

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

T E S I S

Químico Farmacobiólogo



REACTORES A TRYPANOSOMA CRUZI EN LA
HUASTECA POTOSINA

PRESENTADA POR

María de los Angeles Galicia González

Artemisa Blanca Sánchez Nava

T

RC124

.4

G3

C.1



1080076929

Q.F.D.

G16r
1987

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

T E S I S

Químico Farmacobiólogo



**REACTORES A TRYPANOSOMA CRUZI EN LA
HUASTECA POTOSINA**

PRESENTADA POR

María de los Angeles Galicia González

Artemisa Blanca Sánchez Nava

T
RC124
.4
53



A nuestro asesor:

Le expresamos nuestro más sincero agradecimiento por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.

Dr. Carlos Garrocho Sandoval.

Jefe del Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina.

U.A.S.L.P.

Así como a las personas que colaboraron en la presente investigación.

Dr. Manuel Gutierrez Quiroz.

Jefe del Departamento de Inmunoparasitología.

Departamento de Ecología Humana.

Facultad de Medicina.

U.N.A.M.

Dr. John Ladd.

Responsable de la Clínica del Centro Cultural

MIBAMEX.

Cd. Santos, S. L. P.

I N D I C E

<i>Introducción.....</i>	<i>1</i>
<i>Generalidades.....</i>	<i>8</i>
<i>Material y métodos.....</i>	<i>17</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>31</i>
<i>Conclusiones.....</i>	<i>36</i>
<i>Resumen.....</i>	<i>40</i>
<i>Referencias.....</i>	<i>41</i>

I N T R O D U C C I O N

REACTORES A TRYPANOSOMA CRUZI EN LA HUASTECA POTOSINA

Trypanosoma cruzi (Chagas 1909) es el agente causal de la llamada Enfermedad de Chagas. Son sinónimos en la literatura mundial los siguientes: *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909; *Trypanosoma escomeli* Yorke, 1920; *Trypanosoma triatomae* Kofoid y McCulloch, 1916.

La enfermedad de Chagas es un problema que reviste características importantes de salud pública ya que, hasta donde se sabe, la enfermedad de Chagas esta confinada al hemisferio occidental. Se han encontrado casos de enfermedad en todos los países del continente americano. En varios países sudamericanos se han efectuado encuestas en gran escala, con las que se ha podido establecer que la infección ocurre en el hombre con más frecuencia y que la tripanosomiasis americana no solo produce enfermedad sino que frecuentemente causa la muerte. Se ha observado que la enfermedad existe en México y se han identificado casos humanos en los estados de Chiapas, Guanajuato, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Sonora, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (1, 2, 3, 4), pero es muy poco conocida por falta de encuestas epidemiológicas y por el escaso conocimiento de la enfermedad por parte del personal médico. Epidemiológicamente la enfermedad de Chagas es el resultado de la interacción de *T. cruzi* y el huésped humano susceptible, contenidos ambos en un medio ambiente propicio que los pone en contacto, favorecido este por la existencia de los mecanismos de transmisión.

En 1909 mientras realizaba estudios sobre paludismo en Brasil, Carlos Chagas descubrió un protozoario flagelado en el intestino de un hémíptero del género *Triatoma*, especie *Pastrongylus megistus*. Se dejó que las chinches infectadas picaran a un mono y el organismo fue encontrado después en la sangre de este animal. Posteriormente, Chagas encontró el mismo protozoario en la sangre de un niño que tenía fiebre, anemia, linfadenopatía y demostró que el parásito era la causa de una enfermedad endémica en ciertas zonas del Brasil. Chagas pensó erróneamente que el microorganismo se multiplica por esquizogonia durante alguna fase de su ciclo vital en el hombre y estableció por lo tanto el género *Schizotrypanum*. Designó a la especie con el nombre de "cruzi", en honor de su maestro, el Dr. Oswaldo Cruz (1). Puesto que pronto quedó claro que este concepto era falso, el mismo Chagas retiró el nombre y volvió a incluir la especie en el género *Trypanosoma*.

La respuesta inmune que sigue a una infección por *T. cruzi* es de gran ayuda para los propósitos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El parásito, al introducirse en el organismo, se multiplica y provoca la formación de anticuerpos, que pueden detectarse por medio de pruebas serológicas como fijación de complemento, hemaglutinación directa e indirecta, inmunofluorescencia y otras (5).

