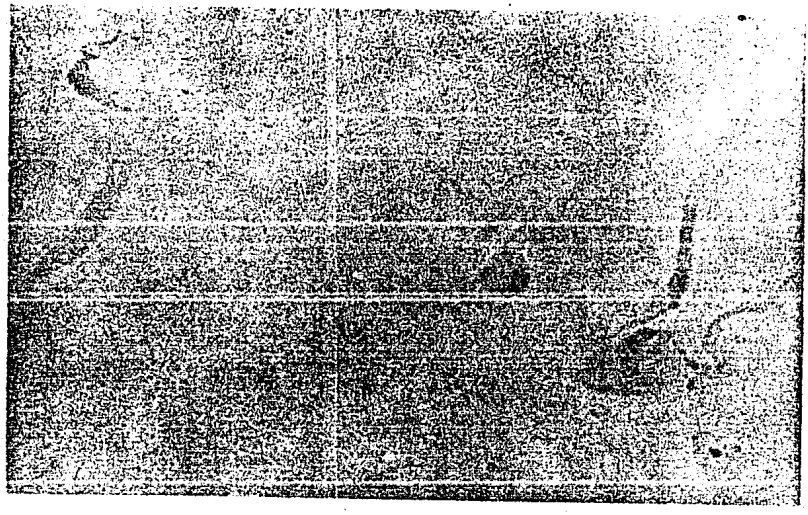


Figura 2. Promastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
Cortesía Dr. Jorge Tay Zavala.

B

Figura 4. A. Tripomastigote metacíclico en heces de Triatomino.
B. Tripomastigote sanguíneo.
Cortesía Dr. Jorge Tay Zavala.

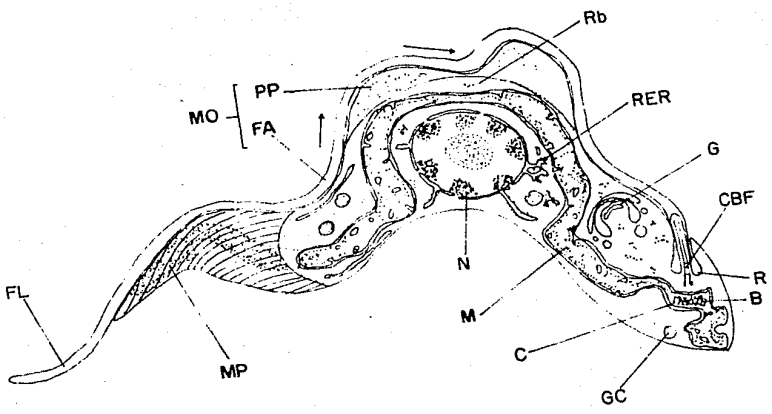


Figura 5. Estructura de Tripomastigote. Vickerman. 1972 (96)

B blefaroplasto
C cinetoplasto
CBF cuerpo basal del flagelo
FA flagelo adherido
FL flagelo libre
G Golgi
GC Gránulo citoplásmicos
M Mitocondria
MO Membrana ondulante
MP Microtúbulos de la película
N Núcleo
PP Pliegue de la películas
R Reservorio
Rb Ribosomas
RER Retículo endoplásmico rugoso

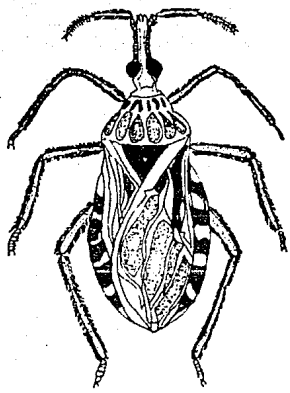


Figura 6. Agente vector. *Triatoma barberi*

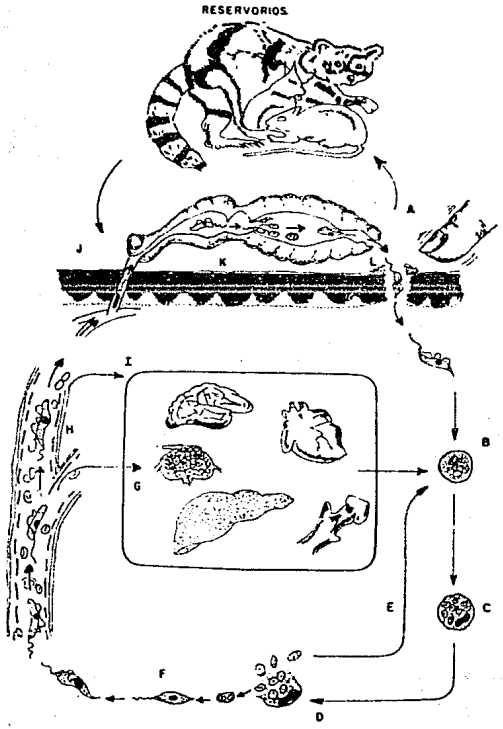


Figura 7. Ciclo de vida. Trypanosoma cruzi

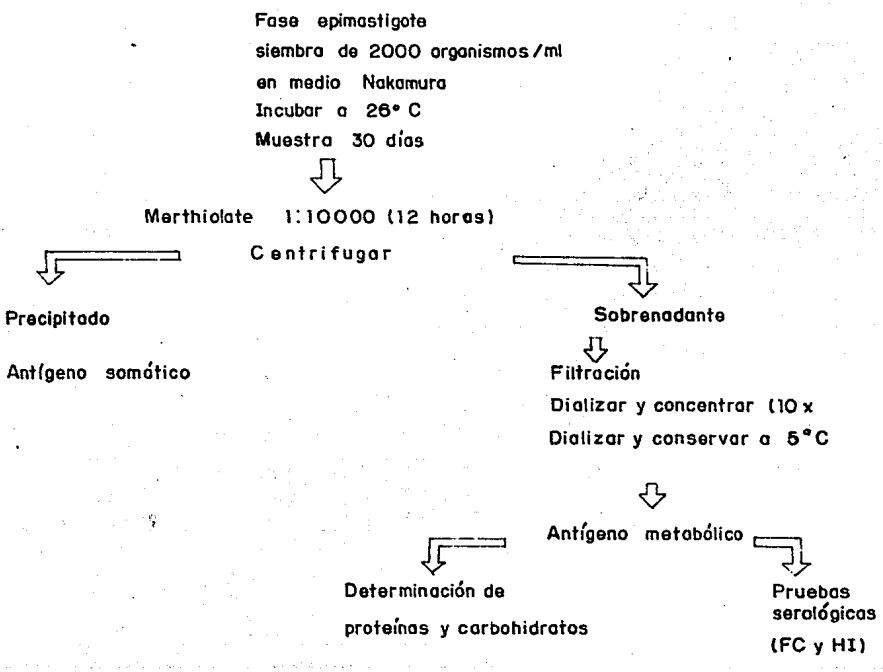


Figura 8. Obtención de antígenos metabólicos de *Trypanosoma cruzi*.

FC = Fijación de complemento.

HI = Hemaglutinación indirecta.

