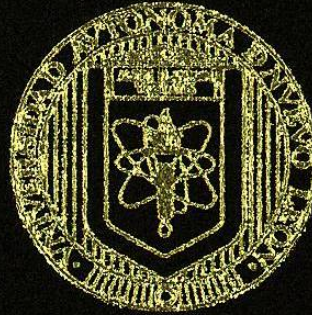


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TESIS

"DEFICIENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (PROTOZOOA
KINETOPLASTIDA) EN TRIATOMINOS (REDUVIDAE,
INSECTA) POR EL ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO
A ENZIMAS Y AMPLIFICACIÓN DE MINICIRCULOS DEL
EADN

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL LA
BIOL. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA

PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN

ENTOMOLOGÍA MÉDICA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

MAYO DE 1997.

TM

Z5320

FCB

1997

M6



1020119190

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TESIS

"DETECCION DE TRYPANOSOMA CRUZI (PROTOZOA
KINETOPLASTIDA) EN TRIATOMINOS (REDUVIDAE,
INSECTA) POR EL ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO
A ENZIMAS Y AMPLIFICACION DE MINICIRCULOS DEL
ADN

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL LA
BIOL. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA

PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN

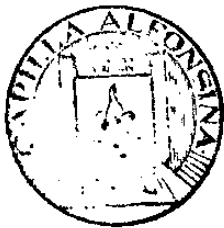
ENTOMOLOGIA MEDICA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MAYO DE 1997

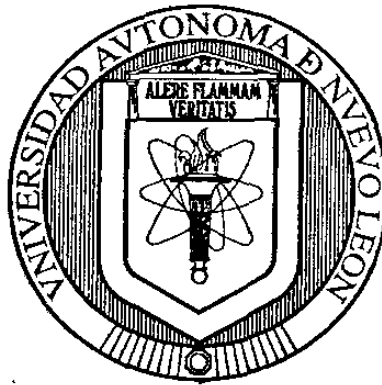
TM
Z5320
FCB
1997
M6

0116-28860



FONDO .TESIS.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TESIS

**“DETECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (PROTOZOA
KINETOPLASTIDA) EN TRIATOMINOS (REDUVIDAE,
INSECTA) POR EL ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO
A ENZIMAS Y AMPLIFICACION DE MINICIRCULOS DEL
kADN**

QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL LA
BIOL. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA

PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN

ENTOMOLOGIA MEDICA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MAYO DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TESIS
DETECCION DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (PROTOZOA,
KINETOPLASTIDA) EN TRIATOMINOS (REDUVIDAE,
INSECTA) POR EL ENSAYO INMUNOABSORBENTE
LIGADO A ENZIMAS Y AMPLIFICACION DE
MINICIRCULOS DEL KADN
QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL LA
BIOL. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN
ENTOMOLOGIA MEDICA

DIRECTOR: M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA

CO-DIRECTOR: DR. JOSE LUIS ROSALES ENCINAS

SECRETARIO: M.C. PABLO ZAPATA BENAVIDEZ

VOCAL: M.C. FILIBERTO REYES VILLANUEVA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO DE 1997

DEDICATORIA

CON AMOR
A MI ESPOSO
A MIS HIJOS:
CHRISTOPHER DANIEL Y
LUCIO ABRAHAM.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Hilda Garza Fernández, Jefe del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme realizar parte de mi trabajo práctico.

M. en C. Lucio Galaviz Silva por su consejos y asesoría. Gracias.

Al Laboratorio de Patología Molecular del CINVESTAV-IPN México y a los investigadores del mismo por su amistad.

Dr. José Luis Rosales Encina por permitirme el acceso y realización del presente estudio en su Laboraorio, así también por su apoyo a la realización de ésta, sus valiosos consejos, tiempo y amistad. Gracias.

A los maestros del Laboratorio de Entomología Médica por sus enseñanzas y amistad. Gracias.

A todas las personas que de alguna forma me apoyaron y me guiaron. Gracias.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
HIPÓTESIS	5
ORIGINALIDAD	5
ANTECEDENTES	7
ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE VECTORES	7
HISTOTROPISMO Y PATOGENICIDAD DE LA CEPA	
NEOLONESA DE T. CRUZI	9
ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE DIAGNÓSTICO	
MOLECULAR	11
INMUNODETECCIÓN DE LA TRIPANOSOMIASIS	
AMERICANA	15
MATERIAL Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
FOTOS Y GRÁFICAS	47

INTRODUCCIÓN

La familia Reduviidae pertenece al orden Hemiptera, y sus miembros reciben nombres como "chíntches asesinas", "gigantescas", "besuconas", etc. Existen más de 2,500 especies distribuidas en 20 subfamilias, y la mayoría son depredadoras, sin embargo, existe un grupo relativamente pequeño, la subfamilia Triatominae que es de gran importancia médica por sus hábitos hematófagos al alimentarse de vertebrados, incluyendo al hombre (Lent y Wygodzinsky, 1979). Esta subfamilia contiene 112 especies de las cuales la mitad se ha reportado infectada con el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* (Tay *et al.*, 1980), agente causal de la tripanosomiosis americana o enfermedad de Chagas.

En México, la distribución geográfica de los vectores abarca todos los estados. En Nuevo León, la lista incluye a *Triatoma gerstaeckeri* (Stål), *T. neotomae* (Neiva), *T. lecticularia* (Stål) y *T. protracta* (Uhler), de las cuales *T. protracta* y *T. neotomae* se han colectado en habitats silvestres, mientras que *T. gerstaeckeri* y *T. lecticularia* han sido detectada a nivel peri e intradomiciliar (Galaviz-Silva *et al.*, 1991).

La transmisión de *T. cruzi* al humano se inicia cuando las formas metacíclicas infectantes penetran a través de mucosas, conjuntiva, o por transfusión sanguínea de personas infectadas (De Souza, 1984). La enfermedad se caracteriza por una fase inicial aguda con los parásitos en circulación sanguínea y en división en células del miocardio, macrófagos, fibroblastos y células del sistema nervioso. Después de 8 a 10 semanas empieza la fase indeterminada de la enfermedad, la cual perdura varios años o indefinidamente. No obstante, la fase más importante es la llamada crónica que se desarrolla entre los 10-20 años postinfección, e incluye cardiopatía y alteraciones digestivas y neurológicas (6% y 3% respectivamente). Es en esta fase que los pacientes por lo general mueren como resultado de una falla cardíaca (Reyes *et al.*, 1983).

Se estima que dieciocho millones de personas en América Latina están infectadas, y el 30% pueden desarrollar la fase crónica con cardiomiopatías, megaesófago, megacolon, neuropatías o una combinación de éstas. Sin embargo, la mayoría no desarrolla signos clínicos o síntomas, clasificándose como “indeterminadas”. En nuestro país, la enfermedad muestra una prevalencia muy variable (7%-100%), y sobretodo a nivel rural (Centurión Lara *et al.*, 1994).

Los métodos para la detección de infecciones por *T. cruzi* son muy diversos, pero la mayoría presentan una baja sensibilidad y especificidad, ya que dependen de la fase en que se encuentra la enfermedad, por ejemplo: (1) El exámen de sangre al microscopio es una técnica rápida y cuantitativa en la fase aguda, pero es la menos sensible en las fases indeterminada y crónica; (2) El cultivo de sangre y la alimentación de reduvidos con sangre de pacientes (xenodiagnóstico) son más sensibles pero lentas (más de 21 días) y no son cuantitativas. Con una combinación del exámen directo, hemocultivo y xenodiagnóstico, el diagnóstico parasitológico puede alcanzar hasta un 100% de efectividad en personas infectadas con *T. cruzi* pero solo en la fase aguda. Con la misma combinación de métodos, solamente se logra el 50% de sensibilidad en infecciones crónicas (Centurión Lara *et al.*, 1994) y no son altamente específicos, ya que se han detectado reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania* spp. y *T. rangeli* (Araujo, 1986).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una de las técnicas más sensibles para el diagnóstico del *T. cruzi*. Estas pruebas han llegado a ser importantes en monitoreos de muestras poblacionales de gran tamaño obteniéndose resultados en períodos cortos de tiempo (Maizels *et al.*, 1988). Este método ha sido útil también en bancos de sangre para monitorear la mayoría de las enfermedades infecciosas transmisibles por transfusión (tales como SIDA, sífilis, hepatitis, y virus de la leucemia en células T de humano). La mayoría de las ELISAS desarrolladas para detectar infecciones de *T. cruzi* utilizan mezclas complejas de antígenos

obtenidos por lisis de epimastigotes o tripomastigotes (Anthony *et al.*, 1979). Las ventajas de la biología molecular a nivel de expresión de genes recombinantes, han permitido la identificación y expresión de genes del *T. cruzi* en importantes - antígenos recombinantes. La evaluación de algunos de estos antígenos definidos han mostrado resultados satisfactorios para el diagnóstico de la infección (Gruber, A. *et al.*, 1993).

Recientemente se ha demostrado que la reacción en cadena de la ADN polimerasa (RCP) amplifica al ADN (genómico, kinetoplástico, intergénico, ó rARN) de *T. cruzi* en sangre de individuos infectados crónicamente, alcanzando una sensibilidad del 100%. Respecto a los iniciadores para amplificar ciertas regiones de los minicírculos del ADN del kinetoplásto, estos han demostrado alta sensibilidad (96.5 %) en muestras de pacientes diagnosticados como positivos por técnicas serológicas y por xenodiagnóstico (Wincker *et al.*, 1994).

En México actualmente se emplean los oligonucleótidos KNS1 y KNS2 para amplificar por la técnica de RCP, secuencias del ADN de una región hipervariable de los minicírculos del kinetoplasto del parásito, la cuál ha demostrado elevada sensibilidad al detectar el equivalente a 0.8 a 1.5 moléculas del minicírculo, o sea, 1/12,000 del parásito. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron obtenidas por Monteón Padilla *et al.* (1994) del fragmento *Nsi* I, el cual está constituido por 380 pares de bases nucleotídicas (pb) y representa ¼ del total del minicírculo. La comparación de ¼ de las secuencias a partir del sitio *Nsi* I muestra tres regiones conservadas. Las secuencias analizadas corresponden a minicírculos de las cepas Y y Cl, así como al aislado AWP. Por ello, el ADN de los minicírculos tiene secuencias específicas de *T. cruzi*, además de que se encuentran repetidas de 40,000 a 80,000 veces, ya que un solo parásito contiene de 10,000 a 20,000 minicírculos. Estos oligonucleótidos han demostrado su especificidad en el diagnóstico al emplearse para amplificar ADN del parásito en ganglios linfáticos,

corazón, sangre, etc de ratones infectados experimentalmente, según se ha demostrado.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar una estrategia para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en base a las técnicas inmunológicas como es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y de biología molecular que es la reacción en cadena del ADN polimerasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Establecer un procedimiento para la detección de la cepa neolonesa de *T. cruzi* por ELISA, con anticuerpos anti-epimastigote obtenidos contra la cepa Y del parásito.
- 2.-Utilizar los oligonucleótidos KNS1 y KNS2 de la cepa Y en las reacciones de RCP para su posible aplicación en la detección molecular de la cepa neolonesa.
- 3.-Aplicar la técnica de ELISA y RCP en triatomos naturalmente infectados para determinar la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas, empleando la microscopía de luz como el estándar de oro para la evaluación.

HIPOTESIS

Es posible realizar la detección de la cepa regional del protozoario patógeno *Trypanosoma cruzi*, con técnicas inmunológicas y de biología molecular empleando anticuerpos y secuencias de oligonucleótidos del kADN, respectivamente, derivados de la cepa Y debido a cierta homología conservada entre las cepas del protozoario.

ORIGINALIDAD

En Nuevo León el agente etiológico de la enfermedad de Chagas ha sido detectado por estudios histopatológicos al microscopio de luz por personal de la F.C.B. empleándose hospederos experimentales para reproducir el ciclo biológico del parásito.

Los únicos antecedentes en el País sobre la detección del *T. cruzi* en base a las técnicas inmunológicas y de biología molecular han sido realizados por el personal del CINVESTAV-IPN.

ANTECEDENTES

Estudios realizados sobre vectores

Los estudios entomológicos en México relacionados con la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas fueron inicialmente desarrollados por Hoffman (1928, 1939) antes de describirse los primeros casos clínicos humanos (Mazzotti, 1940). Desde entonces se reconoce la existencia de 27 a 30 especies de reduvidos hematófagos, en su mayoría del género *Triatoma*, distribuidos en todos los estados de la República Mexicana (Velazco Castrejon y Guzmán-Bracho, 1986; Salazar *et al.*, 1988). Las especies involucradas en la transmisión del parásito al ser humano son *Rhodnius prolixus* Stal en Chiapas y Oaxaca (Tay *et al.*, 1980), *Triatoma barberi* Usinger en Guanajuato, Jalisco, Morelos, Oaxaca y Querétaro (Zárate *et al.*, 1980), *T. mazzotti* Usinger (*T. phyllosoma mazzotti*) de Guerrero, Jalisco, Michoacán y Oaxaca (Tay *et al.*, 1980 y Rojas *et al.*, 1989), *T. phyllosoma* (Burmeister) (*T. p. intermedia* Usinger en Oaxaca y Zacatecas (Martínez y Martín, 1981), *T. pallidipennis* (Stal) de Michoacán y Morelos (Tay *et al.*, 1966), *T. ruvida* (Uhler) (*T. r. sonora* Usinger, *T. r. uhleri* Usinger) en Sonora (Palencia y Julia, 1960), *T. dimidiata maculipennis* (Stal) en Yucatán (Quintal y Polanco, 1977) y *T. longipennis* Usinger en Jalisco (Velazco *et al.*, 1989).