Aunque la mayoría de estas pruebas pueden ofrecer información útil.

existen grandes variaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad (6), consecuencia frecuentemente de deficiencia en su estandarización, debidas a una serie de factores tales como las variaciones en la composición de los extractos antigenicos y las diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* que se utilizan para la preparación del antígeno (7, 8, 9, 10).

Las reacciones serológicas para la demostración de anticuerpos contra *T. cruzi* son bastante específicas y no se observan regularmente reacciones cruzadas en otras enfermedades infecciosas, parasitarias o no, con excepciones de las encontradas al estudiar sueros de pacientes con leishmaniasis o como de tripanosomiasis africana (11). Tales estudios se han llevado a cabo con sueros de sangre extraída por punción venosa (12, 13).

Desde 1932 se han publicado estudios sobre distintas técnicas para la recolección de sangre para el diagnóstico serológico de algunas enfermedades parasitarias, cuya base era el uso de papel absorbente, con el objeto de evitar la punción venosa y el propósito de hacer fácil la conservación del material por analizarse. Las primeras pruebas serológicas efectuadas con pequeñas cantidades de suero fueron descritas para el estudio de sífilis, leishmaniasis, esquistosomiasis y tripanosomiasis (14).

En 1960, Maekelt ensayo distintos tipos de papel para el envío de

muestras de suero que habría de usarse para la fijación de complemento en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y se obtuvo una concordancia de un 86% en relación con la reacción practicada directamente en el suero (15).

En 1961, Sadun, Anderson y Williams (13), describieron un método simplificado para la colección, conservación, envío y examen de pequeñas cantidades de sangre para el diagnóstico de esquistosomiasis: Una gota de sangre obtenida por punción digital se absorbió en papel filtro y se probó por la técnica de anticuerpo fluorescente. Las muestras de sangre en papel filtro fueron conservadas a temperatura ambiente por durante 90 días sin cambio detectables en los títulos de anticuerpos (16). En un estudio posterior demostraron que es posible determinar la concentración de anticuerpos si la muestra seca se almacena durante dos semanas en condiciones variables de humedad y temperatura. Evaluaron también la sensibilidad y especificidad del método y sugirieron su posible utilidad en investigaciones epidemiológicas (7).

En 1963, Sadun recomendó el uso de muestras de sangre en papel filtro como un método simple y digno de confianza para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Comparó favorablemente sus resultados con los derivados de estudiar muestras de sangre obtenida por punción venosa (13).

En 1966, Souza - Camargo, estudiando la serología de la enfermedad de Chagas, reportaron que no se afecta la reactividad de las muestras de sangre absorbida en papel filtro cuando se mantienen a temperatura ambiente hasta 30 días. Compararon además las pruebas de fijación de complemento y de inmunofluorescencia, y obtuvieron una buena relación de los títulos de anticuerpos derivados de ambas técnicas al utilizar suero. Por último, recomendaron el método de inmunofluorescencia a partir de muestras de sangre en papel para el estudio serológico en poblaciones (17).

Neal y Miles, en 1970, adoptaron la técnica de hemaglutinación indirecta para su uso en eluidos de muestras de sangre coleccionadas en papel filtro, en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas y encontraron reacciones cruzadas con sueros de pacientes con leishmaniasis (12).

En 1971, Alvarez y col analizaron comparativamente los resultados de las pruebas de inmunofluorescencia practicadas simultáneamente en sueros frescos y en sangre recogida en diferentes tipos de papel. Se observó una buena conservación de las pruebas mantenidas a temperatura ambiente hasta por un lapso de 80 días (18).

Franco y Chamma describieron en 1973 una técnica de inmunofluorescencia indirecta. Utilizaron sueros, espécimenes de sangre absorbida en papel filtro y lograron obtener en ambas pruebas

resultados similares. Propusieron el método de recolección en papel filtro como base de una prueba rápida de selección cuando se trabaje con un número grande de muestras (19).

En 1974, Goldsmith y Kagan evaluaron tres pruebas utilizadas hasta entonces en estudios seroepidemiológicos de enfermedad de Chagas en Oaxaca, México, y aplicaron la técnica de conservación de sangre en papel filtro para su estudio. Encontraron una frecuencia del 29% de personas con anticuerpos contra *T. cruzi* y una mayor facilidad de manejo para la técnica de hemaglutinación indirecta (11).