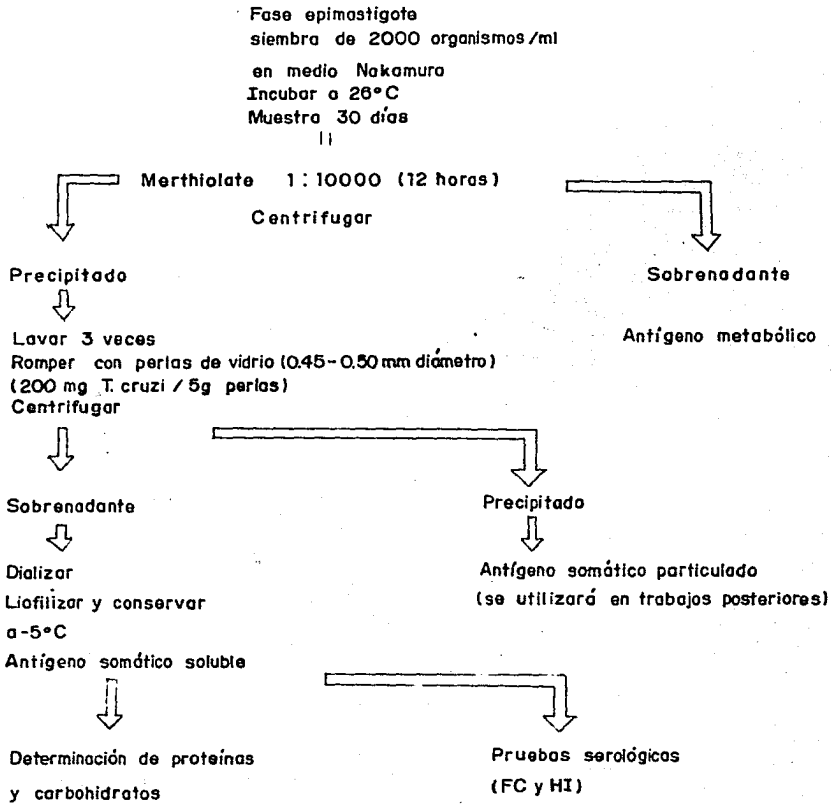


Figura 9. Obtención de antígenos somáticos de *Trypanosoma cruzi*.

FC = Fijación de complemento
HI = Hemaglutinación indirecta

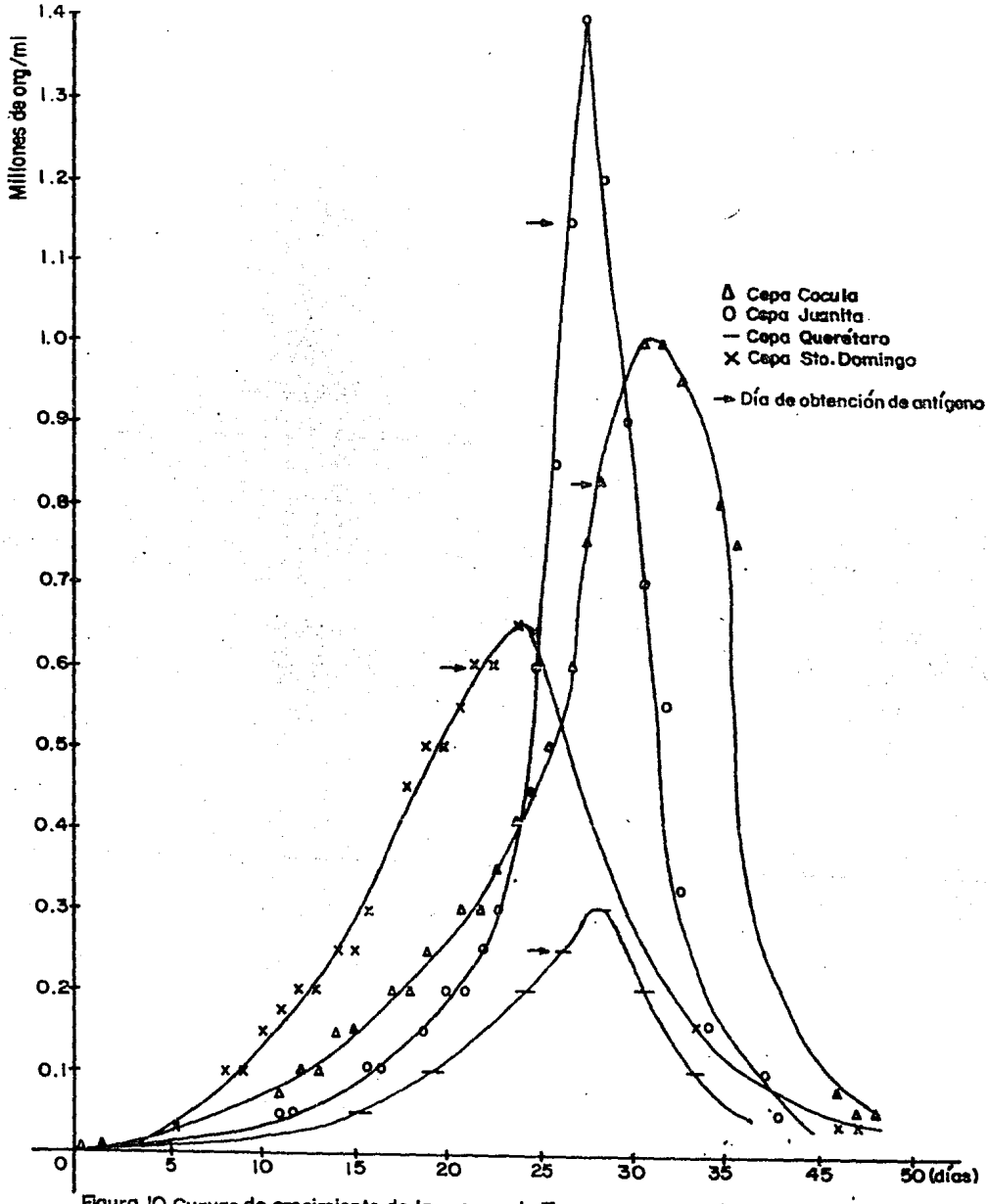


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas de Trypanosoma cruzi en medio de Nakamura

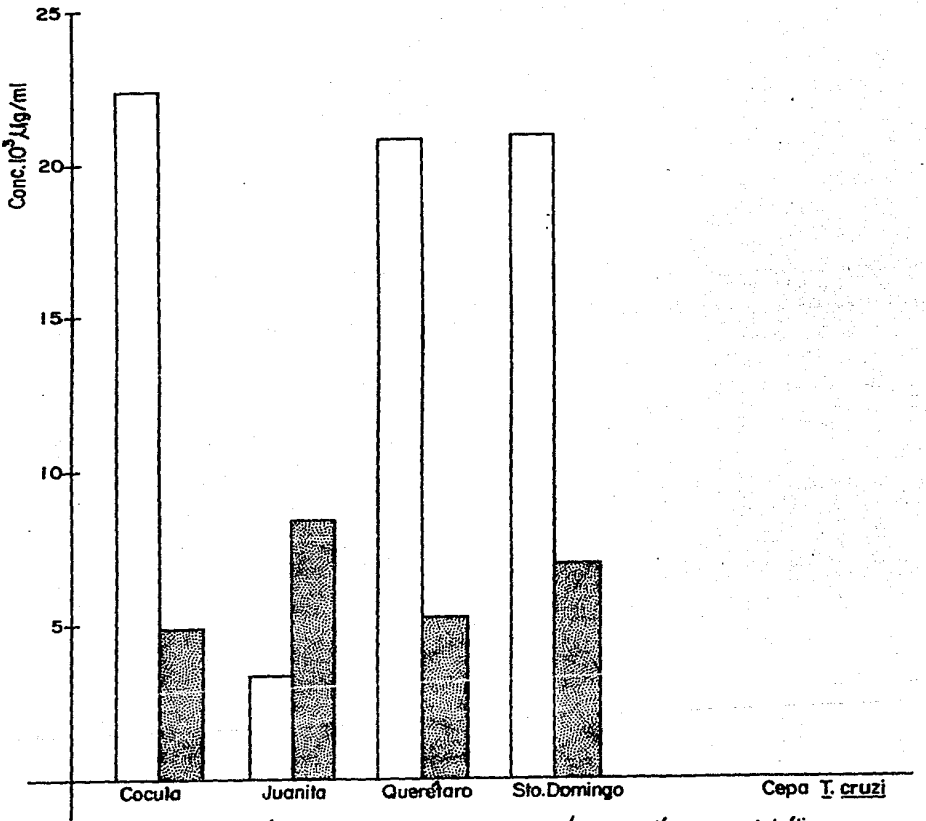


Figura 11 Concentración de carbohidratos totales y proteínas en antígenos metabólicos de las diferentes cepas de Trypanosoma cruzi