En Nuevo León, Aguirre Pequeño (1947a, b) registró por vez primera la infestación domiciliaria cuando colectó 32 ninfas y 7 adultos de *Triatoma* spp., de las cuales identificó como infectadas en forma natural a 20 ninfas y 4 adultos, en chozas de los mineros localizadas en Los Ramones. Actualmente se reconocen cuatro especies reportadas para Nuevo León y los estados vecinos, así como para el sureste de los Estados Unidos de Norteamérica (Usinger, 1944; Lent y Wygodzinski, 1979). La presencia de dos especies intra y peridomiciliarias de triatomíneos, ha sido corroborada en San Juan de Vaquerías, Gral Terán. Los indicadores entomológicos calculados en dos monitoreos durante 1985-1989 para

Triatoma gerstaeckeri y *T. lecticularia*, han servido para evaluar el riesgo de los habitantes a adquirir la infección por *Tripanosoma cruzi*. Los indicadores globales reflejaron un índice de infestación del 47.82, el índice de densidad fué de 143.47 con un índice de hacinamiento del 300.00. El índice de colonización fué de 50.00 y el de infección natural de 36.36 con el más alto en Delicias (100.00) para *T. gerstaeckeri* y en la Glorias (50.00) para *T. lecticularia*. Este estudio, de acuerdo a Galaviz-Silva *et al.* (1991), aumenta la lista para los vectores intradomiciliarios en la República Mexicana, reiterándose la necesidad de efectuar estudios uniformes con indicadores entomológicos para compararlos epidemiológicamente. Las observaciones anteriores fueron corroboradas posteriormente por Martínez-Ibarra *et al.* (1992), pero extendiéndose a 10 localidades del municipio de General Terán, determinándose además de los indicadores entomológicos, la distribución mensual de captura, proporción sexual de ejemplares y su relación con el domicilio humano. Las especies capturadas fueron: *T. gersteckeri* en 8 comunidades y *T. lecticularia* en 4. La positividad fué similar en ambas especies. El mes de captura fué en junio, detectándose que ambas especies fueron esencialmente peridomiciliares (*T. gerstaeckeri*, 18.1-97.27% y *T. lecticularia*, 6-66.67%) en proceso de adaptación al intradomicilio.

T. gerstaeckeri y *T. lecticularia* también han sido reportadas en el sur de los Estados Unidos por Díaz (1951) detectando índices de infección natural del 38 y 50% respectivamente a partir de 604 *T. gertaeckeri* y 272 *T. lecticularia*. Otros trabajos similares han sido descritos por Packchianian (1943), Sullivan (1949) y Burkholder (1980) en el sur de los Estados Unidos, más sin embargo, las contribuciones epidemiológicas son escasas, en contraste con los índices de infección natural que son alarmantes.

La capacidad vectorial de *T. gerstaeckeri* es similar a la que presentan otras especies de gran relevancia epidemiológica en otras latitudes, pues el período de

incubación de los huevos es de 28.65 días, con una longevidad de 10 meses y una frecuencia de alimentación de cada 15 días en condiciones de laboratorio (Galavíz Silva *et al.*, 1992), estos datos son parecidos a los de *T. barberi*, ampliamente reconocida en la transmisión de *T. cruzi* al humano. Incluso, cada una de las etapas de desarrollo fueron semejantes a los tiempos de ecdisis de *T. barberi*. La capacidad reproductiva de *T. gerstaeckeri* es de 2.8 huevos diarios por hembra, igual a la de *T. barberi*, pero menor que la de *T. dimidiata* (Zárate, 1983, Zeledón *et al.*, 1970). Por esta razón se considera que *T. gerstaeckeri* es el vector primario de *T. cruzi* en Nuevo León y estados vecinos (Galavíz *et al.*, 1992), pues además, el tiempo de ingesta y defecación coinciden con los de las especies agresivas como *Pastronylus megistus* (Burmeister), *T. infestans* (Klug), *R. prolixus* y *T. barberi*.

Histotropismo y patogenicidad de la cepa neolonesa de *T. cruzi*.

Las investigaciones epidemiológicas de la enfermedad de Chagas en Nuevo León son escasas, tal vez porque se considera que la cepa local carece de patogenicidad. Al respecto cabe recordar dos experimentos de Davis y Packchanian que datan de 1943. En ambos trabajos se inocularon a monos por vía ocular con cuatro cepas texanas de *T. cruzi* desarrollándose el cuadro clínico de la tripanosomiosis americana. Después, en 1955, se describió el primer caso humano en Corpus Christi (Woody 1955), y también se reportaron nueve casos fatales en perros domésticos en el mismo estado de Texas (Williams, Adams y Yaeger, 1977). En este caso la fuente de infección fue *T. lecticularia occulta*, con seis chinches infectadas en forma natural, y causando miocarditis granulomatosa asociada a nidos de amastigotes. Más recientemente, Burkholder *et al.* (1980) reportaron otro caso humano en el mismo estado.

En el centro y sur del país, las cepas se reconocen por su virulencia al causar en el ser humano cardiopatías y visceropatías en pacientes chagásicos o en animales de experimentación (Reyes *et al.*, 1983).

Para determinar si la población humana de las zonas rurales de Nuevo León estaba expuesta a una cepa patógena como aquellas que han sido aisladas en Jalisco, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Morelos y Yucatán, Galaviz *et al.* (1992), inocularon al protozooario en ratón albino y estudiaron la histopatología causada al microscopio de luz y electrónico de transmisión. Se encontró que la parasitemia ocurría a los días 5-29 post-infección con atrofia en los cuartos traseros y parálisis en la fase aguda. Al microscopio de luz, la histopatología se caracterizó por la presencia de nidos de amastigotes en músculo esquelético y cardíaco, acompañados por focos de miocarditis con inflamación intersticial, leucocitosis mononuclear, intensa inflamación mixta intersticial, desorganización de fibras musculares e infiltrado inflamatorio de tejido adiposo perivascular. En el tubo digestivo, la túnica del músculo liso presentó nidos de amastigotes con intensa reacción inflamatoria similar a los que se observaron en las células de Kupffer a nivel periportal. Al microscopio electrónico de transmisión se corroboró la histopatología, observándose además degeneración celular en el tejido cardíaco, miofibras con edema subsarcolémico, degeneración mitocondrial con desaparición de crestas mitocondriales y vacuolización del sarcoplasma de las fibras cardíacas, detectándose además la presencia de amastigotes con el cinetoplasto discoidal. En este estudio se comprobó el comportamiento miotrópico de la cepa local por manifestar su capacidad de invadir corazón y músculo esquelético, similar a las cepas aisladas de *T. barberi* (La Cruz y Zacoalco, Jalisco; La Mesa y El Capulín, Michoacán) y *T. phyllosoma pallidipennis* colectada en Los Higueros, Morelos (Tay *et al.*, 1980). Se concluyó que la cepa local es tan patógena como aquellas que han sido estudiadas en el centro y sur del país o Centro y Sudamérica, sin embargo, debido a la dispersión y escasos de datos, se le ha restado importancia clínico-epidemiológica en la región o al impacto de esta zoonosis sobre la salud humana.

Estudios realizados sobre diagnóstico molecular

Las contribuciones sobre el diagnóstico molecular de la tripanosomiosis americana se basan en la amplificación de secuencias repetitivas en ADN cromosómico, satélite, minicírculos y maxicírculos de kinetoplastos, comparándolos entre las diversas cepas del protozooario debido a su heterogeneidad interespecífica. Diaz *et al.* (1992) reportaron el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de ADN satélite para aumentar la sensibilidad en la detección de parásitos en sangre, con la meta de mejorar el diagnóstico en la fase crónica. Trabajaron con epimastigotes de Mirada, DM30, DM28C, CL, y G de *T. cruzi*. Sintetizaron dos oligonucleotidos contiguos que correspondientes a la región más conservada de los 195 pares de bases. Amplificaron 19 femtogramos de ADN del parásito en presencia de 15 microgramos de ADN humano o ADN de ratón. En la reconstrucción experimental consideraron que se podría identificar a un parásito en 10 ml de sangre. Los ensayos por RCP mostraron resultados positivos en la mayoría de los ratones infectados, tanto en órganos como en tejidos.

La caracterización de secuencias repetitivas de ADN en genomas de cepas de Maracay, "Y" y Tulahuén de *T. cruzi*, fue reportada en el mismo año por Requena *et al.* (1992). Estas estuvieron representadas por 1025 nucleotidos que constituyen cerca del 7% del total del ADN nuclear de los parásitos con un número de $1-2 \times 10^4$ copias por genoma. La secuencia de ADN se encontró interdispersa y en la mayoría de los cromosomas. Se demostró que las diferentes copias de estas secuencias repetidas presentaron un extenso polimorfismo en sitios de restricción de las endonucleasas. Así mismo, utilizaron dos iniciadores de oligonucleotidos conservados y derivados de una secuencia repetitiva junto con la técnica de RCP, logrando detectar la presencia de menos de 1/30 de un solo parásito.

Russomando Graciela *et al.* (1992) aplicaron la técnica de RCP para el diagnóstico de la enfermedad en sueros de pacientes chagásicos usando primers de oligonucleotidos específicos a una secuencia altamente repetitiva de ADN nuclear de *T. cruzi*. Evaluaron la especificidad de la técnica empleando las cepas Tulahuen, Y, Colombiana, Sao y Berenice para epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*. Las muestras de pacientes crónicos mostraron resultados positivos por este método. No encontraron diferencias significativas cuando trataron de diagnosticarlos en sangre entera o muestras de suero de pacientes. Estos resultados indican que el suero y las muestras de sangre entera pueden ser usadas para RCP basado en estudios de campo, sin la necesidad de aplicar algún tratamiento químico a los especímenes. Este avance representó una considerable ventaja debido al fácil manejo y transportación de suero, en comparación a muestras de sangre entera, especialmente en climas tropicales.

En Minas Geraiz, Brazil, Jones *et al.* (1993) estudiaron extractos de ADN en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, de autopsias de pacientes seropositivos y seronegativos a *T. cruzi*, amplificándolos por RCP. Incluyeron en su estudio muestras chagásicas de corazón, gónadas, y glándulas adrenales de 4 pacientes seropositivos que carecían de evidencias cardiomiopáticas crónicas y las compararon contra los mismos tejidos de 9 pacientes seronegativos. Detectaron resultados positivos en 7 de los pacientes. Estos estudios demostraron que *T. cruzi* o una porción de su genoma, se presenta en lesiones inflamatorias de la enfermedad.

La presencia de variantes de ADN en una sola célula derivada de la cepa Y-02 de *T. cruzi*, fueron descubiertas en ensayos de rutina en Bethesda, USA, por McDaniel y Dvorak (1993). Aislaron tres variantes de ADN, un tipo fue indistinguible de los padres de las muestras de Y-02 de la base total de ADN de la célula. Los otros dos contenían aproximadamente 30 y 70% más de ADN que los

padres de la muestra Y -02. El incremento en ADN no fue G-C ó A-T específica y no se relacionó con el estado de desarrollo del parásito. En el análisis de la población, las isoenzimas, y los esquizodemos no pudieron diferenciarse de las variantes de la cepa. Sin embargo, estas fueron detectadas por polimorfismo longitudinal de fragmentos de restricción. Postularon que las variantes de Y-02 son genéticamente homólogas, donde la habilidad de formar híbridos viables proveen a *T. cruzi* de un mecanismo para sobrevivir en un medio ambiente estresante, promoviendo su heterogeneidad intra-específica y generando la diversidad observada en la presentación y curso de la enfermedad de Chagas.

Avila *et al.* (1993) analizaron 114 muestras de sangre de pacientes crónicos chagásicos y pacientes no chagásicos. Realizaron xenodiagnóstico, estudios serológicos y pruebas de RCP, en la cual, los productos fueron examinados por hibridación con una sonda de oligonucleótidos marcada con digoxigenina para la región conservada del minicírculo. El método que emplearon mostró una sensibilidad del 100% comparado con las pruebas serológicas y xenodiagnósticas, demostrándose que la amplificación de ADN de minicírculos por RCP debe reemplazar a las pruebas xenodiagnósticas e inmunológicas en la evaluación de parasitemia en pacientes crónicos .

Souto y Zingales (1993) investigaron en Sao Paulo, Brasil, la sensibilidad del diagnóstico de *T. cruzi* por RCP con una secuencia de 100 pb seleccionada de la subunidad 24S del ARN ribosomal, donde el objetivo era no producir una reacción cruzada como fué observado con diferentes especies patógenas de *Leshmania*, 2 cepas de *T. rangeli* o ARN humano. La amplificación de la secuencia fué obtenida por transcripción reversa asociada a la reacción de la cadena de la ADN polimerasa (RT RCP). La sensibilidad fue demostrada con 0.1% del ácido nucleico que contiene una célula parásita. Investigaron la presencia de la misma secuencia en otras 16 cepas de *T. cruzi* observandose una amplificación positiva para todas las

muestras. Los fragmentos amplificados fueron de 125 pb en 8 y de 110 pb en los otros 8 aislados del parásito. Este dimorfismo fué confirmado por pruebas específicas internas y secuenciales, permitiendo así la caracterización de las cepas de *T. cruzi* en 2 grupos. Propusieron que la detección del parásito debería realizarse por la amplificación y secuenciación de rARN de ambos grupos de cepas de *T. cruzi*.

La técnica de RCP usada para detectar minicírculos de ADN del kinetoplasto del parásito, ha mostrado virtualmente un 100% de sensibilidad y especificidad en personas infectadas crónicamente, en contraste con los métodos tradicionales para detectar parasitemia en infecciones crónicas de *T. cruzi*, que pueden ser insensibles o no cuantitativas según el criterio de Centurión-Lara *et al.* (1994), quienes modificaron la técnica para convertirla en cuantitativa, usando un competidor de ADN. El RCP competitivo produce una cantidad de kADN y productos competitivos de RCP, al mezclarse en una razón equimolar. Las cepas utilizadas fueron CI y Tulahuen. Así, lograron estimar la cantidad de ADN competitivo en un punto de equivalencia. La sangre de 5 ratones crónicamente infectados mostró un resultado consistente de 3-260 parásitos/ml, y la sangre de una persona infectada crónicamente produjo 4 parásitos/ml. Concluyeron que con la técnica desarrollada se obtuvo la primera estimación cuantitativa de parasitemia en infecciones crónicas de *T. cruzi*, y que esta puede ser usada en el estudio de la historia natural de la infección y la respuesta a la terapia.