En 1983, Salazar y col informaron dos nuevas localidades pertenecientes al estado de Querétaro y otra de Guanajuato, se encontró *Triatoma barberi*. Se hizo énfasis en el hallazgo debido a que estos dos estados no se habían señalado en la literatura médica con triatóminos transmisores de la enfermedad de Chagas (2).

Subsecuentemente a un caso crónico grave de enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, municipio de Putla, Oaxaca. Cortes y col, en 1985, realizaron un estudio serológico a la mayoría de los habitantes de este poblado y encontraron un 25% de positividad (3).

En 1986, Goldsmith y col informaron sobre los efectos patológicos en la infección en el hombre. Lograron aislar *Trypanosoma cruzi* en 45% de 33 sujetos seropositivos (4).

En función de lo anterior consideramos pertinente iniciar el trabajo cuyos resultados informamos aquí con los siguientes objetivos:

- 1.- Detectar la frecuencia, entre los que podemos suponer más expuestos en el estado de sujetos con inmunoglobulinas séricas capaces de reaccionar con componentes de *T. cruzi*, para ampliar la información sobre la incidencia de positividad serológica a enfermedad de Chagas en la zona de la Huasteca Potosina.
- 2.- Investigar las variaciones en los títulos de anticuerpos anti-*Tripanosoma - cruzi* al mantener las muestras coleccionadas en papel filtro a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 días.
- 3.- Determinar si en nuestras manos es útil la prueba de hemaglutinación indirecta con muestra de sangre absorbidas en papel filtro para estudios serológicos y encuestas epidemiológicas de la enfermedad de Chagas.

CLASIFICACION

Reino	<i>Animalia.</i>
Phylum	<i>Protozoa.</i>
Subphylum	<i>Sarcomastigophora.</i>
Superclase	<i>Mastigophora.</i>
Clase	<i>Zoomastigophora.</i>
Género	<i>Trypanosoma.</i>
Especie	<i>cruzi.</i>

MORFOLOGIA

Trypanosoma cruzi es un organismo pleomorfo que tiene dos fases en su ciclo vital, una en el hombre o huéspedes reservorios y otra en los insectos transmisores. En el huésped mamífero se encuentra el organismo en la sangre con la forma característica de tripanosoma, mientras que las células del sistema reticuloendotelial y de otros tejidos adopta la forma típica de leishmania, y durante su transformación también en forma de leptomonas, critidia y tripanosoma. En el hombre el tripomastigote ("tripanosoma") vive en la sangre especialmente en los periodos agudos de la infección. Es un flagelado alargado, fusiforme que mide de 20 a 25 micras de longitud por 3 - 7 micras de ancho. Presenta un núcleo voluminoso cerca de la parte central del cuerpo, un cinetoplasto que consta de

un blefaroplasto puntiforme y de un corpúsculo parabasal ovoide de mayor tamaño. La raíz del flagelo, el axonema, nace en el blefaroplasto y se extiende por el borde de una delgada membrana ondulante que tiene pocos pliegues y sale por el extremo anterior del cuerpo como flagelo libre. Este estadio no se divide en la sangre y solo se multiplica en las células del sistema reticuloendotelial, músculo cardíaco, estriado y liso (20).

Dentro de estas células el tripomastigote sanguíneo se transforma en amastigote ("leishmania"), la membrana ondulante y el flagelo desaparecen. Son formas redondas u ovoides miden alrededor de 2 a 4 micras de diámetro, su protoplasma contiene un núcleo, un cinetoplasto con aspecto de bacilo y un rizoplasto colocado perpendicularmente al cinetoplasto. Estos organismos se multiplican por fisión binaria, que mediante divisiones sucesivas, llenan la célula invadida y la destruyen. En los histiocitos fijos y emigrantes en particular en el bazo, hígado, ganglios linfáticos y médula ósea, las formas de leishmania se comportan como leishmania donovani. En el insecto transmisor *T. cruzi* presenta la morfología de critidia y de tripanosoma metacíclico. Las formas de epimastigote (critidia) son fusiformes, miden alrededor de 20 a 25 micras de largo por 2 a 4 micras de ancho, el cinetoplasto a migrado desde la porción anterior del cuerpo hasta una porción por detrás del núcleo: el flagelo forma una pequeña membrana ondulante.