□ carbohidratos ▨ proteínas

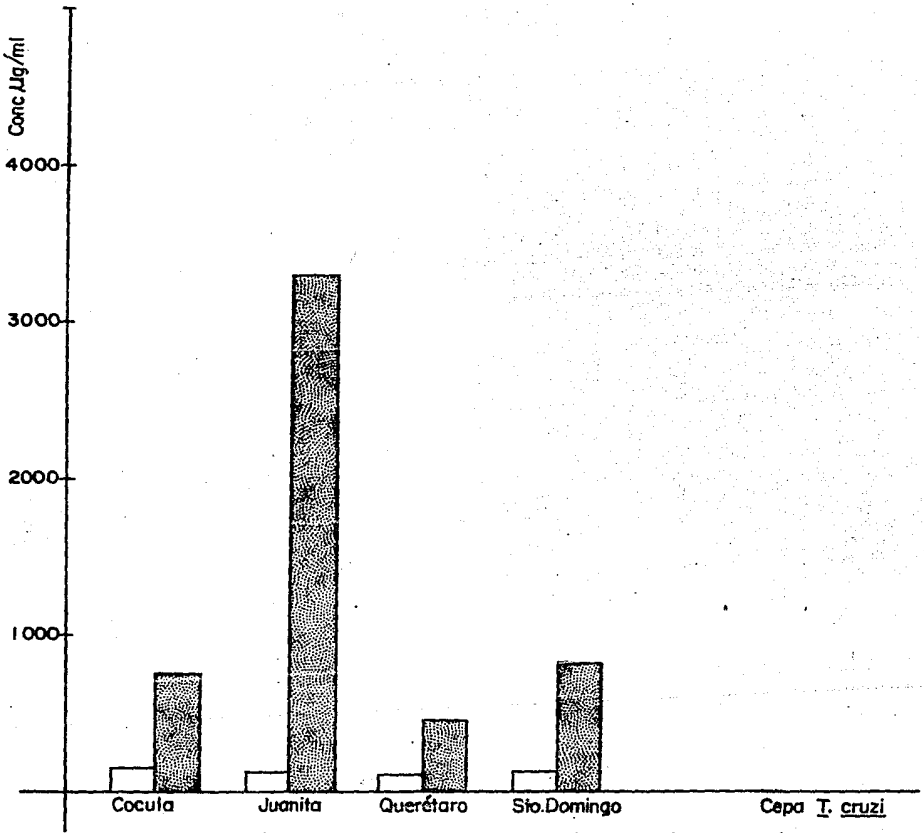
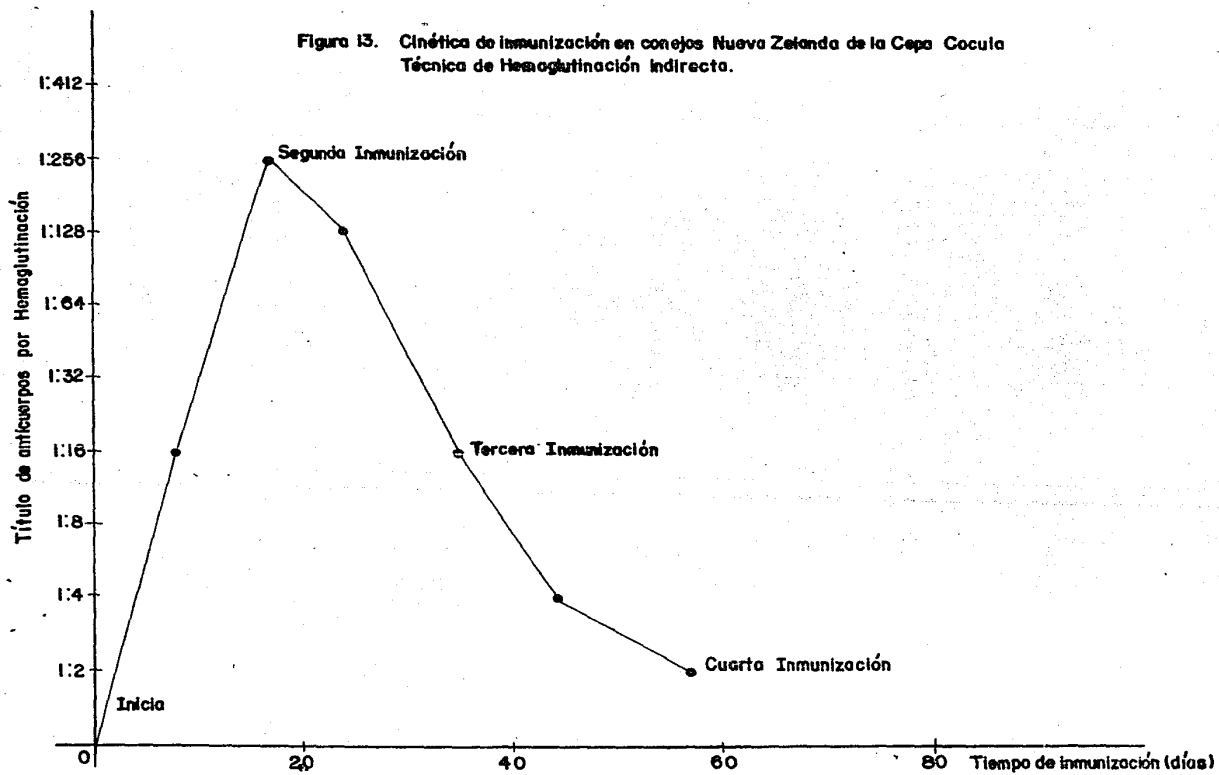


Figura 12. Concentración de carbohidratos totales y proteínas en antígenos somáticos de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*

□ carbohidratos ▨ proteínas

Figura 13. Cinética de inmunización en conejos Nueva Zelanda de la Cepa Cocula
Técnica de Hemaglutinación indirecta.