Monteon Padilla *et al.* (1994) observaron en México que el 40% de pacientes con enfermedad crónica chagásica, sufrían dilataciones cardiomiopáticas. Su diagnóstico fué basado molecularmente, reconociendo el ADN del parásito, con dos oligonucleotidos (KNS1 Y KNS 2) para amplificar ADN del kinetoplasto de la cepa Y de *T. cruzi*. El método les permitió una amplificación de 0.8 a 1.5 moléculas de minicírculos de ADN, lo cual es igual a 1/12,000 del parásito cuando

las muestras de tejido de ratón infectado con *T. cruzi* fueron sujetas a la amplificación. El producto fue reconocido por pruebas específicas para minicírculos de ADN y correlacionado con un estudio inmunohistoquímico, detectándose parásitos tisulares. Consideraron que el método desarrollado se podría aplicar a estudios clínicos, epidemiológicos de campo y de vigilancia en bancos de sangre.

Wincker Patrick *et al.* (1994) aplicaron la técnica de RCP para amplificar ADN en la detección de *T. cruzi* en 100 muestras de sangre humana colectadas en una área endémica de Minas Geraiz, Brasil. En la extracción de kADN y amplificación por RCP, usaron iniciadores específicos, modificando la técnica con un procedimiento por calentamiento simplificado que linearizó la mayoría de los minicírculo de las moléculas sin agentes químicos. Las muestras con resultados negativos fueron analizadas de nuevo en búsqueda de una posible inhibición a la amplificación usando primers derivados de una secuencia específica de humano. Aquellos que presentaron un bajo nivel de inhibición fueron restados después de una extracción de ADN. De 86 pacientes previamente diagnosticados como chagásicos por técnicas serológicas, 83 fueron positivos en las pruebas de RCP (sensibilidad-96.5), incluyéndose el xenodiagnóstico positivo de pacientes y 21 (87.5%) de 24 individuos con xenodiagnostico negativos. Sugirieron que la RCP puede ser utilizada como complemento serológico de la enfermedad de Chagas.

Inmunodetección de la tripanosomiosis americana

Castilla *et al* (1988) colectaron sueros de pacientes en varias regiones de México para evaluar un nuevo método en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas como lo es la difusión en gel-ELISA (DIG- ELISA) para anticuerpos de *T. cruzi*, usando epimastigotes como antígeno. Los resultados obtenidos por DIG-

ELISA fueron comparados con la prueba de hemaglutinación indirecta. Los resultados de DIG-ELISA mostraron que el diámetro de la zona de reacción obtenida con sueros de individuos expuestos en el pasado o presente con *T. cruzi*, fueron significativamente más altos que los obtenidos por sueros normales. Todos los sueros de individuos chagásicos tuvieron una reacción positiva en la prueba, mientras que los sueros de individuos normales o con toxoplasmosis y leishmaniasis cutánea tuvieron resultados negativos. Una correlación alta fue observada entre el diámetro de la zona de reacción y la concentración del anticuerpo. Además hubo una significativa correlación, entre los resultados obtenidos de las dos pruebas serológicas. Los datos sugirieron que DIG-ELISA es una prueba serológica que mide anticuerpos de *T. cruzi*.

Goldsmith *et al* (1986), realizaron un estudio de 10 años practicando encuestas serológicas desde 1971 en el Cerro del Aire, Oaxaca. Los resultados revelaron niveles de anticuerpos a *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. De 248 personas mayores de 20 años el 76% resultó con la enfermedad, sometidas a pruebas serológicas. El 2% de menores de 10 años también mostró resultados seropositivos. En 1980 comenzaron un estudio longitudinal de siete años, donde obtuvieron muestras de sangre de 237 habitantes de la comunidad que se sometieron a pruebas de hemaglutinación indirecta, aglutinación directa y fijación de complemento, 35% fueron seropositivos. Los exámenes clínicos y electrocardiográficos mostraron diferencias significativas entre 111 personas seropositivas y 65 seronegativas. Además se logró aislar *T. cruzi* en 45% de 33 sujetos seropositivos con el uso combinado de medio LIT e histocultivos de células Mk_2 , investigando así la historia natural de la enfermedad. Comprobaron que las personas serológicas positivas eran parasitológicamente positivas.

Zicker *et al* (1991) desarrollaron un estudio con una muestra de la población general de la zona central de Brasil. Compararon la inmunofluorescencia (IF), la hemaglutinación (HA) y el inmunoensayo enzimático (ELISA) para diagnosticar

infecciones por *T. cruzi* a partir de eluidos de sangre seca sobre papel filtro y muestras de sangre venosa. Tomando la seropositividad o la seronegatividad como patrones, la sensibilidad de las pruebas con los eluidos fue baja: 78,1% en el ELISA, 69,2% en la IF Y 64,6% en la HA. La concordancia de las pruebas con eluidos fue muy escasa; la IF y ELISA mostraron la mejor copositividad. Los valores predictivos positivo y negativo de las tres pruebas con eluidos fueron similares (alrededor de 96%) a los correspondientes a sueros. En las tres pruebas la copositividad fue mayor cuando se usaron sueros. También discutieron los métodos que utilizaron en el diagnóstico de infecciones por *cruzi* en cuanto a su idoneidad para discriminar entre individuos infectados y no infectados.

Los estudios sobre antígenos recombinantes para aplicarlos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas han logrado un avance significativo con la contribución de James *et al.* (1992), quienes estudiaron la secuencia de un gen que codifica para una proteína inmunodominante con un epítipo repetitivo del protozoario *T. cruzi*. Clonaron y expresaron la secuencia, utilizando las cepas Tulahuen, Y, Cl, Esmeraldo, PB295, VL2067, *rangeli* y *brucei* (1HRI19). Los aislados de *Leishmania* incluyeron a *chagasi* (8MHOM-BR-82-BA-2,C1), *amazonensis* (MHOM-BR-84.BA-32c5) y *donovani* (MHOM-Et-67HU3). Detectaron 10 aminoácidos en los antígenos de tripomastigotes y al parecer fueron específicos y se conservaron en los aislado citados de *T. cruzi*. Trabajaron a los anticuerpos dirigidos contra estos aminoácidos en sueros positivos de pacientes crónicos y agudos en la enfermedad de chagas, observando resultados positivos en el 95 % de las muestras. Elaboraron péptidos sintéticos de 15 aminoácidos y observaron que estos actúan como un epítipo repetitivo para las células B. Consideraron el hallazgo significativo y aplicable en el control y diagnóstico de la enfermedad, dada la amplia diversidad que presentaron las cepas de *T. cruzi* y también las variadas manifestaciones clínicas.

MATERIAL Y METODOS

Area de Estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en el Ejido de San Juan de Vaquerías. Este pertenece a la Gran Llanura de Norteamérica y se localiza al Este del Municipio de General Terán rumbo a China, N.L. a 82 Km por la carretera a Vaquerías. Se ubica entre las coordenadas 99° 02' 00" de LO y 25° 07' 07" de LN a 150 m sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es mayor de 18° C y la media mensual más alta es de 28°-29°C durante el mes de Agosto; la media mensual mínima ocurre en Enero y alcanza los 14°-15°C. El volumen de precipitación pluvial invernal oscila entre 5-10.2mm³. El clima es semicálido subhúmedo con lluvias en verano. El suelo se clasifica como castañozem cálcico con elementos secundarios constituidos por xerosol lúvico y háplico medio, útil para la ganadería y agricultura.

La vegetación predominante es la de matorral espinoso tamaulipeco y pastizal cultivado, con dominancia de huizache y chaparro prieto (*Acacia sp.*), nopal (*Opuntia sp.*), mezquitales (*Prosopis sp.*), granjeno (*Celtis pullida*), palma, (*Yucca sp.*), cenizos (*Leucophyllum texana*) y collotillos (*Karwinskia humbolttiana*).

El ejido está constituido por las comunidades de Vaquerías, Nuevo Vaquerías, La Gloria, Huizachito, Las Delicias y El Maguey en las cuales se distribuyen 125 domicilios habitados por 650 personas aproximadamente. Las casas están constituidas de adobe, los techos son de carrizo o palmito, otros de lámina acanalada, el piso es de tierra con puertas y ventanas de madera o leños. Solo en Nuevo Vaquerías las casas son de block y cemento (Sría de Programación y Presupuesto, 1981).

Colecta de material biológico

La cepa neolonesa de *Trypanosoma cruzi* fué obtenida de triatomíneos (*Triatoma gerstaeckeri*) infectados en forma natural, capturados en madrigueras de rata de campo, *Neotoma micropus*, colectados por disección de nidos. En total se capturaron 52 chinches durante Marzo-Octubre de 1996.

Los triatomíneos se transportaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. alimentándose con un conejo de laboratorio para posteriormente colectar las heces en microtubos de cada una de las chinches por separado, examinándose en un microscopio para identificar la infección natural en cada una.

Después, se trasladaron al Laboratorio de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN para evaluar la infección de los triatomíneos por *T. cruzi* mediante las técnicas de ELISA y RCP.

Técnica de ELISA.

Para determinar la infección de triatomíneos por la cepa neolonesa de *T. cruzi*, primero se estandarizó la técnica con la cepa Y del protozoario originaria de Minas Gerais, Brasil y cultivada en el Laboratorio de Patología Molecular del CINVESTAV hasta obtener una lectura de corte, considerándose esta como punto de referencia para separar las muestras positivas y negativas.

Control positivo: Se realizaron diluciones por duplicado de 1 a 10 μ l de extracto de epimastigotes de la cepa Y (50 mg/ml), llevados a 50 μ l con buffer de carbonatos (0.75 g de carbonato de sodio, 1.46 g de bicarbonato de sodio y 500 ml de agua destilada estéril) para utilizarlo como control positivo, efectuándose la

curva de calibración con las diluciones mencionadas, registrando las lecturas a 492 nm.

Obtención del primer anticuerpo: El primer anticuerpo anti-epimastigote se obtuvo inoculando un ratón por vía intraperitoneal con un extracto total del parásito (proporcionado por el personal del CINVESTAV). Posteriormente el suero de ratón se diluyó por duplicado a 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000, 1/64000, y 1/126000 con buffer de fosfatos-albúmina sérica bovina (PBS-BSA).

Procedimiento de la técnica: El segundo anticuerpo consistió de anti IgG de ratón, obtenido a partir de cabra, conjugado con peroxidasa (Pierce). El substrato empleado fue OPD (dihidrocloruro de orto-fenilenediamina 4 mg, ácido cítrico 2.43 ml, fosfato de sodio dibásico 2.57 ml, agua 5 ml y peróxido de hidrógeno 4 μ l).

Preparación de las muestras: Las heces obtenidas se diluyeron en 200 μ l de agua, se hirvieron 10 min y se centrifugaron a 8,000 g durante 10 min, recuperándose 100 μ l del sobrenadante (SN1) en un tubo esteril y otros 100 μ l por separado para la amplificación de ADN por la técnica de RCP, conservándose a -70 °C.

El precipitado se resuspendió en 100 μ l de solución A, constituida por Tris-HCl 10mM, pH 7.4, 1mM EDTA, 1.0% de Nonidet 40 (NP-40), 0.01% de duodecil sulfato de sodio (SDS), urea 10mM y PMSF 1mM, incubándose por 10 min a 37°C. Posteriormente éste se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga Eppendorf, colectándose el sobrenadante 2 (SN 2). Después se adicionó a los SN1

y SN2 un volumen (100µl) de buffer de carbonatos 2X., pH 9.8, conservándose a 4°C hasta la realización de la técnica.

Se agregaron por duplicado 50 µl de la muestra por pozo de placas de ELISA. incubándose toda la noche a 4°C. Los lavados se realizaron con PBS-Tween (0.05% de Tween) tres veces (3X) para después bloquear con 50-100 µl por pozo de PBS-BSA (1% BSA), 1hr a 37°C o toda la noche. En segundo lavado se utilizó PBS-Tween 3X, y se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-epimastigote (diluído 1:10,000 en PBS-BSA) para incubar 2 hr a 37°C. Enseguida los residuos del anticuerpo fueron eliminados mediante otros lavados con PBS-Tween 3X, para agregar posteriormente 50 µl del conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa (1:20,000 Pierce, producto-No. 31 430), e incubar 1 hora a 37°C.

Por último se lavaron los pozos con PBS-Tween 3X y se le agregó el substrato OPD (dihidrocloruro de orto-fenilenediamina de hidrogeno 4mg, ácido cítrico 2.43ml, fosfato de sodio dibásico 2.57ml, agua 5ml y peróxido de hidrogeno 4µl), manteniéndose por 3-10 min a temperatura ambiente y en la obscuridad. La reacción se bloqueó con ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) hasta obtener una coloración amarilla-anaranjada en las muestras positivas, y posteriormente se traslado la placa de ELISA a un espectrofotómetro, determinándose la absorbancia a 492 nm para cuantificar la concentración de antígeno en la reacción.

Aplicacion de RCP en muestras de triatominos

Purificación de Ac. nucleicos totales: De los 100 µl del sobrenadante 1 (SN1), conservados a -70°C se realizaron 2 extracciones de ácidos nucleicos totales con fenol-cloroformo, 1/10 de acetato de sodio 3M pH 6.0 agitando con vortex y finalmente dos volúmenes de alcohol etílico, incubándose toda la noche a -20°C ó 1 hora a -70°C para precipitar los ácidos nucleicos.

Después se centrifugó la muestra a máxima velocidad en la microcentrífuga por diez minutos de preferencia a 4°C, resuspendiendo el ADN en 50 µl de TE (10mM tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA).

Obtención de los fragmentos de los minicírculos del ADN del kinetoplasto: Posteriormente del ADN total se digirieron 18 µl de la muestra con 0.5 µl de la enzima *Nsi* I la cual es una enzima de restricción que libera un fragmento aproximado de 370 pb, que representa un cuarto del total del minicírculo, lo que indica que la secuencia del ADN del minicírculo se encuentra en 4 sitios para esta enzima (diluída 1:5), más 2 µl de buffer 10x de enzima de restricción, incubándose a 37°C toda la noche.