Este estadio se multiplica en el intestino de los triatóminos, para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos que consta de un cinetoplasto en el extremo posterior, una membrana ondulante bien desarrollada y un flagelo libre.

LOCALIZACION

Desde el punto de vista morfológico esta especie de tripanosoma vive en la sangre como tripanosoma típico; en las células del sistema reticuloendotelial y otros tejidos del hombre y de varios animales, como leishmania y en el intestino de algunos insectos como critidia y tripanosoma metacíclico. En el hombre, la localización mas frecuente en el parásito es en las células reticuloendoteliales del bazo, hígado, ganglios linfáticos, tejido linfático y en el miocardio. A veces invade también las células de los músculos de fibra estriada, médula ósea, suprarrenales, testículos, ovarios y sistema nervioso. Los parásitos se encuentran asimismo en los histiocitos del tejido subcutáneo y en las células de la epidermis y de la mucosa intestinal. .

CICLO BIOLÓGICO

La vida de *T. cruzi* comprende dos ciclos de desarrollo: uno en el hombre o huéspedes mamíferos reservorios y otro en el interior de ciertos insectos. El vector se infecta al chupar la sangre del hombre o mamíferos con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector. Su evolución se divide en tres fases: formas redondas en el estómago (esferomastigotes), epimastigotes en el intestino medio, que se multiplican por fisión binaria y tripomastigotes metacíclicos, infectantes para el huésped vertebrado. Los triatominos infectados, al picar al hombre y después de una ingestión abundante de sangre, defecan sobre la superficie de la piel; al frotarse esta sobre la piel, contamina el sitio de la picadura y los parásitos penetran al tejido. Las heces infectantes llegan a la conjuntiva al ser depositadas en la hendidura palpebral o bien el mismo paciente, a través de sus manos. Cuando los tripomastigotes metacíclicos infectantes entran al organismo, son fagocitados por los macrófagos de la región y englobados en el fagosoma, de donde escapan y se dirigen al citoplasma. Ahí se transforman en amastigotes y se multiplican por división binaria. Mas tarde se diferencian en tripomastigotes, que rompen las células y llegan a la circulación sanguínea y linfática. Para luego invadir diversos órganos en cuyas células penetran para transformarse en amastigotes (leishmanias) (21).

TRANSMICION

Los géneros transmisores más comunes son:

Panstrongylus megistus.

Triatoma infestans.

Rhodnius prolixus.

Algunas especies tienen marcados hábitos intradomiciliarios y se les ha encontrado en grietas, orificios, techos de paja y palma de las casas o chozas de adobe, principalmente en las localidades suburbanas y rurales.

En áreas endémicas, la transmisión de la enfermedad ocurre fácilmente cuando esta presente el hombre susceptible a la infección; la transmisión de *T. cruzi* de hombre a hombre en México se debe sobre todo a especies del grupo *protracta* - *phylosoma* - *pallidipennis*. Puede transmitirse también por otros mecanismos.

- Transfusiones (es viable a 4 grados C hasta por dos meses).
- Placentario (Para la segunda mitad de la gestación los tripomastigotes atraviesan la placenta).
- Accidental.
- Ingestión de leche materna.
- Manipulación de animales infectados.
- Infecciones en el laboratorio.

Generalmente el hombre se puede infectar por contaminación de la herida que causa el insecto transmisor con las heces del mismo que contenga tripomastigotes metacíclicos. Esto se realiza fácilmente, ya que los triatomas evacúan obligados por la plenitud abdominal resultante de la voracidad con que comen y las heces contaminadas al extenderse, permiten que se introduzca el tripomastigote metacíclico en la herida o bien, el individuo puede facilitar la infección al rascarse. Los tripomastigotes pueden penetrar por vía nasal, oral, conjuntival y dérmica (20, 21).

PATOGENIA

Trypanosoma cruzi penetra a través de la piel indemne, la mayor parte de las infecciones humanas resultan del depósito en las mucosas expuestas a los excrementos semilíquidos de las chinches infectadas en particular del ángulo palpebral externo y alrededor de las ventanas nasales y de los labios.