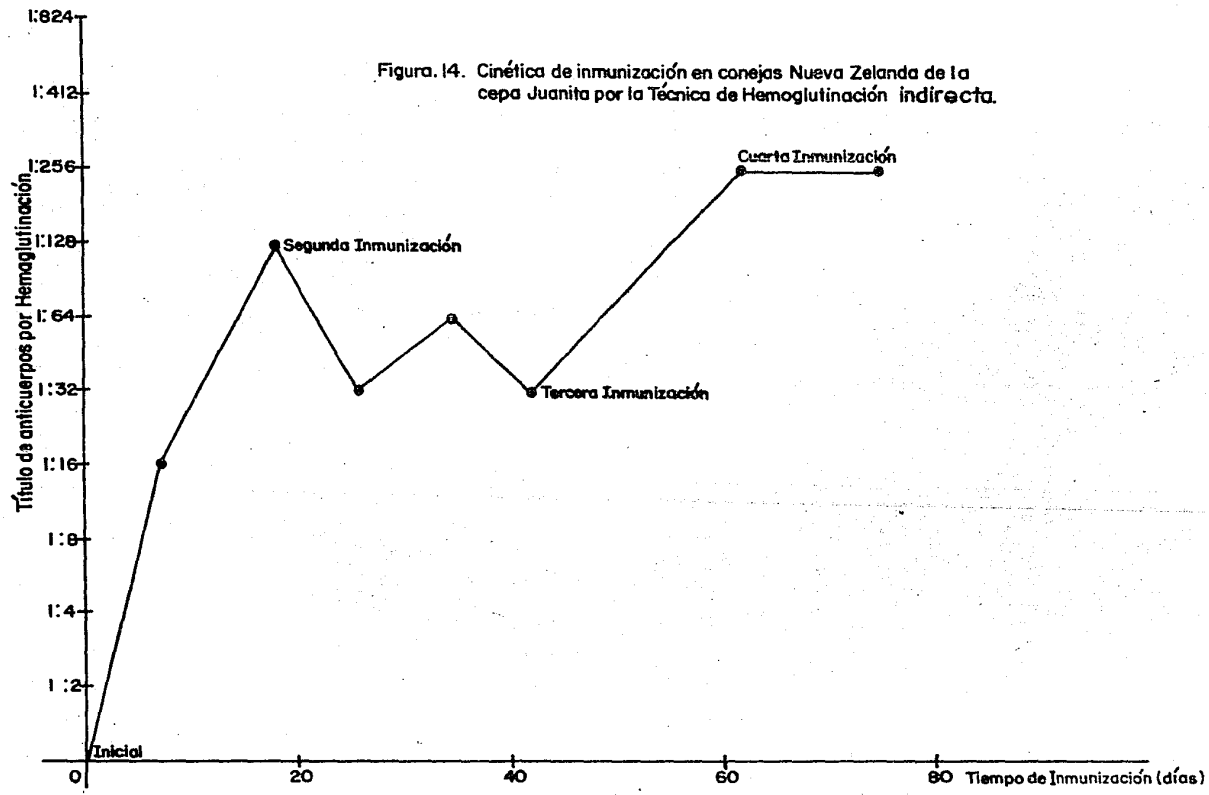
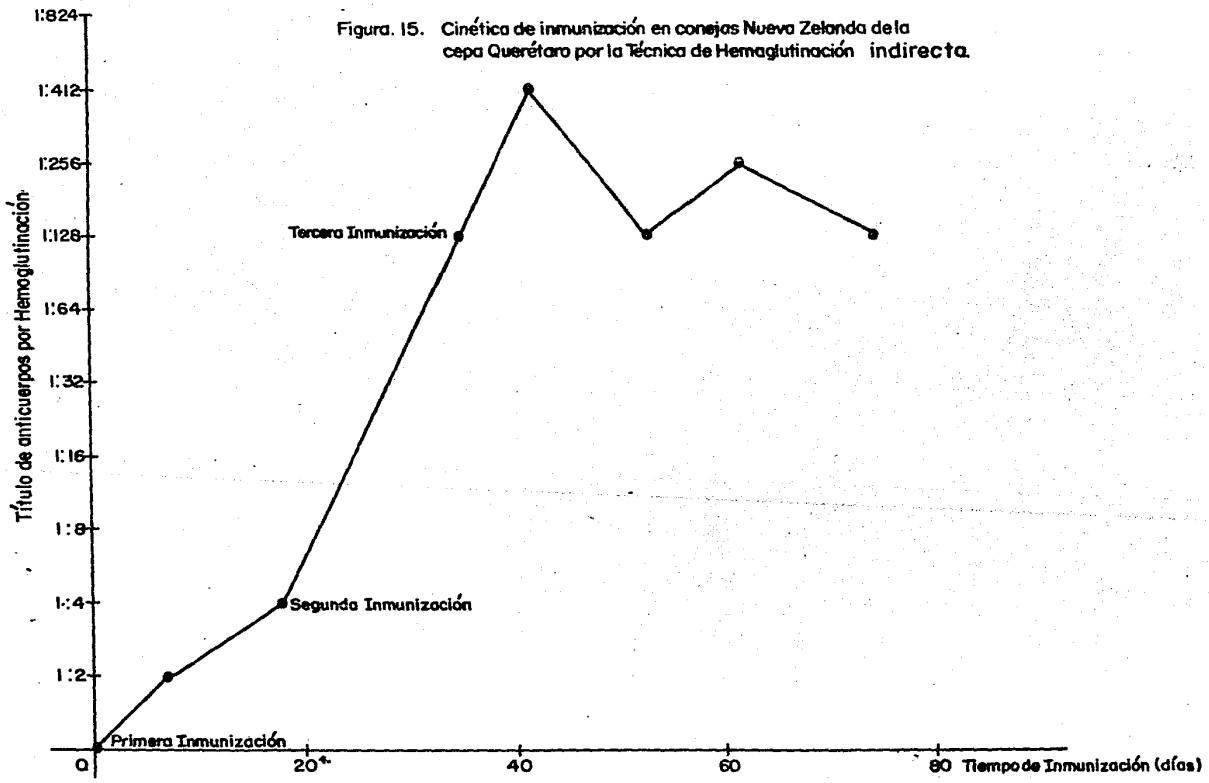


Figura. 14. Cinética de inmunización en conejos Nueva Zelanda de la cepa Juanita por la Técnica de Hemoglutinación indirecta.

Figura. 15. Cinética de inmunización en conejos Nueva Zelanda de la cepa Querétaro por la Técnica de Hemaglutinación indirecta.