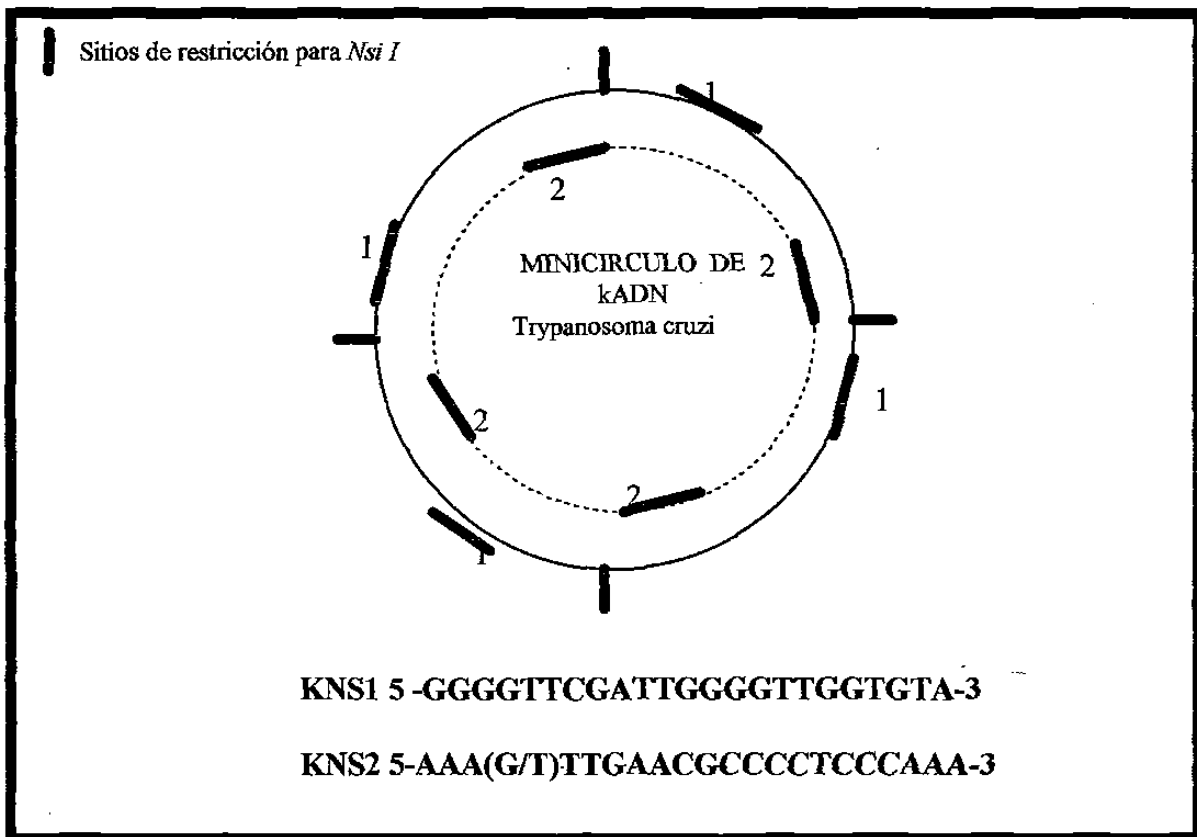


Fig. 1. Secuencia de los oligonucleótidos KNS1 y KNS2, y su localización dentro de la estructura del minicírculo del kinetoplasto..

Realización de la técnica de RCP: Se trabajaron 52 muestras las cuales fueron digeridas con *Nsi* I y sus dos oligonucleotidos KNS1 y KNS2 con base a las regiones conservadas encontradas en los minicírculos. A excepción de la muestra número 1, no se le agregó oligonucleotidos para emplearla como control negativo. La cantidad de reactivos se muestra en la siguiente tabla:

Cantidad de reactivos por tubo

H ₂ O mineral	DNA	dNTP's	KNS1	KNS2	Taq B 10X	Taq poli	MgCl ₂	Aceite
20 µl	1 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1 µl	0.7 µl	50 µl

Antes de agregar el aceite mineral se completó el volumen de la reacción con 8.3 µl de agua, tomándose todas las precauciones para no contaminar el ADN, trabajándose el material con esterilidad.

Concentración de reactivos:

dNTP	100mmol/l, pH7
KNS1	66.1mM
KNS2	66.2mM
Taq. Polimerasa	2.5 unidades.
MgCl ₂	1.5mM

Programa de ciclos: El ADN para amplificar se procesó a un termociclador J M Research con un programa específico (*List-cruzi* Program) diseñado para la detección del DNA del kinetoplasto de *T. cruzi* que consta de siete ciclos.

1.-Predesnaturalización:	94°C	1 min.
2.-Desnaturalización:	92°C	40 seg.
3.-Anillamiento de oligonucleótidos:	60°C	40 seg.

- 4.-Polimerización: 72°C 45 seg.
- 5.-Repetir por 34 ciclos dos veces.
- 6.-72°C 5 min.
- 7.-4°C.

Posteriormente se prepararon geles de agarosa al 1% en TAE 1X realizándose la electroforesis horizontal a 100 volts para detectar visualmente los productos amplificados con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta,

Análisis estadístico

Para comparar las técnicas diagnósticas entre sí, y determinar el grado de confiabilidad estadística, se utilizó un análisis de Chi-cuadrada (χ^2) mediante una Tabla de Contingencia de 3 x 2 ($p < 0.05$) con dos grados de libertad. Se definió la hipótesis nula como la NO dependencia de positivos y negativos con respecto a la técnica usada (Fleiss, 1981).

La sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de la técnica de ELISA y RCP fueron determinadas en base al análisis recomendado por Fleiss (1981), tal como se describen a continuación:

Evaluación de la Sensibilidad:
$$\frac{TP}{TP + FN}$$

Evaluación de la Especificidad:
$$\frac{TN}{TN + FP}$$

Determinación del Valor Predictivo Positivo:
$$\frac{TP}{TP + FP}$$

Determinación del Valor Predictivo Negativo:

$$\frac{TN}{TN + FN}$$

Donde TP significa: Total de positivos.

Donde FN significa: Falsos negativos.

Donde TN significa: Total de negativos.

Donde FP significa: Falsos positivos.

RESULTADOS

Captura de triatomíneos silvestres: Se capturaron un total de 52 reduvídos en el Municipio de Vaquerías Nuevo León y sus rancherías, de marzo a octubre, obteniéndose los siguientes resultados:

Microscopía de luz: Se observaron las heces al microscopio de cada una de las chinches y se procedió a separarlas como positivas y negativas. Los resultados obtenidos fueron un total de 31 positivas y 21 negativas, para considerarlo como estándar de oro en la comparación de las técnicas.(Foto 1).

Técnica de ELISA: En el control positivo de la cepa Y se registró una lectura de 0.311 %A con un microlitro de extracto de epimastigote en las pruebas de la estandarización del antígeno, aumentando la curva de calibración proporcionalmente al aumentar la cantidad de antígeno de 1-10 μ l. (Gráfica 1, Tabla 1).

TABLA 1
CANTIDAD DE ANTÍGENO Y ANTICUERPO PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA.

REACTIVOS	VOLUMEN/DILUCION	ABSORVANCIA
Extracto de epimastigote	1 μ l (50mg/ml)	0.311% A
1er. Anticuerpo	1/8000	
2do. Anticuerpo.	1/20000	PIERCE

Lecturas con el primer anticuerpo: El primer anticuerpo se diluyó 1/500 μ l en PBS, registrándose una densidad óptica de 1.861 %A (detectadose 0.1mg/ml). La dilución 1/1000 presentó una absorvancia de 1.543 (0.050mg/ml), y disminuyó

proporcionalmente con las diluciones hasta alcanzar una lectura 0.093 %A en la de 1/128000 (0.0003306 mg/ml). La densidad óptica seleccionada para el primer anticuerpo fué de 0.432 %A correspondió a la dilución de 1/8000 (Gráfica 2, Tabla 1). El segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se utilizó a una dilución de 1/20000 según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se procedió a trabajar con las muestras neolonesas, tomando en cuenta las lecturas obtenidas como control positivo de la cepa Y.

Detección de la cepa neolonesa de *Trypanosoma cruzi* por medio de la técnica de ELISA: El estándar que se tomó como positivo o negativo para nuestra cepa dependió de los resultados del control positivo de la cepa Y que se colocó en la microplaca y fueron los siguientes: 0.134, 0.137 y 0.167; el cual se tomó como punto de corte el valor mínimo negativo. Se obtuvieron 25 triatomas negativas con valores desde 0.02 hasta 0.120 y como positivos de 0.133 a 1.594 en un total de 27 muestras procesadas (Tabla 2, Gráfica 3).

TABLA 2
RESULTADOS OBTENIDOS EN PORCIENTO DE ABSORVANCIA A 492 nm.

CONTROL POSITIVO	POSITIVAS	NEGATIVAS
0.134	0.204	0.042
0.137	0.680	0.036
0.167	0.190	0.024
	0.220	0.05
	0.418	0.099
	0.686	0.047
	0.819	0.039
	0.812	0.07
	0.622	0.120
	0.684	0.021
	0.621	0.04
	0.457	0.08
	0.650	0.02
	1.594	0.105
	0.420	0.024
	0.933	0.036
	0.199	0.110
	0.134	0.028
	0.926	0.069
	0.740	0.074

	0.246	0.017
	0.133	0.008
	0.145	0.05
	0.237	0.102
	0.387	
	0.440	

Determinacion de la cantidad de antígeno: Se determinó la cantidad de antígeno con las lecturas del porciento de absorvancia, obtenidas de las muestras positivas de la cepa neolonesa, y la curva de calibración del antígeno de la cepa Y, obteniendose cantidades de 1µl (lecturas obtenidas desde 0.300) hasta 15µl (de 1.50 % A) de antígeno de nuestra cepa. (Gráfica 5)

Reaccion de amplificacion por la tecnica de RCP: De las 52 muestras, 31 fueron positivas y 21 negativas, se corrieron geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio para detectar su amplificación, de los cuales se utilizó un control negativo en el primer carril del gel (no se colocó muestra) y todas las demás se trabajaron con su enzima de restricción *Nsi I* y sus oligonucleotidos correspondientes (KNS1 y KNS2) para amplificar las regiones altamente conservadas del ADN en los minicírculos del kinetoplasto a partir de una extracción total de ácidos nucleicos, obteniendose en el análisis de los geles de agarosa de la reacción de amplificación un fragmento de aproximadamente 320 pares de bases (Foto 2 y 3).

Estos oligonucleótidos han sido utilizados previamente en reacciones de amplificación del ADN del kinetoplasto. La secuencia y localización de KNS1 y KNS2 se muestra en la figura 1, junto con los sitios de restricción.

Las muestras de RCP comparadas con ELISA en cuanto a sensibilidad, coincidieron en resultados, solamente de 4 muestras que fueron negativas en ELISA fueron positivas en RCP (2,5,10,11 Foto 3).

Comparación de las técnicas: Después de determinar los triatomos en positivos y negativos en Microscopía, ELISA y RCP se obtuvo el porcentaje de cada una de las técnicas, se tomó como el 100% el total de las chinches, se compararon los resultados, tal como se observa en la Tabla 3 y4. (Gráfica 4.)

TABLA 3. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE T. CRUZI

TECNICA	MICROSCOPIA	ELISA	RCP.
POSITIVOS	31(59.61%)	27 (51.92%)	31 (59.61%)
NEGATIVOS	21(40.38%)	25 (48.07%)	21 (40.38%)
TOTAL	52	52	52

TABLA 4

RESULTADOS GLOBALES DEL EXAMEN DE HECES DE 52 TRIATOMAS POR MEDIO DE TRES TECNICAS DIAGNOSTICAS DE LABORATORIO

MICROSCOPIA	ELISA	RCP
NEGATIVA	0.042	NEGATIVA
NEGATIVA	0.036	NEGATIVA
NEGATIVA	0.024	NEGATIVA
POSITIVA	0.204	POSITIVA
NEGATIVA	0.003	NEGATIVA
POSITIVA	0.680	POSITIVA
POSITIVA	0.190	POSITIVA
NEGATIVA	0.050	NEGATIVA
POSITIVA	0.480	POSITIVA
POSITIVA	0.686	POSITIVA
POSITIVA	0.819	POSITIVA
POSITIVA	0.812	POSITIVA
POSITIVA	0.0622	POSITIVA
POSITIVA	0.684	POSITIVA
POSITIVA	0.687	POSITIVA
POSITIVA	0.621	POSITIVA
POSITIVA	0.457	POSITIVA
NEGATIVA	0.099	NEGATIVA
NEGATIVA	0.047	NEGATIVA
POSITIVA	0.650	POSITIVA
NEGATIVA	0.039	NEGATIVA
NEGATIVA	0.07	NEGATIVA
POSITIVA	0.594	POSITIVA
POSITIVA	0.420	POSITIVA
POSITIVA	0.120	POSITIVA
POSITIVA	0.933	POSITIVA
POSITIVA	0.199	POSITIVA

POSITIVA	0.134	POSITIVA
NEGATIVA	0.021	NEGATIVA
NEGATIVA	0.04	NEGATIVA
NEGATIVA	0.08	NEGATIVA
NEGATIVA	0.02	NEGATIVA
POSITIVA	0.105	POSITIVA
NEGATIVA	0.024	NEGATIVA
NEGATIVA	0.036	NEGATIVA
POSITIVA	0.110	POSITIVA
NEGATIVA	0.028	NEGATIVA
POSITIVA	0.926	POSITIVA
NEGATIVA	0.069	NEGATIVA
NEGATIVA	0.074	NEGATIVA
POSITIVA	0.740	POSITIVA
POSITIVA	0.246	POSITIVA
POSITIVA	0.133	POSITIVA
POSITIVA	0.145	POSITIVA
NEGATIVA	0.011	NEGATIVA
NEGATIVA	0.008	NEGATIVA
NEGATIVA	0.055	NEGATIVA
POSITIVA	0.237	POSITIVA
POSITIVA	0.387	POSITIVA
POSITIVA	0.440	POSITIVA
POSITIVA	0.102	POSITIVA

CONTROL POSITIVO = 0.137, 0.134, 0.167.