Los organismos invasores penetran o son englobados por histiocitos del corión e invaden las células adiposas del tejido subcutáneo y las fibras musculares situadas debajo del lugar de inoculación. Durante unos tres días los parásitos se multiplican en forma de leishmania. Después, hacia el cuarto o quinto día, al romperse la célula parasitada, se produce la primera infiltración de los leucocitos PMN, monocitos y linfocitos lo que se acompaña de

movilización y proliferación de los histiocitos regionales, en particular de los ganglios linfáticos contiguos. Este foco inflamatorio se continua y los histiocitos tienden a ocupar casi todo el centro, pero en la periferia se concentran leucocitos neutrofilos, con encapsulación fibrotica eventual. Esta es la lesión primaria característica (chagoma), que bloquea los capilares linfáticos y produce edema local.

Desde este sitio primitivo de desarrollo se producen metástasis de las formas de leishmania hacia los ganglios linfáticos satélites, pero tarde o temprano se distribuyen a través de los vasos sanguíneos y linfáticos llegando a los ganglios linfáticos axilares e inguinales, bazo, hígado, médula ósea y ganglios mesentericos y se multiplican en los histiocitos fijos; fibras musculares, particularmente en el miocardio; neuroglia, microglia y células piramidales de la corteza cerebral, corteza suprarrenal, tiroides, órganos sexuales y mucosa del intestino (22).

SINTOMATOLOGIA.

Existen dos formas de la enfermedad de Chagas, aguda y crónica. La enfermedad predomina principalmente en los niños.

La forma aguda se observa en niños, pero también en adultos. Se caracteriza por fiebre elevada, por el depósito de material mucoso en los tejidos que causa tumefacción a veces de todo el cuerpo. La cara está hinchada, se presenta edema palpebral intenso (signo de Romãña) de uno o ambos ojos y el niño parece sufrir mixedema, pero la tumefacción no es blanda y la piel está seca.

Las glándulas tiroideas, preauricular, paratiroides y submaxilar, los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado se encuentran aumentados de tamaño por lo general. Se presenta anemia, pérdida marcada de fuerza frecuentemente taquicardia. Durante el período agudo y las posteriores exacerbaciones febriles es posible encontrar los tripanosomas en la sangre periférica.

La forma crónica se observa en niños que sobreviven a la aguda, pero es más común en los adultos. Los síntomas de esta fase están relacionados con el daño sufrido durante la fase aguda de la enfermedad. El carácter de los síntomas, depende de la localización principal de los parásitos intracelulares durante este tiempo.

Aparece con el tiempo dilatación del esófago (megaesófago) y del colón (megacolón). Estas manifestaciones son debidas al peristaltismo desordenado como resultado de la destrucción de los ganglios autónomos que están dentro de las paredes viscerales.

En este estado crónico se presenta a veces paroxismos fébriles, durante los que suelen encontrarse tripanosomas en la sangre; el exámen de esta resulta generalmente negativo cuando no hay fiebre (23, 24, 25).

MATERIAL Y METODOS.

1. LUGAR DE ESTUDIO.

Municipio de Ciudad Santos (Tancahuitz), Estado de San Luis Potosí.

De acuerdo con la clasificación de Koeppen, la gran región geográfica llamada " Huasteca" tiene un clima al que correspondería la denominación de trópicos lluviosos. Las lluvias tienden a ocurrir sobre todo en verano. La temperatura media anual supera a los 18 grados C y la precipitación pluvial alcanza un índice anual superior 1000 mms. La vegetación en la parte plana es de tipo sabana y en las proximidades de la Sierra Madre Oriental es típica de bosque trópicos (26).

2. RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

Se recortaron tiras de papel filtro marca Ederol, tipo 310G, a un tamaño de 2.54 por 7.62 cms, y en cada una se dibujaron dos círculos de 12 mm de diámetro; en volumen de sangre que puede absorberse dentro de cada círculo es de 0.06 ml. Se toman dos muestras por punción digital o del lóbulo auricular de cada individuo en cada tira, que se marca para su identificación.

Se estudiaron un total de 240 individuos de ambos sexos que acudieron a la clínica del Centro Cultural Mibamex, ubicada en la cabecera del Municipio de Ciudad Santos, S. L. P., entre los meses de enero a marzo de 1987, con edades entre los diez y los ochenta años, todos ellos indígenas huastecos habitantes del medio rural. Las muestras fueron tomadas personalmente por el Dr. John Ladd, responsable principal de la clínica. Se dejó secar la sangre en cada tarjeta de papel filtro y se guardó a temperatura ambiente dentro de un sobre de celofán. El total de las muestras se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento de su proceso, que se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

PREPARACION DE ANTIGENO.