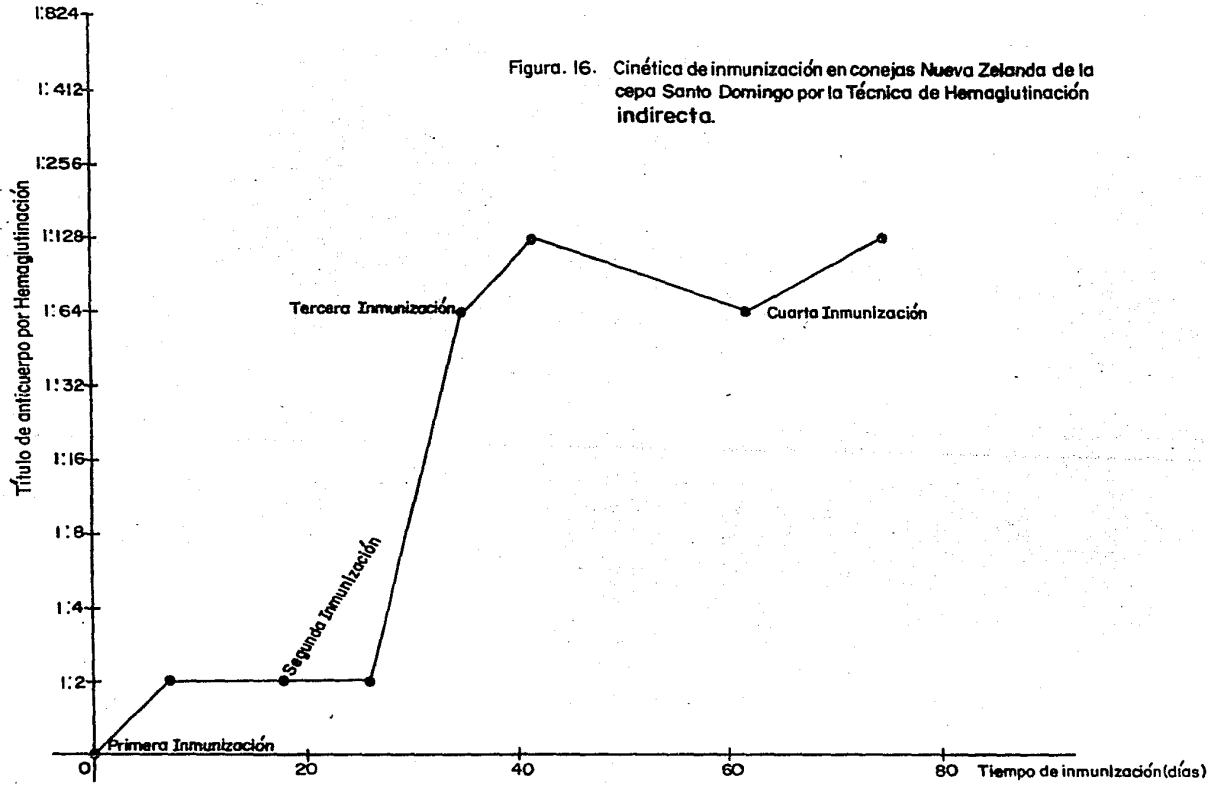


Figura. 16. Cinética de inmunización en conejas Nueva Zelanda de la cepa Santo Domingo por la Técnica de Hemaglutinación indirecta.

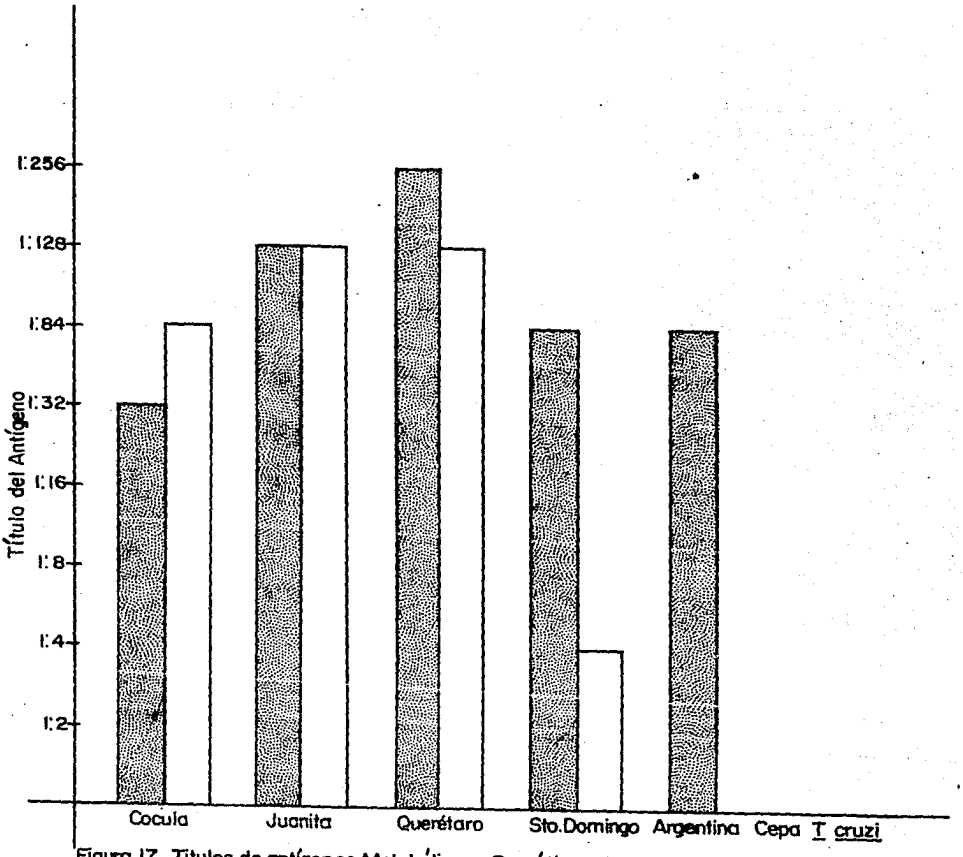


Figura.17 Titulos de antígenos Metabólicos y Somáticos de cada Cepa de Trypanosoma cruzi al 100% de hemólisis en la prueba de Hemoglutinación Indirecta.

☐ Antígeno Metabólico ▩ Antígeno Somático

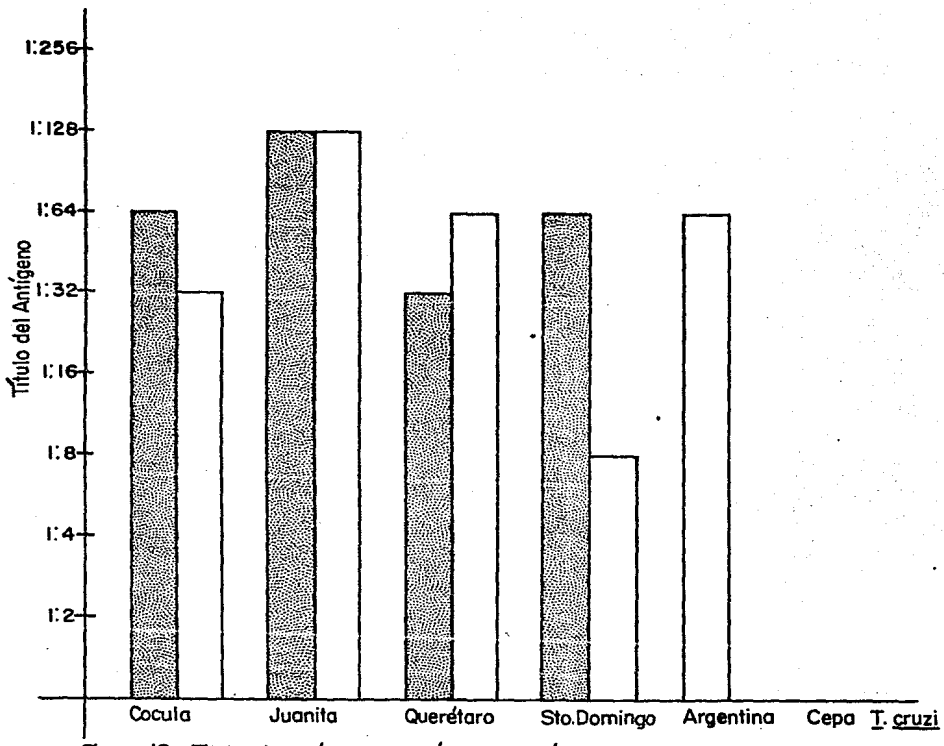


Figura. 18 .Titulos de antígeno Metabólicos y Somáticos de cada Cepa de Trypanosoma cruzi al 100% de no hemólisis en la prueba de Fijación de Complemento.

Antígeno Metabólico Antígeno Somático

Glosario

Afasia.- (del gr. aphasie:in., apahia). Término general para el trastorno, efecto o pérdida de la facultad de expresión, hablada, escrita, o mímica, a causa de una lesión de los centros cerebrales; imposibilidad por consiguiente, de comprender las imágenes receptivas (auditivas y escritas) - de la palabra y de encontrar las imágenes motoras y gráficas, aún conservándose las funciones de los aparatos periféricos sensoriales (vista y oído) y motores (mano, lengua, labios, etc.).