Análisis estadístico: En la tabla de contingencia de 3x2, se obtuvo la $\chi^2 = 0.837 < \chi^2_{0.05,2} = 5.99$. Ya que el valor de la $\chi^2 = 0.84$ con 2 grados de libertad fue menor que la de tablas, se aceptó la hipótesis nula de que la ocurrencia de positivos y negativos no depende de la técnica usada.

Sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA: Se estimó la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos de ELISA comparados con microscopía (RCP no se obtuvieron los valores por ser iguales a los de microscopía de luz.)

La sensibilidad máxima que alcanzó ELISA fue de 87% y una especificidad de 100% con valor predictivo positivo de 100% (VPP) y valor predictivo negativo de 84% (VPN). (TABLA 5).

TABLA 5

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO DE MICROSCOPIA, ELISA Y RCP, PARA LA DETECCION DE *T. CRUZI* EN HECES DE TRIATOMAS.

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
ML	100%	100%	100	100
ELISA	87%	100%	100	84
RCP	100%	100%	100	100

DISCUSION

El papel de *Triatoma gerstaeckeri* como vector primario de *T. cruzi* en la región fue dado a conocer por Aguirre-Pequeño (1947a) y mas recientemente por Martinez-Ibarra *et al.*, (1992), quienes estudiaron sus hábitos domiciliarios y peridomiciliarios. También, la importancia de la cepa neolonesa de *T. cruzi* ha sido demostrada por el comportamiento histotrópico y patogenicidad, caracterizandose como cepa miotrópica, por alojarse y reproducirse en músculo estriado, fibra de miocardio y músculo liso principalmente, ocasionando así daños severos a nivel tisular y celular de los hospederos inoculados experimentalmente, corroborados al ML y MET (Galaviz-Silva *et al.*, 1992);

Hasta hace algunos años era necesario inocular animales experimentales o bien, efectuar xenodiagnósticos para la identificación de *T. cruzi* o confirmar el diagnóstico clínico (Goldsmith *et al.*, 1986), pero en la actualidad, las técnicas inmunológicas y de biología molecular facilitan esta labor, disminuyendo el tiempo requerido de aproximadamente 21 días a 48 horas.

Este trabajo confirma la utilidad y beneficios de las técnicas de ELISA y RCP en comparación con los estudios tradicionales, pues los resultados obtenidos en él demuestran que la metodología desarrollada detecta a *T. cruzi* en muestras de heces de triatomíneos naturalmente infectados. Al aplicar la técnica de ELISA en nuestra cepa, se observó no solo que la cepa Y puede emplearse como control, sino además, que los anticuerpos anti epimastigote producidos contra la cepa Y a partir de ratón o conejo, detectan de igual forma a la cepa local; con resultados similares a las técnicas donde emplearon antígenos recombinantes obtenidos por la clonación de varios genes de *T. cruzi* para usarlos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, lográndose hasta un 99% de especificidad cuando se utilizan 2 péptidos sintéticos de *T. cruzi* en combinación. (James *et al.*, 1992; Gruber *et al.*, 1993). Paranhos-Bacalla *et al.*, (1994) lograron obtener una especificidad del 84 % en

sueros de pacientes chagásicos usando un antígeno recombinante obtenido por clonación de un fragmento de ADN de *T. cruzi* que codifica un antígeno inmunodominante repetitivo llamado H49. El péptido H49 reaccionó en el ensayo de ELISA con pacientes de tripanosomiosis americana pero no con los sueros de pacientes que padecían alguna otra enfermedad parasitaria como *leishmaniasis*.

Otras técnicas que pueden emplearse para diagnóstico son la fijación de complemento, aglutinación directa y la hemaglutinación indirecta. Goldsmith *et al.*, (1986) compararon la sensibilidad de éstas, en una población de Oaxaca donde se conocía la existencia de infecciones crónicas para detectar anticuerpos IgG e IgM. En cuanto a sensibilidad, el método de fijación de complemento fue la prueba preferida para detectar la enfermedad de Chagas en la fase crónica. Las diluciones a partir de 1:8 y 1:128 fueron los niveles límite para el diagnóstico serológico de FC y HAI, pero aunque estas técnicas son fáciles de aplicar en monitoreos de campo, proporcionan resultados falsos negativos altos aún en personas donde se aísla al protozoario por xenodiagnóstico, tal como ocurrió con seis casos, donde hubo una caída de anticuerpos reflejando un título negativo, pero que resultaron positivos a la prueba de aislamiento del parásito por lo cual, la consideramos como una herramienta diagnóstica de uso limitado.

En este estudio obtuvimos valores predictivos de sensibilidad del 87% con 100% de especificidad en ELISA, en base a la lectura de corte de absorbancia establecida para distinguir entre las muestras positivas y negativas.

La técnica de RCP detectó cuatro muestras positivas más que la técnica de ELISA, por lo cual, la sensibilidad de la última muestra un valor más bajo. Esto se debe a que se seleccionó la lectura de corte más alta dentro del intervalo o rango de absorbancia (0.134%A) para separar las muestras positivas y negativas,

obteniéndose 4 muestras con lecturas cercanas a este valor, oscilando estas entre 0.110-0.133 %A. Este resultado corrobora el porque ELISA es una técnica de barrido o de monitoreo para estudios epidemiológicos y el porque RCP es una técnica confirmatoria. Si se hubiera definido un límite de corte más bajo en ELISA, excluiríamos todos los resultados sospechosos, ya que los valores negativos con densidad óptica mayor de 0.1 fueron positivos por RCP, lo cual puede indicar que el punto de corte de 0.1-0.13 son valores indeterminados. Podría ser también que nuestras muestras están más diluidas, pues no se obtuvieron en un cultivo puro como en la cepa Y, sino que se tomaron de las heces directamente.

La importancia de seleccionar lecturas de corte apropiadas se debe a que un resultado falso positivo, puede causar preocupación innecesaria en una población y es poca la asistencia médica que se puede ofrecer a los individuos verdaderamente seropositivos cuando no presentan pruebas clínicas de la enfermedad como lo menciona Zicker *et al.*, (1991).

En cuanto a los valores predictivos, se obtuvo la proporción del VPP de 100% y VPN de 84% detectándose solamente aquellas muestras que tienen la característica buscada e identifica a los que no la tienen (es muy específica). Zicker *et al.*, (1991) compararon sensibilidad, especificidad VPP y VPN en inmunofluorescencia, hemaglutinación y ELISA para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* y mencionaron que ELISA es la mejor elección por tener resultados más altos y solo requiere pequeñas cantidades de eluido o suero y se pueden procesar diariamente una gran cantidad de muestras.

El empleo de los oligonucleótidos diseñados a partir de la cepa Y mostraron la misma sensibilidad y especificidad reportada por Monteón-Padilla *et al.*, (1994) para amplificar la cepa Y que para la cepa neolonesa, debido a que provienen de una región del kinetoplasto altamente conservada entre diversas variedades de *T.*

cruzi, pues estos investigadores analizaron el ADN del minicírculo (PCGENE/Clustal) para sitios de restricción *Nsi* I de la cepa Y (cuya secuencia es denominada TCNSI) y lo compararon con las secuencias KY13, PTC21, 25 AND y KM14, concluyeron que las regiones analizadas corresponden a los minicírculos de la cepa Y y CL, así como al aislado AWP. En el mismo trabajo, comprobaron la eficiencia de los oligonucleótidos KNSI y KNS2 para detectar a la cepa mexicana Ninoa de *T. cruzi* en tejidos de animales experimentales, pero sin mostrar amplificación en los aislados de *Leishmania mexicana*. Lo anterior indica que los minicírculos de las diferentes cepas y aislados del Continente Americano presentan secuencias constantes las cuales pueden tener una función específica en la biología del parásito y del cinetoplasto en particular (Monteón-Padilla *et al.*, 1994).

En la reacción en cadena de la polimerasa, se logró amplificar el ADN de *T. cruzi* con la utilización de 2 oligonucleótidos KNS1 y KNS2 diseñados originalmente para detectar a la cepa Y del parásito. Con la enzima de restricción *Nsi* I se lograron obtener los fragmentos correspondientes a los cuatro sitios de restricción de los minicírculos del ADN del kinetoplasto liberándolo del resto del genoma. El análisis en geles de agarosa al 1% mostró la presencia de fragmentos con 320 pares de bases. aproximadamente. Monteón-Padilla *et al.*, (1994) mostraron la amplificación de fragmentos de aproximadamente 313 pares de bases con anterioridad. Se puede concluir que los oligonucleótidos utilizados en la cepa Y son útiles también en la cepa regional ya que existe una homología en la secuencia nucleotídica por la generación de productos del mismo tamaño y se puede realizar con el mismo programa de ciclos en el termociclador; lo cual indica que la secuencia nucleotídica es muy semejante.

Jones *et al.*, (1993) emplearon a los oligonucleótidos TCZP1 y TCZP2 para detectar una región genómica del ADN de *T. cruzi* en tejidos embebidos en parafina logrando obtener productos de RCP positivos en solo 1 de 24 cortes

histológicos de tejido cardíaco provenientes de 4 pacientes seropositivos. Esta amplificación ocasional o esporádica fue atribuida a la contaminación del ADN, resultando en una pobre sensibilidad del método.

La caracterización molecular de las cepas mexicanas de *T. cruzi* ha avanzado enormemente en los últimos años. Zavala-Castro, Velazco-Castrejon y Hernández (1993) analizaron 17 cepas mexicanas y cinco sudamericanas en base al polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (FRLP) *Hind* III asociados con el espaciador génico del ARN ribosomal y por el patrón de digestión con la enzima *Hinf* I del ADN total. Analizaron los resultados para calcular la divergencia del DMA y la construcción de dendogramas demostrando la heterogeneidad génica dentro de las mismas cepas que permiten la formación de grupos que se relacionaron con el origen geográfico pero además, sugirieron en que el análisis de los maxicírculos del ADN del kinetoplasto puede representar un método simple para diagnóstico en monitoreo epidemiológicos.

De acuerdo al análisis estadístico, no existe diferencia para el diagnóstico en las técnicas aplicadas. Aunque cabe aclarar que el examen efectuado por microscopía de luz se realizó en varias ocasiones durante dos semanas y fué necesario extraer las heces de los *triatomas* repetidas veces para corroborar si éstas eran o no positivas al diagnóstico. Durante la realización del presente estudio el resultado de algunos triatominos se prolongó hasta la tercer semana para confirmar la positividad o negatividad del examen, y aún se tenía la sospecha de que en algunas observaciones se tratara de *T. rangeli*, pues por observación al microscopio es imposible distinguir entre ambas especies. Consideramos que ELISA es una técnica específica y práctica, y es conveniente utilizarla cuando haya gran cantidad de muestras como sería el caso de un monitoreo epidemiológico, mientras que la RCP que es una técnica muy sensible y específica pero necesita de equipo costoso,

y se recomendaría utilizarla como prueba confirmatoria principalmente en resultados que caen dentro del intervalo de las lecturas de corte

CONCLUSIONES

Se implementó una técnica inmunoenzimática (ELISA) y otra de reacción en cadena de la ADN polimerasa capaces de detectar a *Trypanosoma cruzi* en heces de triatominos.

Se demostró que la cepa neolonesa de *T. cruzi* puede ser detectada por los anticuerpos específicos de ratón, generados por extractos de la cepa Y.

Se detectó la cantidad (mg/ml) utilizada en el primer anticuerpo, y se determinó la cantidad en microlitros de *T. cruzi* en las heces de triatominos obtenidos apartir de la estandarización de la tecnica de ELISA.

Los oligonucleótidos KNS1 y KNS2, diseñados para amplificar el ADN de los minicírculos del kinetoplasto de la cepa Y, CL y a la cepa mexicana Novoa, también amplifican con igual exactitud a los minicírculos del kADN de la cepa local, lo cual significa que estas comparten una región con secuencias altamente conservada, siendo posible liberarlos por la enzima de restricción *Nsi* I.

La sensibilidad y especificidad obtenida por la técnica de ELISA iguala o supera a los métodos de detección donde se usan técnicas tradicionales de campo, como son la fijación de complemento y hemaglutinación indirecta.

Se demostró que la técnica de ELISA y RCP identifican a *T. cruzi* en heces de triatominos, pero falta aún determinar su aplicación en pacientes chagásicos.

LITERATURA CITADA.

- Aguirre-Pequeño, E. 1947a. Una nueva distribución geográfica de los *Triatomas* naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana. *Arch. Med. Mex.* 8: 350-358.
- Aguirre-Pequeño, E. 1947 b. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomíneos de Nuevo León (Monterrey). *Arch. Med. Mex.* 8: 359-363.
- Anthony, R.L., C.M. Johnson & O.E. Sousa. 1979. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28:969-973.
- Araujo, F.G. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related Trypanosomatids. *J.Infect. Immunol.* 53:179-185.
- Avila, H.A., J.B. Pereira, O. Thielman, E. DePaiva, W. de Grave & C.M. Morel. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2421-2426.
- Burkholder, J.E., T.C. Allison & V. P. Kelly. 1980. *Trypanosoma cruzi* (Chagas) in invertebrate reservoir and human host of the Lower Río Grande Valley of Texas. *J. Parasitol.* 66:305-311.

- Castilla Martha M., M. Santos-Gomez. C. Guzman-Bracho & C.R. Bautista-Garfias. 1988. A new method for diagnosis of Chagas Disease: Diffusion-In-Gel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Parasit.* 74: 805-809
- Centurión-Lara A., L. Barrett & W.C. Van Voorhis. 1994. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 170:1334-1338.
- Davis, D.J. 1943. Infection in monkeys with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated in the United States. *U.S. Publ. Health Rep.* 59:1006-1010.
- De Souza, W. 1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cyt.* 86:197-283.
- Diaz, E. 1951. Doença de Chagas nas Americas. Estados Unidos. *Rev. Bras. Malariol.* 3:448-472.
- Díaz, C., V. Nussenzweig & A. Gonzalez. 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 616-623.
- Fleiss, J.L. 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2° ed. New York: John Wiley and Sons.
- Galaviz Silva L., J. M. Arredondo Cantú & H. Ramirez. 1991. House Triatomineae at San Juan de Vaquerías (ejido) in N.L. Méx. *Border Health.* 7:20-27.
- Galaviz-Silva L., F. Jimenez Guzmán, I. Fernandez Salas, Z.J. Molina Garza y J. A. Martinez Ibarra. 1991. Datos biológicos y comportamiento de *Triatoma*

gerstaeckeri (Stal) bajo condiciones de laboratorio. *Publicaciones Biológicas F.C.B. U.A.N.L.* 44-48 pp.