Bipalpebral.- correspondiente al párpado superior e inferior del ojo.

Diplejia.- (de di y el gr. plegué-.golpe). Parálisis que afecta partes iguales a cada lado del cuerpo; parálisis bilateral.

Edema.- (del gr. oidema, hinchazón). Acumulación excesiva de líquido seroal - buminoso en el tejido celular debido a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por reducción de las proteínas; aumento de la presión hidrostática en los capilares por insuficiencia cardiaca; mayor permeabilidad de las paredes capilares u obstrucción de las vías linfáticas. La hinchazón producida se caracteriza por conservar la huella de la presión del dedo.

Esplenomegalia.- (de spleno y del gr. megas, megale, mega, grande). Aumento de volumen o hipertrofia del bazo.

Hemiplejia.- (del gr. hemiplexia, del hemi- medio y plessein, herir, golpear). Parálisis de un lado del cuerpo.

Hepatomegalia.- (de hepato- y el gr. megas, megale, mega, grande). Aumento de volumen del hígado.

Linfoadenopatía.- Tumor formado de tejido linfoide o adenoide con tendencia a - la generalización.// Tumor de un ganglio linfático por causas diversas.

Pápulo.- (del lat. papula). Elevación eruptiva pequeña, sólida y circunscrita de la piel; termina ordinariamente por descamación;es una de las lesiones elementales de la piel.

Parálisis espástica.- Variedad caracterizada por la rigidez muscular y exal - tación de los reflejos tendinosos.

Paroxismo febril.- (del gr. paroxismos, de paraynein, irritar). Máxima intensidad de un acceso febril, ataque de los síntomas de una enfermedad. Exacerbación súbita de la temperatura corporal.

Pruriginosa.- (del lat. pruriginosus, que siente picor o comezón). De la naturaleza del prurigo o que lo produce.

Unilateral.- Corresponde a un solo lado, derecho o izquierdo del cuerpo.

Bibliografía

1.- Afchain,D., D. Le Ray, A.Capron y J. Jadin. 1973. Analyse antigenique compareê par inmunoélectrophorese des formes de culture de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et Leishmania donovani. Conséquences taxonomiques et diagnostiques. Protistol.,9 : 213-220.

2.- Afchain,D., J.Fruit, L.Yarzaba y A.Capron. 1978. Purification of a specific antigen of Trypanonoma cruzi from culture forms. Am.J.Trop.Med.Hyg., 27:

3.- Anthony,R.L., T.S.Cody y N.T.Constantine. 1981. Antigenic differentation of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli by means of clonal hy bridoma antibodies. Am.J.Trop.Med.Hyg., 30: 1192 - 1197.

4.- Araujo,F.G. y J.S. Remington. 1981. Characterization of stages and strains of Trypanosoma cruzi by analysis of cell membrane components. J. Immunol. 123 : 855 - 859.

5.- Araujo,F.G., S.D.Sharma y Van Tsaí. 1982. Monoclonal antibodies to stages of Trypanosoma cruzi: Characterization and use for antigen detection.- Infect.Immunol., 37 : 344 - 349.

6.- Areanas,G. y C.Toriello. 1986. Actividad immunologica de antígenos miceliales y lavaduriformes de diferentes fases de crecimiento de Sporothrix schenkii. Rev.Mex.Mic., 2 : 125 - 130.

7.- Asis,A. 1936. Técnica de fixacao do complemento na syphilis. Arch.Hyg., 6 : 49.

8.- Avrameas, S. 1969. Coupling of enzymes to proteins with gluteraldehyde. Use the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochem., 6 : 43 - 52.

9.- Bertolini,M.C. y F.L.De Lucca. 1981. In vitro transfer of Trypanosoma cruzi antigen reactivity to nonsensitized mouse lymphoid cells with poly (A) containing RNA. Med.Sci., 9 : 736.

10.- Biagi,F. 1985. Parasitología Médica. 2a. ed. Francisco Méndez. México. pp: 105 - 128.

11.- Boyden,S.V. 1951. The adsorption of Proteins on erytrocytes treated with tannic acid and subsequent haemaglutination by means antiprotein sera. J. Exp.Med. 93 : 107 - 120.

12.- Bretaña,A. y J.A. O'Daly. 1976. Utaken of fetal proteins by Trypanosoma cruzi. Inmunofluorescence and ultraestructural studies. Int.J.Parasitol., 6 : 379 - 386.

13.- Camargo,E.M. 1975. Serologyc Diadnosis of Chagas' Haemaglutination with preserved, senzitized cells, a practical test for routine serologic dignosis of American trypanosomiasis. Rev.Inst.Med.S.Paulo, 15 : 81 - 85.

14.- Camargo,M.E., S.Hoshino y G.R.V.Siqueira. 1973. Haemaglutination with with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. Rev.Int.Med.S.Paulo, 15 : 81 - 85.

15.- Cerisola,J.A., M.Fatala-Chaben, J.C.Lazzari. 1962. "Test" de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. P.Med.Arg., (34): 1761-1767.

16.- Cerisola,J.A. y M.B.Rosembaum. 1958. La reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. I Técnica. P.Med.Arg. , 45 : 1454 - 1463.

17.- Cova,G.P. 1974. Principios Generales de Entomología. Fundación Venezolana para la salud y la educación. Caracas. pp: 166 - 178.

18.- Craig,C.F. y E.C.Faust. 1974. Parasitología Clínica. Salvat. México. pp: 107 - 116.

19.- Cruz,L.O. 1979. Parasitología. Universal. México. pp: 159 - 173.

9.- Bertolini,M.C. y F.L.De Lucca. 1981. In vitro transfer of Trypanosoma cruzi antigen reactivity to nonsensitized mouse lymphoid cells with poly (A) containing RNA. Med.Sci., 9 : 736.

10.- Biagi,F. 1985. Parasitología Médica. 2a. ed. Francisco Méndez. México. pp: 105 - 128.

11.- Boyden,S.V. 1951. The adsorption of Proteins on erytrocytes treated with tannic acid and subsequent haemaglutination by means antiprotein sera. J. Exp.Med. 93 : 107 - 120.

12.- Bretaña,A. y J.A. O'Daly. 1976. Utaken of fetal proteins by Trypanosoma cruzi. Inmunofluorescence and ultraestructural studies. Int.J.Parasitol., 6 : 379 - 386.

13.- Camargo,E.M. 1975. Serologyc Diadnosis of Chagas' Haemaglutination with preserved, senzitized cells, a practical test for routine serologic dignosis of American trypanosomiasis. Rev.Inst.Med.S.Paulo, 15 : 81 - 85.

14.- Camargo,M.E., S.Hoshino y G.R.V.Siqueira. 1973. Haemaglutination with with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. Rev.Int.Med.S.Paulo, 15 : 81 - 85.

15.- Cerisola,J.A., M.Fatala-Chaben, J.C.Lazzari. 1962. "Test" de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. P.Med.Arg., (34): 1761-1767.

16.- Cerisola,J.A. y M.B.Rosembaum. 1958. La reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. I Técnica. P.Med.Arg. , 45 : 1454 - 1463.

17.- Cova,G.P. 1974. Principios Generales de Entomología. Fundación Venezolana para la salud y la educación. Caracas. pp: 166 - 178.