Galaviz-Silva L., E. Ramírez Bond y V. Vázquez Figueroa. 1992. Histotropismo y patogenicidad de *Trypanosoma cruzi* en ratón albino (NHI) aislado de triatomos en Nuevo León, México. *Bol. Chil. Parasitol.* 47:3-10

Goldsmith R.S., R.J. Zarate, L.G. Zárate, I. Kagan, L.B. Jacobson y G. Morales. 1986. Estudios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México, y un estudio complementario de siete años. Cerro del Aire. *Bol. of Sanit Panam.* 100:145-166.

Gruber, A. & B. Zingales. 1993. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp. Parasitol.* 76:1-12.

Hoffman, C.C. 1928. Nota acerca de un probable trasmisor de la tripanosomiasis humana, en el estado de Veracruz. *Rev. Mex. Biol.* 8:12-18.

Hoffman, C.C. 1939. Nota acerca de la alimentación de las larvas pequeñas de *triatoma* (Hemiptera, Triatomidae). *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Mex.* 10:343-346.

James M.B., W.G. Shreffler, D.E. Rosman, P.R. Sleath, C.J. March & S.G. Reed. 1992. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *T. cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1239-1243.

Jones, M. E., D.G. Colley, S. Tostes, E. Reis Lopes, C.L. Vnencak Jones & T.L. McCurley. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from

- inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:348-357.
- Lent, H. & P. Wygodzinski. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera. Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bull. of Am. Museum of Nat. Hist. New York.* 163:127-256.
- Maizels, R.M., M.L. Blaxter, B.D. Robertson & M.E. Selkirk. 1988. Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press.
- Martinez Ibarra A., L. Galaviz y C. Trujillo. 1992. Distribución de los triatominos asociados al domicilio humano en el municipio de General Terán, N.L. Méx. *Southwestern Entomol.* 17:261-265
- Martínez P., M de L. y E. Martín. 1981. Una nueva cepa de *Trypanosoma* tipo *cruzi* con localización peritoneal preferente. *Rev. Sal. Publ. Mex.* 23:23-24.
- Mazzotti, L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med. Mex.* 70:417-420.
- McDaniel, James P. & J.A. Dvorak. 1993. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. and Bioch. Parasitol.* 57:213-222.
- Monteón Padilla V.M., P.A. Reyes López y J.L. Rosales Encina. 1994. Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras experimentales por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa. *Arch. Inst. Cardiol.* 64:135-143.

- Packchianian, A. 1943. The infectivity of the Texas strain of *Trypanosoma cruzi* to man. *Amer. Trop. Med.* 23:309-314.
- Palencia, L y J.J. Julia. 1960. *Triatomas* transmisores de tripanosomiasis en Guaymas. *Rev. Fac. Medicina.* 2:493-497.
- Paranhos-Bacalla, G.S., M. R.M. Santos, P. C. Cotrim, A. Rassi, M. Jolivet, M. E. Camargo & J.F. Da Silveira. 1994. Detection of antibodies in sera from Chagas'patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasit. Immunol.* 16: 165-169.
- Quintal, R.E. & G.G. Polanco. 1977. Feeding preferences of *Triatoma dimidiata maculipennis* in Yucatán, México. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 26:176-18.
- Rojas, J.C., E.A. Malo, E. Espinoza-Medinilla & R.N. Ondarza. 1989. Sylvatic focus of Chagas disease in Oaxaca, México. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83:115-120.
- Requena, J.M., A. Jimenez-Ruiz, M. Soto, M.C. Lopez y C. Alonso. 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 51:271-280.
- Reyes, P., M. Mendoza Cifuentes, J. Marcuschamer y Z. García Coste. 1983. Miocardiopatía congestiva y tripanosomiasis americana. *Sal. Públ. Méx.* 25:139-144.

- Russomando, G., A. Figueredo, M. Almirón, M. Sakamoto & K. Morita. 1992. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J. C. Microbiol.* 92:2864-2868.
- Salazar-S., P.M. I, De Haro Arteaga & T. Uribarren B. 1988. Chagas disease in México. *Parasitol. Today.* 4:348-352.
- Secretaría de Programación y Presupuesto. Síntesis Geográfica de N.L. Anexo Cartográfico y Nomenclatura de N.L. Coordinación Nacional de Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática. 1981.
- Souto, Ricardo P. & B. Zingales .1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:45-52.
- Sullivan, T.S., T. McGregor, R.B. Eads & D.J. Davis. 1949. Incidence of *Trypanosoma cruzi* Chagas, in *Triatoma* (Hemiptera; Reduviidae) in Texas. *Am. J. Trop. Med.* 29:453-458.
- Tay, J., E. Navarrete C, E.R. Corominas y F. Blagi. 1966. La enfermedad de Chagas en el municipio de Tuxpan, Estado de Michoacan, México. *Rev. Fac. Med. Mex.* 8:263-270.
- Tay, J., P.M. Salazar-Schettino, M.I. Bucio, R. Zárate y L. Zárate. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Sal. Públ.Mex.* 22:409-450.
- Usinger, R.L. 1944. The Triatominae of North and Central America and the west Indies and their public health significance. *U.S. Publ. Health Bull.* 288:1-83.

- Velazco-Castrejón, O. y C. Guzman-Bracho. 1986. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 28:275-283.
- Velazco, C., J. Ramírez, B. Sánchez, F. Trujillo y C. Guzmán B. 1989. La enfermedad de Chagas en Jalisco, México. *Rev. Med. Parasitol.* 2:29032.
- Wincker, P., C. Britto, J. Borges Pereira, M.A. Cardoso, W. Oelemann & C.M. Morel. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 51:771-777.
- Williams, G.D., L.G. Adams, R.G. Yaeger, McGrant, W.K Read & W.R. Bilderback. 1977. Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. *Amer. Vet. Assoc.* 17:177.
- Woody., N.C. 1955. American trypanosomiasis (Chagas disease). First indigeneous case in the United States. *J. Amer. Med. Assoc.* 159:676-677.
- Zavala-Castro, J., O. Velazco-Castrejón & R. Hernández. 1992. Molecular characterization of mexican socks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 47: 201-209.
- Zarate, L.G., C.R. Zarate & C.H. Tempelis. 1980. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera:Reduviidae) in México. I Blood meal sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Entomol.* 17:103-116.
- Zarate, L.G. 1983. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera:Reduviidae) in México. III. Completion of the life cycle, adult

longevity and egg production under optimal feeding conditions. *J. Med. Entomol.* 20:485-497.

Zeledon, A.R., V.M. Guardia, A. Zuñiga & J.C. Swartzwelder. 1970. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation and size of adults. *J. Med. Entomol.* 7:313-319.

Zicker, F., P.G. Smith, A. O. Luquetti y O.S. Oliveira. 1991. Detección de Infectados por *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia, ELISA y hemaglutinación en suero y eluidos de sangre seca. *Bol of Sanit Panam* 110:489-497.

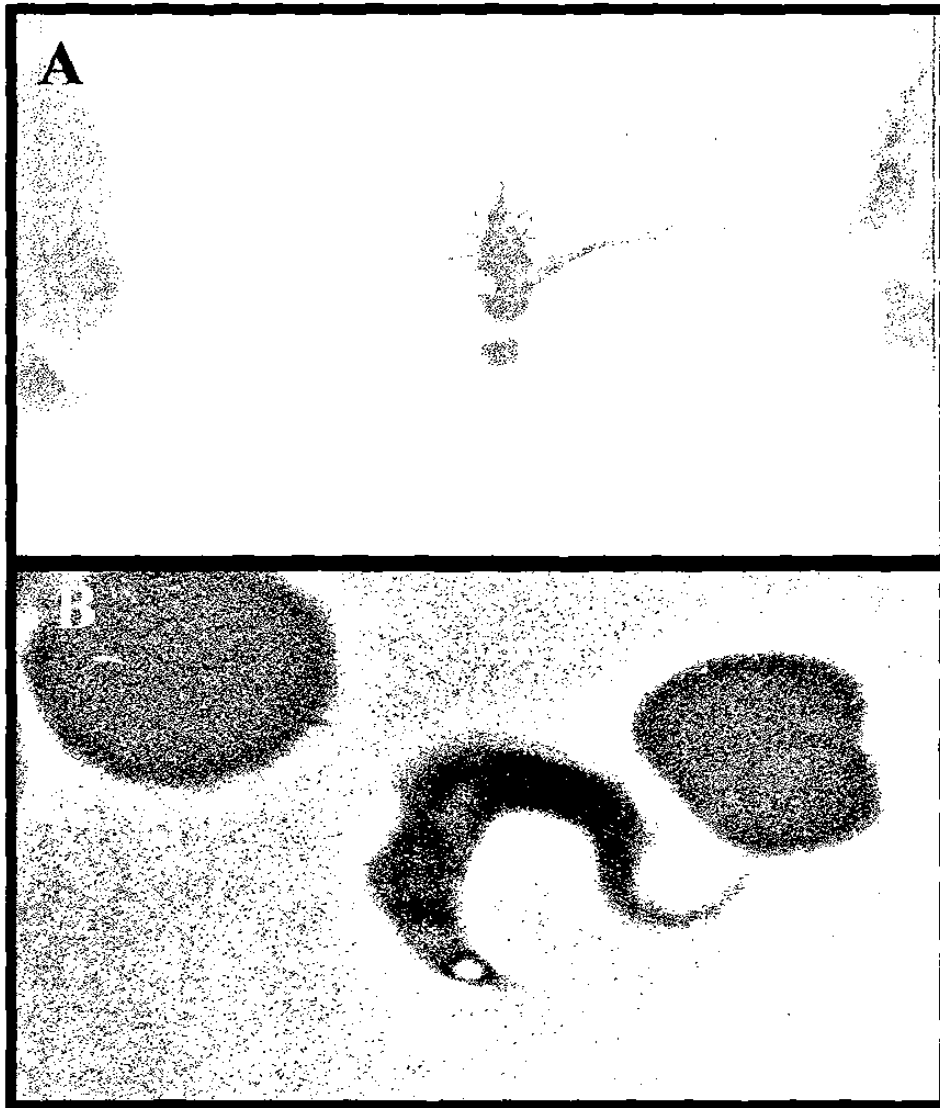


Foto 1. A: Obtención de deyecciones de una ninfa de cuarto estadio de *Triatoma* sp. para examen microscópico. B: *Trypanosoma cruzi* en forma típica de "C", detectado en 31 heces de triatominos colectados en Vaquerias, N.L.

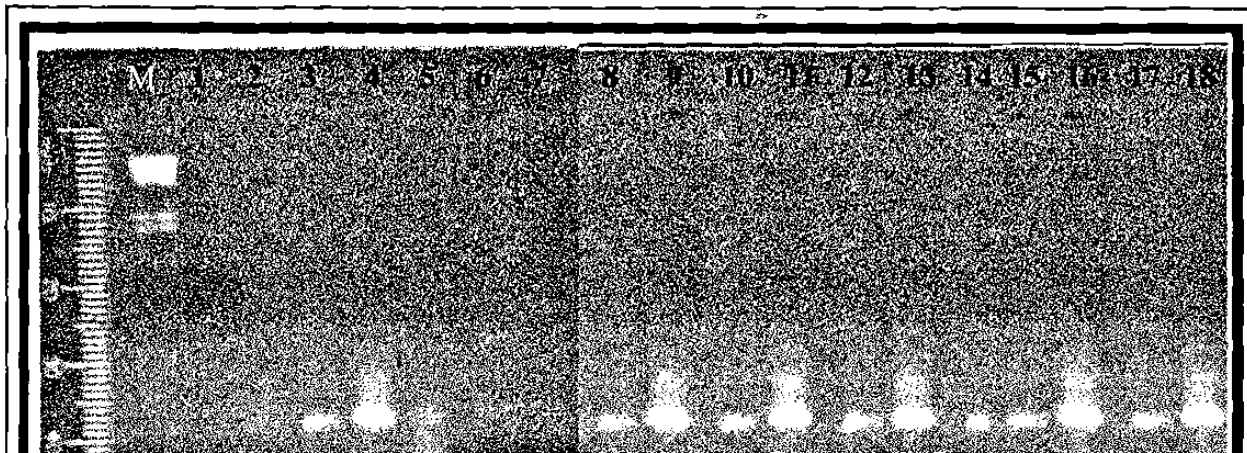


Foto 2. Amplificación del ADN de los minicírculos del kinetoplasto con los iniciadores KNS1 y KNS2 (Monteón Padilla y cols., 1996) en la cepa neolonesa de *T. cruzi*. M=Marcadores de pares de bases. Carril 1: Control negativo. Carril 2-5 y 8-18=Muestras de heces de *Triatoma gerstaeckeri* donde se identificó la presencia de *T. cruzi*, amplificándose una región de los minicírculos del kADN a partir de la extracción de ADN total, observándose productos de 320 pares de bases.