18.- Craig,C.F. y E.C.Faust. 1974. Parasitología Clínica. Salvat. México. pp: 107 - 116.

19.- Cruz,L.O. 1979. Parasitología. Universal. México. pp: 159 - 173.

20.- Chaffee,E.F., E.H.Fife.Jr. y J.F.Kent. 1956. Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection by complement fixation. Am.J.Trop.Med.Hyg., 5: 763 - 771.

21.- Chagas,C. 1909. Nova trypanosomiasis humana, Estudios sobre a morfología e o ciclo de nova entidade de morbida da homen. Mem.Inst.Oswaldo Cruz,I: 159 - 218.

22.- Cheng,C.T. 1978. Parasitología General. 2a.ed. A.C. pp: 137 - 165.

23.- Davis,D.J. 1943. An improved antigen for Complement fixation test for American Trypanosomiasis. Publ. Health. Rep., 58 : 775 - 777.

24.- Davis,D.J. y T.S.Sullivan. 1946. Complement fixation test for American Trypanosomiasis in Texas. Publ.Health.Rep., 61 : 1083 - 1084.

25.- Deffis,M. 1953. Una técnica para reacción del complemento. Triduo de la As. Bioq.Arg.6: 22-25.

26.- Dias,E., F.S.Laranja y J.Pellegrino. 1950. Inquérito Clínico-epidemiológico sobre doenca de Chagas feito entre as estacoes de Iguatama a Campos Altos, Oeste de Minas Gerais. Prim.Reun.Panam. sobre enf. Chagas. 1 : 33 - 34.

27.- Diehl,J.E. y E.L.Risby. 1974. Serum changes in rabbits experimentally infeeted with Trypanosoma gambiense. Am.J.Trop.Med.Hyg., 23 : 1019 - 1022.

28.- Dubois,M. K.Giles, K.Hamilton, P.A.Reber y F.Smith. 1951. A colorimetric method for the detection of sugars. Nat., 168 : 167.

29.- Eagle,R. 1937. Laboratory Diagnosis of Shyphilis. Mosby C. S. Louis. pp: 21 - 25.

30.- Fuller,A.T. 1938. The foramide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. Brit.J.Exp.Path., 19: 130 - 139.

31.- García,RVM. 1979. Estudio serológico de la enfermedad de Chagas utilizando muestras de sangre en papel filtro. Tesis profesional. Fac. Química U.N.A.M. México.

32.- Goble,F.C. 1963. Vaccination againts experimental Chagas' disease with homogenates of culture forms of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 59 (suppl) : 19.

33.- Goldsmith,R.S. et al.1971. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. Bol. of Sanit. Panam., 46: 500 - 518.

34.- Goncalves,J.M. y T. Yamaha.1969. Inmunochemical polysaccharide from Trypanosoma cruzi. Am.J.Trop. Med.Hyg., 72 : 39.

35.- González-Cappa,S.M. et al.1968. Complement fixation test. Skin test and experimental inmunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Am.J.Trop.Med.Hyg. 17 : 709 - 715.

36.- González-Cappa,S.M. 1975. Antigenic Variation, Antigenic typing, Exoantigens, and prospects for vaccines. Am.Tryp.Res.Sc.Pub.Braz. (318) : 170 - 172.

37.- Gottlieb M. 1977. A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. J.Inmunol. 119 : 465-470.

38.- Guerreiro,C. y A.Machado. 1913. A Reaccao de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Nota preliminar. Braz. Med., 27 : 225.

39.- Guimares,M.C.S., V.L.Giovanninni y M.E.Camargo.1974. Analytical poly-acrylamide gel electrophoresis of aqueous Trypanosoma cruzi extracts. I Chemicals and inmunological components. Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo, 16 : 182 - 188.

40.- Gutteridge,E.W. 1975. Biochemistry of Trypanosoma cruzi. Am.Tryp.Res. Sc.Pub.Braz.,(318):135-143.

41.- Habel,K. y N.P.Salazman. 1969. Fundamental Techniques in Virology. (modificado por Schmidt,M.J.) Academic Press. 263 pp.

42.- Hazen,K.C. y J.E.Cutler. 1982. Optimal conditions for breaking medically important yeast by an inexpensive and simple method. Mycopatholo. 80 : 112 - 116.

43.- Huppert,M. 1983. Antigens used for measuring inmunological reactivity. In: Haward D.H.(Eds). Fungi pathogenic for human and animals. Vol. 3. Marcel Dekker. Nueva York. 490 pp.

44.- Jeffrey,L. y M.Leach. 1975. Atlas of Medical Heminthology and Photozoology. 2a.ed.Churchill Livingstone. Edinburg. 270 pp.

45.- Johnson,P., et al. 1963. Protective effect of killed trypanosome vaccines incorporated adjuvants. Nat. 200 : 83

46.- Kelser,R.A. 1936. A complement-fixation test for Chagas disease employing an artificial culture antigen. Am.J.Trop.Med.,16: 405 - 415.

47.- Kent,J.F. y E.H.Fife.Jr. 1960. Protein and Carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi. J.Trop.Med.Hyg.9.: 512-517.

48.- Kolmer,J.A. y F.Boener. 1945. Aproved Laboratory Technic. D.Apleton Century. USA. 621 pp.

49.- Kreier,P.J. 1977. Parasitic Protozoa, Taxonomy Kinetoplastids and flagellates of fish.Vol I. Academic Press. New York. pp: 340 - 345.

50.- Laranja,F.S. E.Dias. E.Duarte y J.Pellegrino. 1951. Observacoes clínicas e epidemiológicas sobre a moléstia de Chagas no oeste de Minas Gerais. O Hosp., 40 : 945 - 988.

51.- Levine,N.D. et al. A newly revised clasification of the Protozoa. J.Protozool., 27 : 37 - 58.

52.- Liem,S.D. 1938. Onderzoeckingen over Triatoma infestans als overbrener van elkele pathogene-organismen en ever de complement-bindingreactie by de ziekte van Chagas. Tese.In.Trop.Dis.Bull., 35 : 719 - 720.

53.- Liem,S.D. y P.H.Van Thiel. 1941. The complement fixation test for Chagas' disease employing a dried culture antigen. Acta Leidensia. 15-16: 259 - 274.

54.- Lowry,O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr y R.J.Randall.1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-275.

55.- Maekelt,G.A. 1960. Die komplementbindungensreaktion der Chagas krankheit. Z. Tropenmed. Parasitol., 11 : 152 - 186.

56.- Marcipar,A.J., E.Lentwojt, E.Segard,.et al.1982. Peanut agglutinin affinity chromatography of Trypanosoma cruzi glycoproteins. Parasitc. Immunol. 4 : 109 - 115.

57.- Morel;M.C. 1984. Genes and Antigens of Parasites. 2a.ed. UNDP/World Bank/Qho. Río de Janeiro. pp: 331 - 335.

58.- Muñiz,J. 1967. Contribucao para un melhor conhecimiento da acao patogenica do T.cruzi no organismo humano. O. Hosp., 72 : 29 - 54.

59.- Muñiz,J. y G. Freitas. 1944. Contribuicao para o diagnóstico da doenca de Chagas pelas reacoes de aglutinacao e de fixacao do complemento. Mem.Inst.Oswaldo Cruz,41: 303-333.

60.- Neva,A.F. y A.A.Gam. 1971. A complement fixing antigen from Trypanosoma cruzi grown in cell cultures. Am.J.Trop.Med.Hyg. 26 : 37 - 45.

61.- Nicolle,C. 1908. Culture de parasite de parasite du bouton d'Orient. Comp.Rend.Acad.Sci. Paris., (146) : 842 - 843.

62.- Novy,F.G. y W.S.Mac. Neal. 1904. On the cultivation of Trypanosoma brucei. J.Infect.Dis. (1): 1 - 30.

63.- Pearson,T.W., S.K.Kar, T.C.Mc.Guire. y L.B.Lundin. 1981. Trypanosome variable surface antigens; studies using two dimensional gel electro phoresis and monoclonal antibodies. J.Immunol. 126 : 823 - 828.

64.- Pedreira de Freitas,J.L.P. 1947. Contribuicao para o estudio do diagnóstico de moléstia de Chagas por processos de laboratorio. Tese.Sao.Paulo, 160 pp.

65.- Pedreira de Freitas,J.L.P. 1950. Oservacoes sobre a estabilidae de antigenos de culturas de Trypanosoma cruzi para reacoes de fixacae do complemento. O Hosp., 38 : 513 - 519.

66.- Pellegrino,J. y Z.Brener. 1952. A recao de fixacao do complemento do doenca de Chagas. III observacoes sobre as propiedades do fracao polissacaridea isolada de formas de cultura do Schizotrypanum cruzi. E. Complement fixation in Chagas disease. O Hosp., 42 : 553 - 559.

67.- Pellegrino,J. y J.Borrotchin. 1948. Inquérito sobre a doenca de Chagas no Hospital de Santa Casa de Misericórdia de Belo horizonte (Minas Gerais, Brasil). Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 46 : 419 - 457.

68.- Pellegrino,J., J.Borrotchin, G.Leite, y Z.Brener. 1951. Inquérito sobre a doenca de Chagas en candidatos a doadores de sangue. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, 49 : 555 - 564.

69.- Pellegrino,J. y S.S.Mesquita. 1947. A reacao de fixacao do complemento na doenca de Chagas. Nota sobre falsas reacoes positivas e duvidosas feitas con antigeno de cultura do Schizotrypanum cruzi en soros conservados en geladeira. Braz. Med., 61 : 396 - 401.

70.- Pereira,N.M., S.L.Timm, S.C.G.Da Costa, M.A.Robello y W.Souza. 1978. Trypanosoma cruzi: isolation and flagellar fraction. Exp. Parasitol. 46 : 225 - 234.

71.- Petana,B.W., y P.H.Willcox. 1975. Data on the comparative serology for Chagas' disease. Am.Trip.Res.Sc.Pub.Braz., (318) : 292 - 293.

72.- Philip,L.C. 1982. Inmunología y serología.2a.ed.Prensa Médica Mexicana. Mex.D.F. 518pp.

73.- Pinto,D.J. 1984. Enfermedad de Chagas. Programa de Salud Humana. Buenos Aires. 106 pp.

74.- Ramos,J., J.L.P.Pedreira de Freitas y S.Borges. 1949. Molestia de Chagas. Estudio Clínico e epidemiológico. Arq.Braz.Cardiol., 2 : 111 - 162.

75.- Romaña,C. y E.Dias. 1942. Reacao do complemento na doenca de Chagas con antígeno alcoólico de Schizotrypanum cruzi. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, 37 : 1 - 10.

76.- Romaña,C. y J.Gil. 1946. Reacción de Fijación de complemento con antígeno de cultura de S. cruzi en 500 sueros humanos. An.Inst.Med.Reg.Tucumán, 1 297 - 304.

77.- Salazar,S.P.M.-I.Haro. 1986. Manual de Técnicas para el diagnóstico morfológico de los parásitos. Francisco Méndez Cervantes. México. pp. 135-137, 142 - 151.

78.- Salazar,S.P.M. et al. 1983. Enfermedad de Chagas en México. Rev.Fac.Med. Mex. 26 : 15 - 51.

79.- Scott,M.T. y D.Snary. 1979. Protective inmunization of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nat. 282: 72 - 74.

80.- Scharfstein,J., M.M.Rodrigues, C.A.Alves,. et al 1983. Trypanosoma cruzi. Description of a higly purified surface antigen defined by human antobodies. J.Inmunol., 131 : 972 - 976.

81.- Segura, E.L. 1975. Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. II Flagelar and menbrane fractions. J.Protozool. 24 : 540 - 543.

82.- _____. 1976. Experimental Chagas disease: Protective activity in relation to subcellular fractions of the parasiten. P.Parasitol. 62:131-133.

83.- _____., J.M.Campos, A.B.Ducatenzeiler, y J.A.Cerisola,. 1975. Antígenos de las fracciones subcelulares de Trypanosoma cruzi. I Localización de antígenos y proteínas en las fracciones subcelulares. Med. 35 : 451 - 459.

84.- _____., E.N.Cura, I.Paulone, C.Vazquez, y J.A.Cerisola. 1974. Antigenic make-up of cubcellular-fractions of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 21 : 571 - 574.

85.- Seneca,H. y P.Peer, 1966. Inmunobiological properties of Chagas toxin (lipopolysaccharide). Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 60 : 610.

86.- Sierra,J. 1982. Enfermedad de Chagas. Infectol. 2 : 287 - 292.

87.- Stavitsky,A.B. 1954. Micromethods for the study of proteins and antibodies. J.Inmunol.72:360-367.

88.- Tarrant,C.M. et al.1965. Serological characteristics and general chemical of T.cruzi.J.Parasitol. 51 : 277 - 285.

89.- Tay,Z.J. et al. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal.Pub.Mex. XXII:409-450.

90.- Tay,Z.J. et al. 1984. Parasitología Médica. Francisco Méndez C. México. pp: 105 - 127.

91.- Texeira,A.R.L. y C.A.Santos Buch. 1974. The inmunology of experimental Chagas' disease. I Preparation of Trypanosoma cruzi antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Inmunol. 113: 859 - 869.

92.- Toriello,C. y F.Mariat. 1974. Etude compareé des polyasides des champignons Ceratocystis stenoceras et Sporothrix Schenkii. Composition chimique et analyse inmunologique. Ann.Microbiol. (Inst.Pasteur). 125 A : 287 - 307.

93.- Usinger,R.L. 1974. The triatiminae of North and Central America and the West Indies and the west indies and their public health significance. Pub.Health.Bull.pp:8-27.

94.- Uvo,D., A.Aguiar, S.Carvahal, N.Paladino,N.V.Soubine.1954. Estudio comparativo dos resultados da R.F.C., para diagnóstico da moléstia de Chagas obtidos com a realizacao das técnicas qualitativas e quantitativas. Folia.Clin.Biol., 22 : 85.

95.- Venkatesan,S., R.G.Bird y W.E.Ormerod. 1977. Intercellular enzymes and the localization in alender and stumpy forms of Trypanosoma brucei rhodesiense. Int.J.Parasitol. 7 : 139 - 147.

96.- Vickerman,K. 1972. The Protozoa. John Murray Albermate Street. London. pp:24.

97.- Wadsworth,A.B. 1947. Standar Methods of the Division of laboratories and Research of the New York state department of health. The Williams and Wilkins Co. 691 pp.

98.- Weisz,B.P. 1978. La Ciencia de la Zoología. 3a.ed. Omega. Barcelona. pp:540 - 545.

99.- Wrisz-Carrington,P. y R.S.Nussenzweig. 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream of Trypanosoma cruzi in mice: Strain differences in susceptibility to complement-mediates lysis. Bra.Clin. Exp. Inmunol.37: 416 - 423.