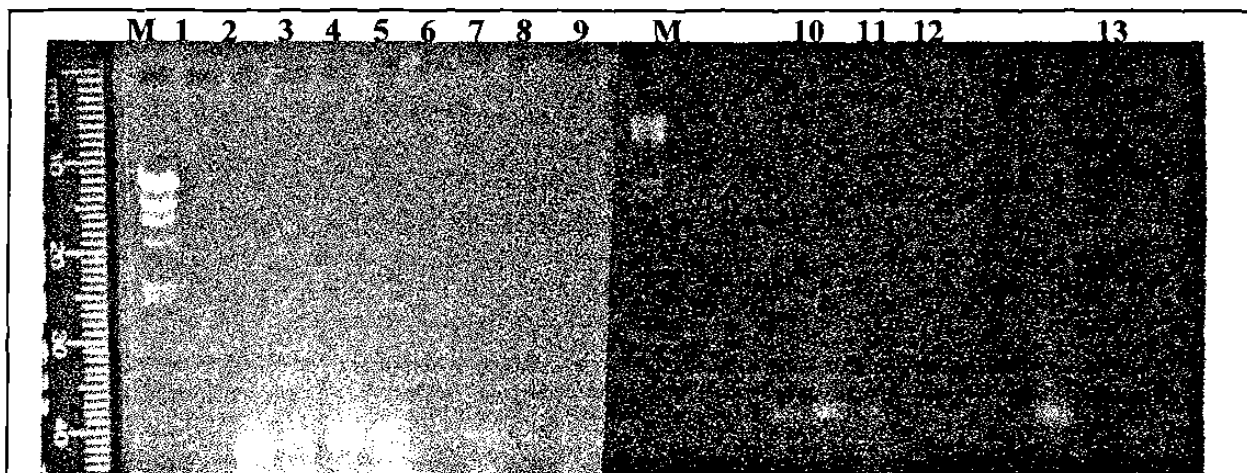
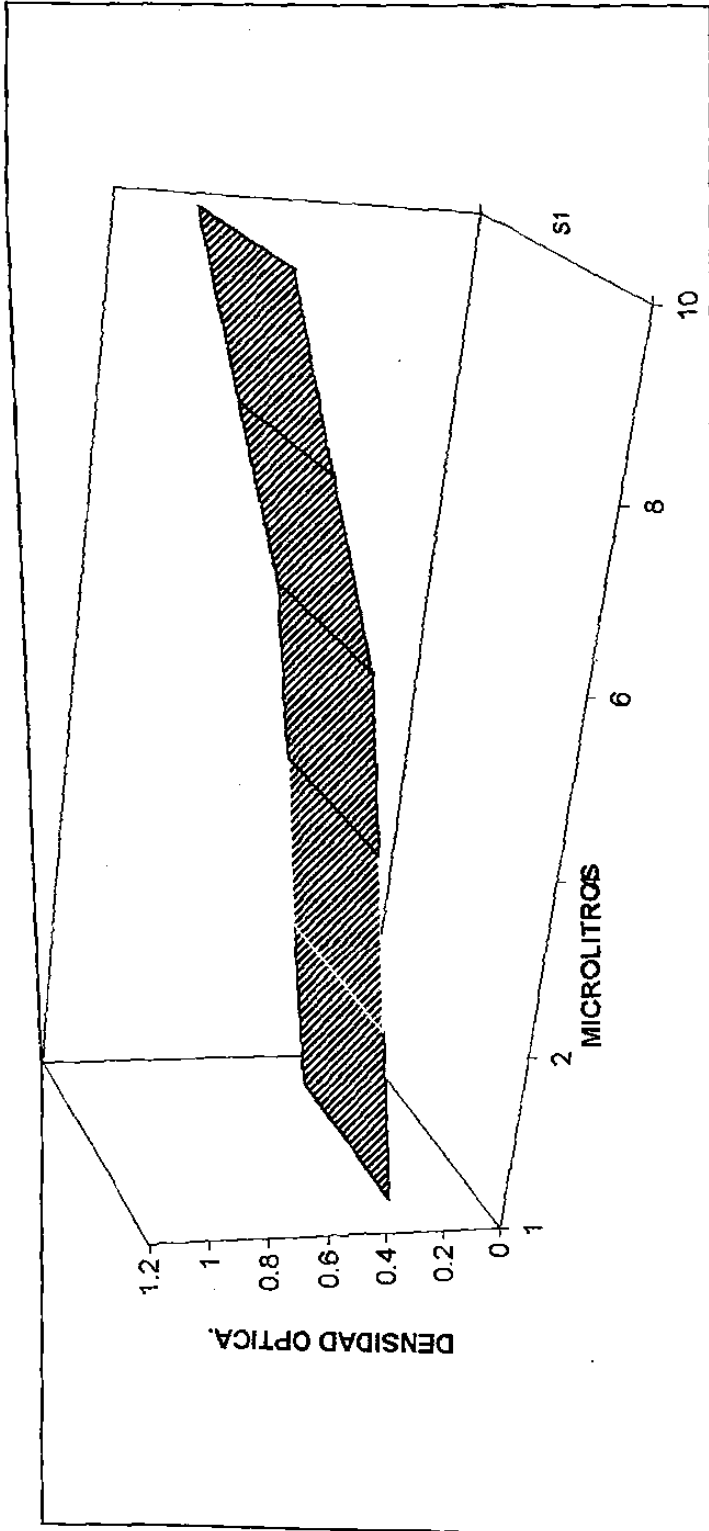
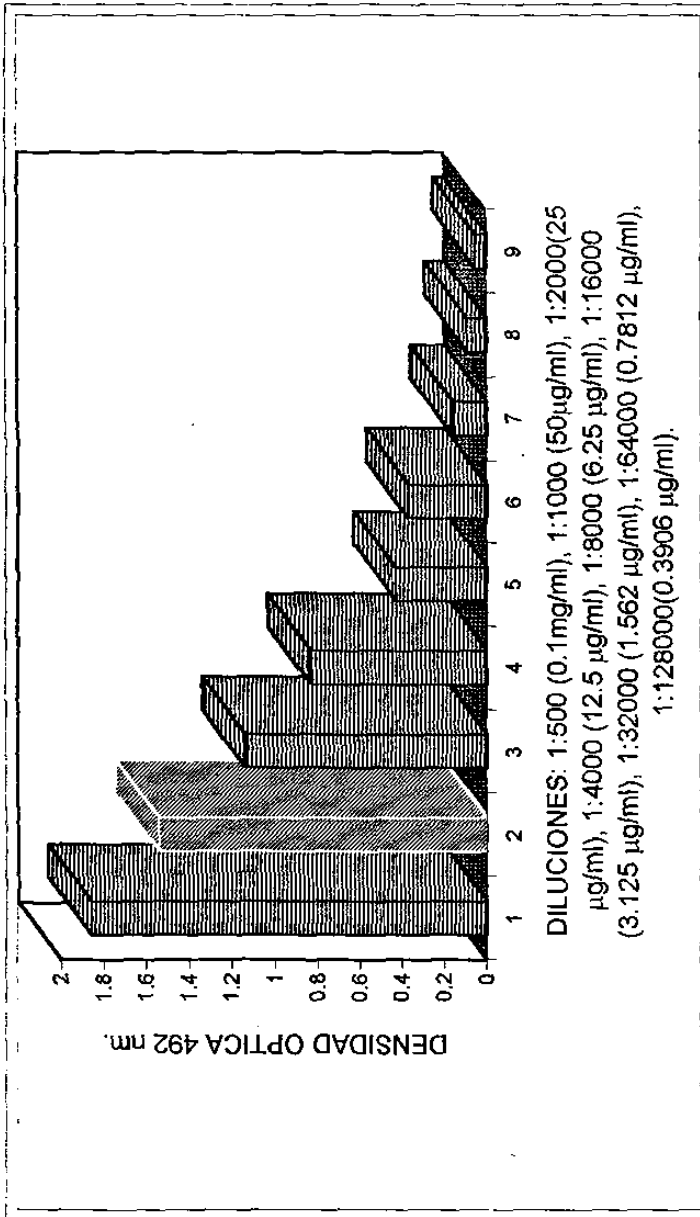


Foto 3. Detección del protozoario *T. cruzi* por medio de la amplificación del kADN en heces de triatomíneos colectadas en Vaquerías, Gral. Terán, N.L. M=Marcadores de pares de bases. Carril 1: Control negativo. Carriles 2-12: Producto amplificado de 320 pb. Carril 13: Control positivo de la cepa Y del protozoario.

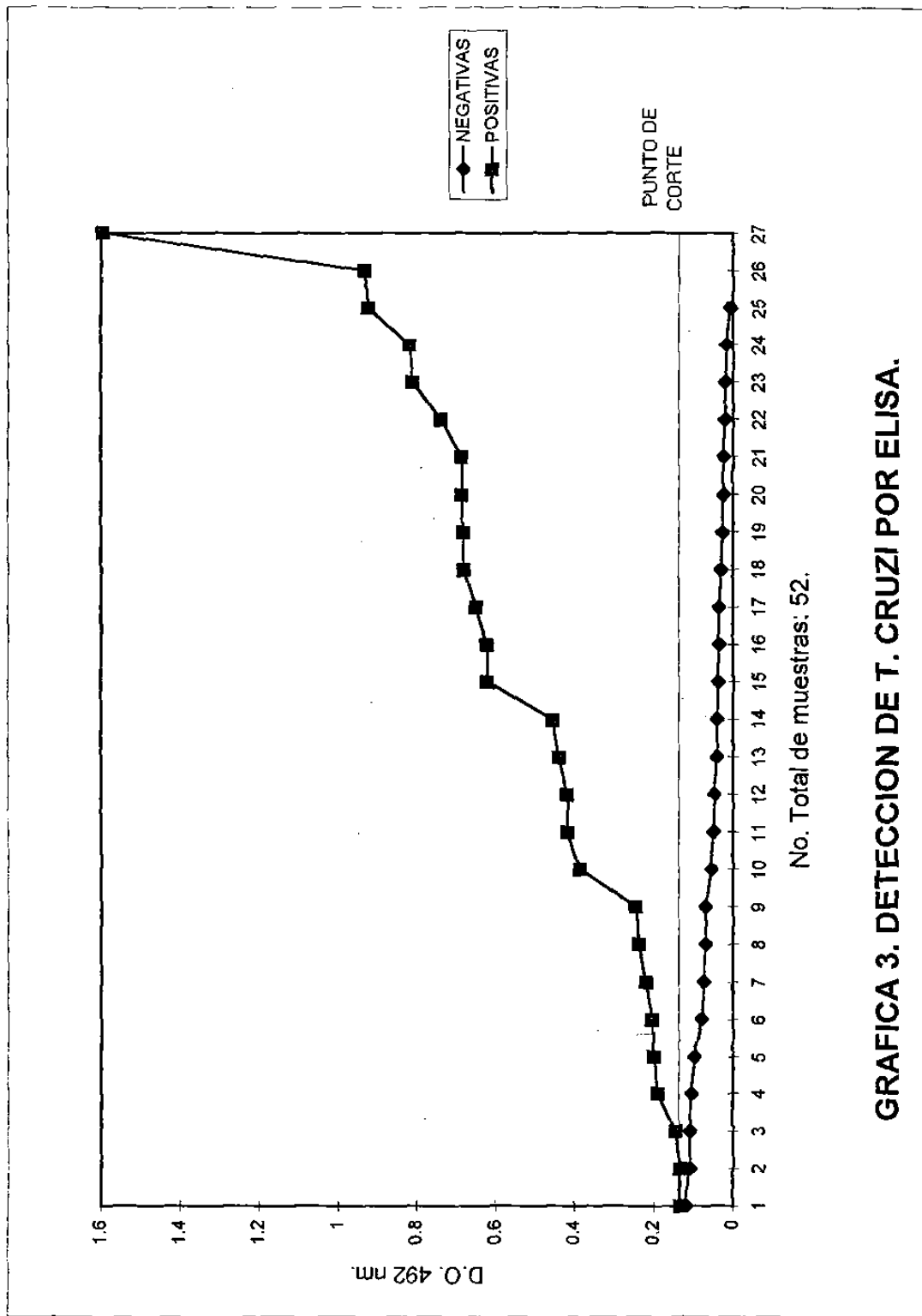
✓



GRAFICA 1. CURVA DE CALIBRACION DEL ANTIGENO DE LA CEPA Y.

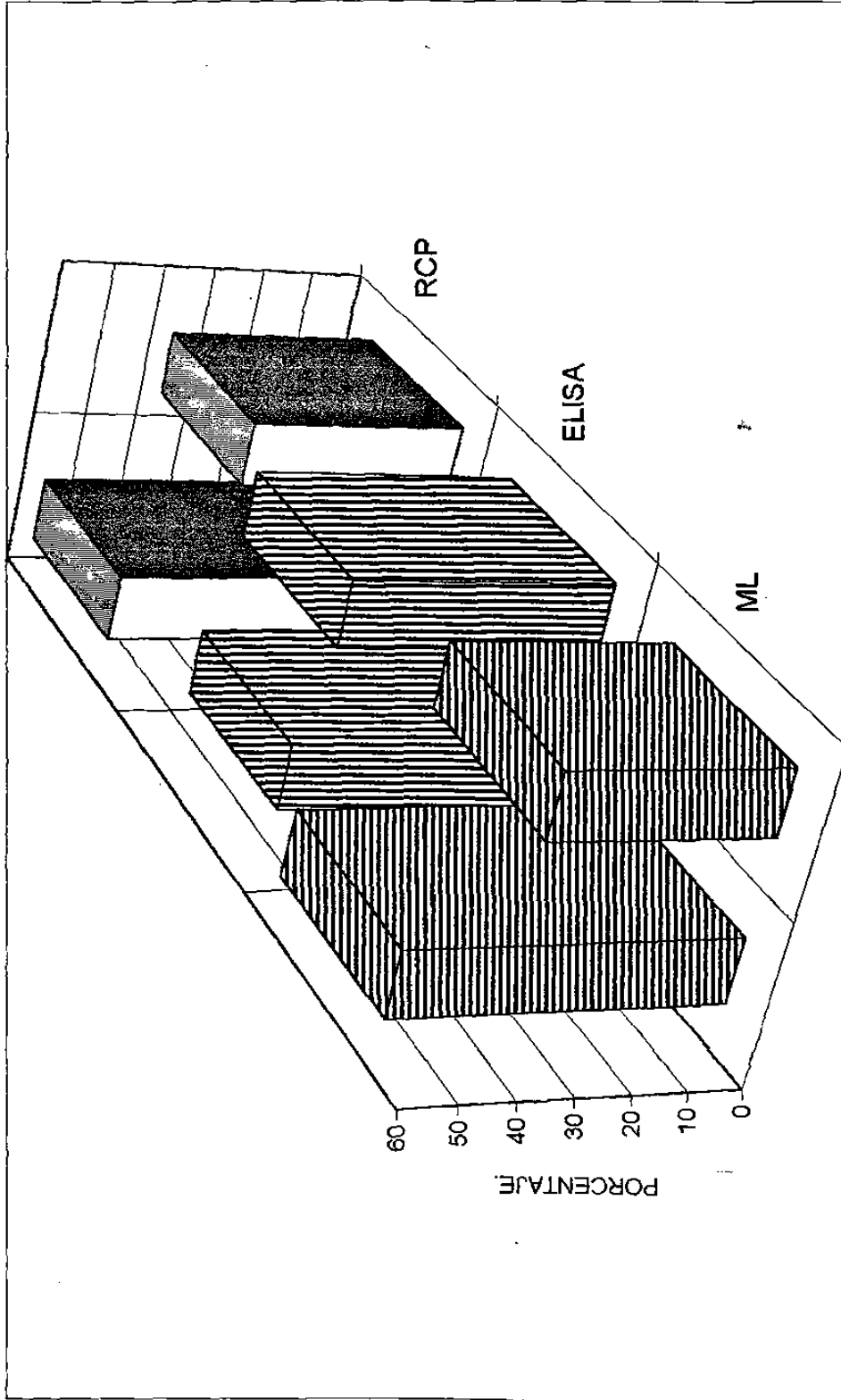


GRAFICA 2. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA, CEPA Y A PARTIR DE 50 mg/ml DEL HOMOGENIZADO.

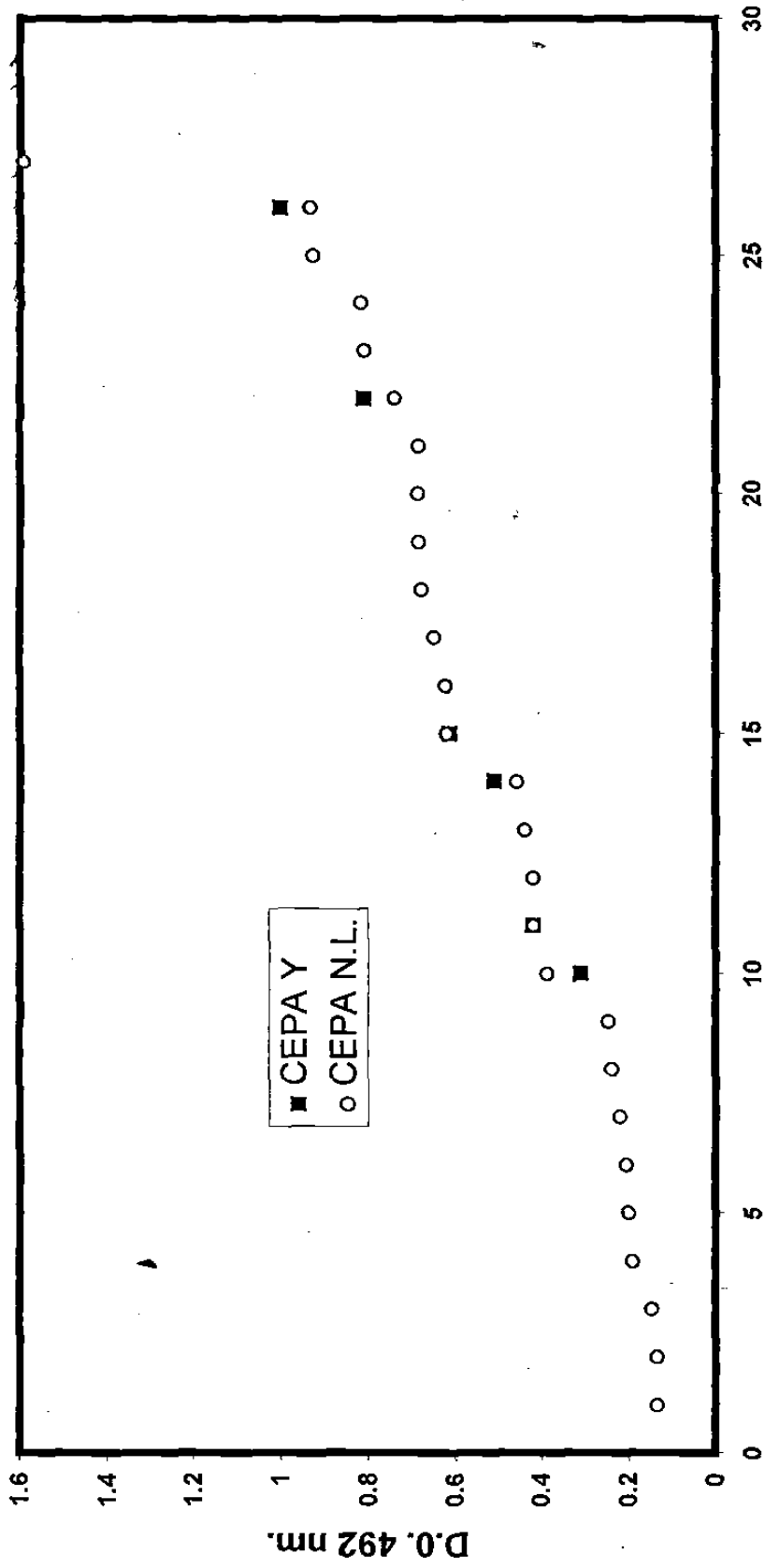


No. Total de muestras: 52.

GRAFICA 3. DETECCION DE T. CRUZI POR ELISA.



GRAFICA 4. COMPARACION DE TECNICAS EN PORCENTAJE.



GRAFICA 5. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE ANTIGENO DE LA CEPA N.L. A PARTIR DE LA CEPA Y.

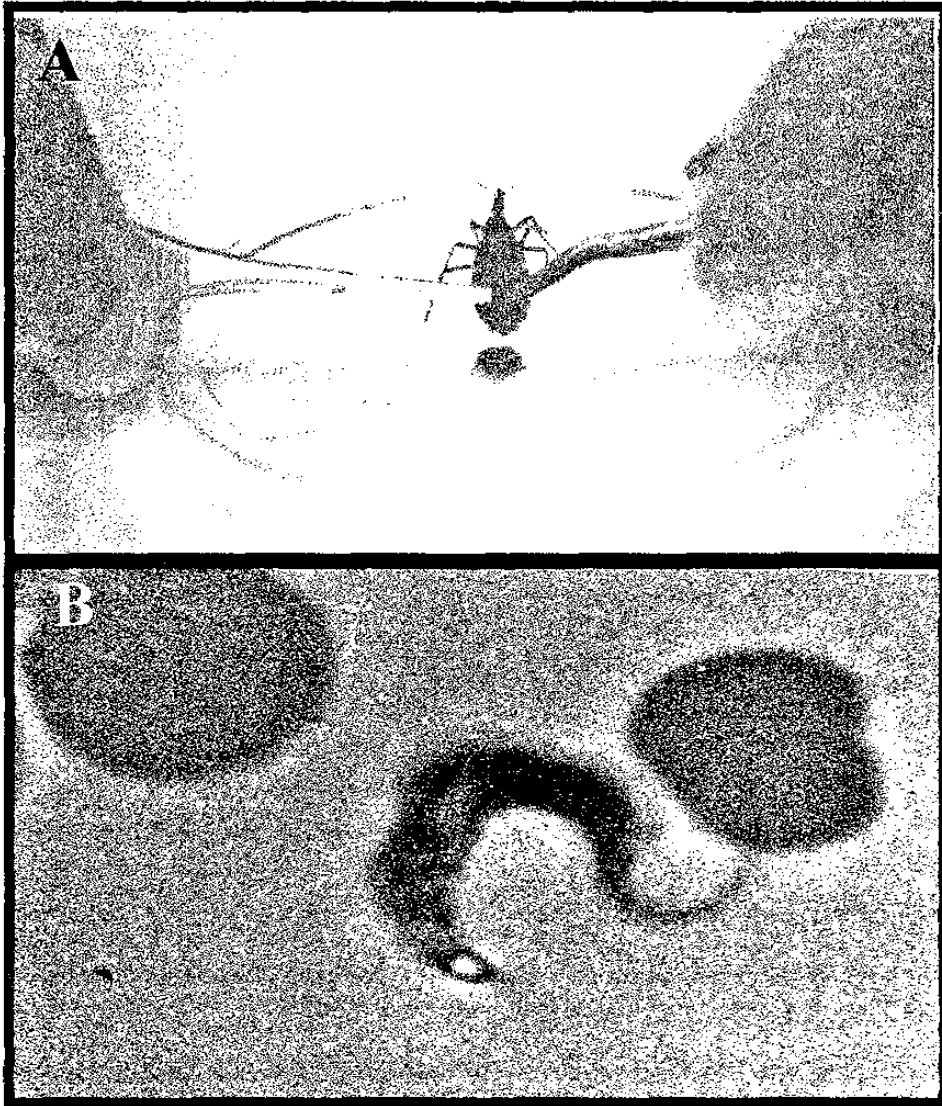


Foto 1. A: Obtención de deyecciones de una ninfa de cuarto estadio de *Triatoma* sp. para examen microscópico. B: *Trypanosoma-cruzi* en forma típica de "C", detectado en 31 heces de triatominos colectados en Vaquerias, N.L.

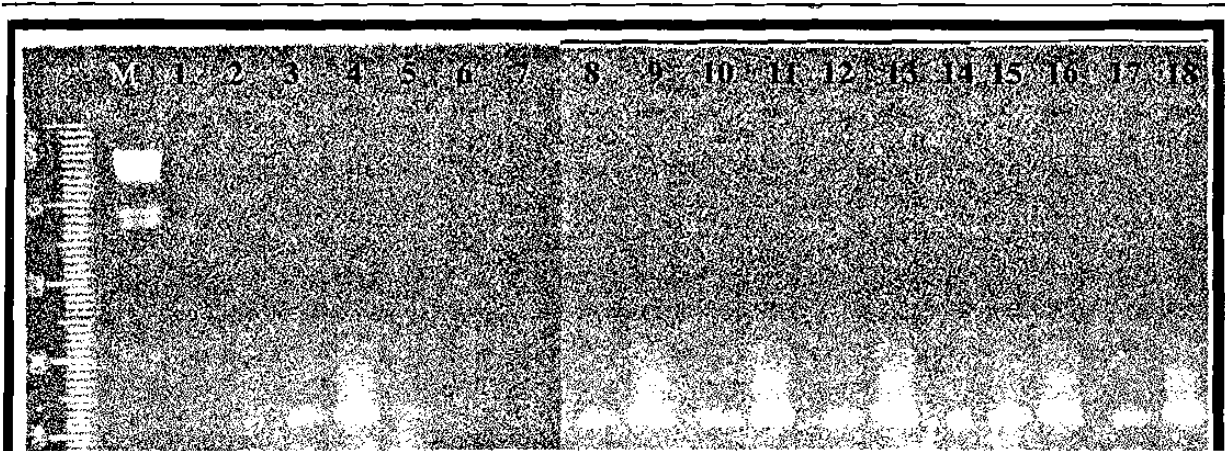


Foto 2. Amplificación del ADN de los minicírculos del kinetoplasto con los iniciadores KNS1 y KNS2 (Monteón Padilla y cols., 1996) en la cepa neolonesa de *T. cruzi*. M=Marcadores de pares de bases. Carril 1: Control negativo. Carril 2-5 y 8-18=Muestras de heces de *Triatoma gerstaeckeri* donde se identificó la presencia de *T. cruzi*, amplificándose una región de los minicírculos del kADN a partir de la extracción de ADN total, observándose productos de 320 pares de bases.

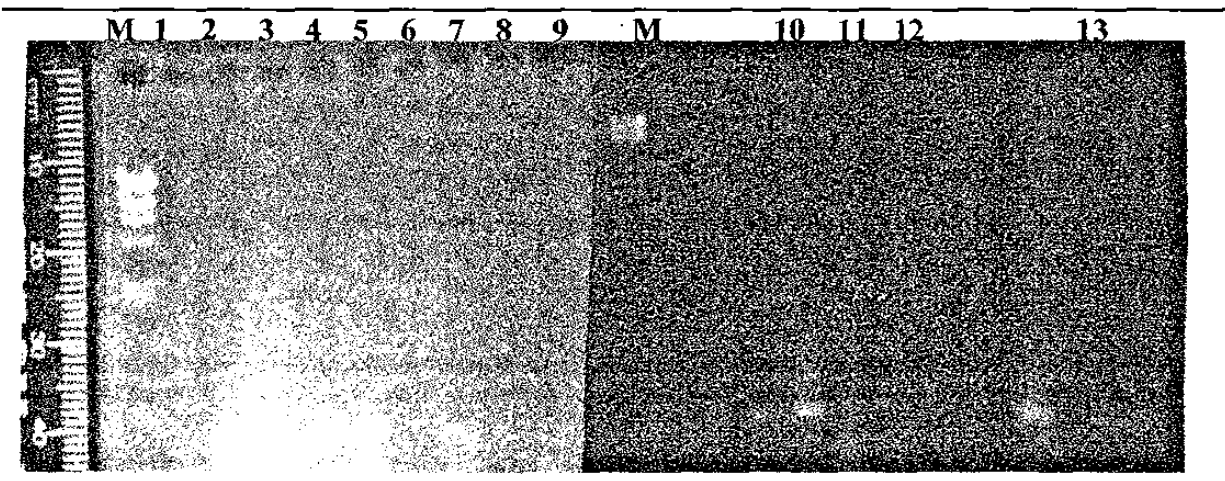


Foto 3. Detección del protozooario *T. cruzi* por medio de la amplificación del kADN en heces de triatomino colectadas en Vaquerias, Gral. Terán, N.L. M=Marcadores de pares de bases. Carril 1: Control negativo. Carriles 2-12: Producto amplificado de 320 pb. Carril 13: Control positivo de la cepa Y del protozooario.