Se utilizó un antígeno preparado de acuerdo a la técnica descrita por Fong (27), que nos fue suministrado amablemente por el Dr. Manuel Gutiérrez, del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México.

Se partió de una suspensión de antígeno crudo obtenido de promastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

a) Cultivo de *Trypanosoma cruzi*.

Promastigotes de *Trypanosoma cruzi* se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 125 ml con un medio difásico, cuya fase sólida se prepara con la fórmula siguiente:

Infusión de agar cerebro corazón	37 gr
Dextrosa	10 gr
Agar	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Después de disolver los ingredientes, el medio se distribuye en cantidades de 25 ml y se esteriliza en autoclave. A continuación se calienta a 46 grados C aproximadamente y se le agregan 2 ml de sangre fresca defibrinada de conejo, se mezcla bien con la base de agar y se deja solidificar. Se adicionan 5 ml. solución salina estéril 0.85% y se prueba para esterilidad incubando a 37°C durante 18 horas. Los medios inoculados se incubaron a 25°C hasta lograr un máximo de crecimiento (7 a 10 días).

b) Elaboración del antígeno crudo.

Un inóculo con 3,000 000 de promastigotes por ml. se inoculara en un medio difásico sin sangre hasta que se alcanzó un máximo de crecimiento el sobrenadante se centrifugó y se liofilizó.

c) Preparación de la solución de antígeno.

Se utilizó como antígeno un extracto salino de promastigotes de *Trypanosoma cruzi* deslipidizados con benceno.

Se colocaron 50 mg del parásito liofilizado en un homogenizador de 50 ml y se le agregaron poco a poco 25 ml de benceno antes de romper los parásitos. Después de reposar 5 minutos y el sedimento se seco al vacío. Se llevó el polvo a un homogenizador suspendido en 5 ml de agua destilada y se homogenizó 10 minutos. Luego se agregaron 5 ml de merthiolato al 1: 5000 en solución salina y se volvió a homogenizar 10 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm otros 10 minutos y el sobrenadante se separó en alícuotas de 1 ml antes de liofilizarlo.

4. ELUCION DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.

Se recortó cuidadosamente el disco de papel filtro impregnado de sangre y se colocó en un tubo de ensaye en el que se pipetearon 0.4 ml de buffer de fosfatos pH 7.2. Se comprimió el disco con una varilla de vidrio y dejó eluir un mínimo de 90 minutos a temperatura ambiente (el período de elución puede prolongarse toda la noche).

El eluido es una dilución 1: 16 de suero, puesto que el papel filtro de 12 mm. de diámetro absorbe 0.06 ml. de sangre. Si asumimos un hematocrito promedio de 45%, esto equivale a 0.027 ml de suero.

5. PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

Se empleó la técnica de Boyden (28, 29) que utiliza eritrocitos de carnero tratados con ácido tánico y sensibilizados con antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

a) Preparación de reactivos.

* Citrato de sodio 3.8%

Citrato de sodio..... 3.8 gr
Agua destilada.....100.0 ml

Se prepara la solución y se esteriliza en autoclave a 15 lbs. por 15 minutos. Conserva su actividad en refrigeración durante un mes. La proporción usada fue de 27 ml de solución por 23 ml de sangre de carnero.

* Soluciones amortiguadoras de fosfatos.

Soluciones madre:

A) Solución de fosfato disódico monohidrogenado.

[0.15M Na_2HPO_4]

Na_2HPO_4 21.3 gr
Agua destilada cbp.....1000.0 ml

B) Solución de fosfato de potasio dihidrogenado.

[0.15M KH_2PO_4].

KH_2PO_4 20.4 gr

Agua destilada cbp.....1000.0 ml

c) Solución de cloruro de sodio.

[0.15M NaCl].

NaCl 8.8 gr

Agua destilada.....1000.0 ml

Soluciones de trabajo.

	(PBS 6.4)	(PBS 7.2)
Solución de Na_2HPO_4 0.15M.....	32.3 ml	76 ml
Solución de KH_2PO_4 0.15M	67.7 ml	24 ml
Solución de NaCl 0.15M.....	100.0 ml	100 ml

* Solución de ácido tánico 1: 20 000.

Acido tánico..... 0.1 gr

PBS pH 7.2.....10.0 ml

Se tomó 0.1 ml de esta solución y de le agregaron 19.9 ml de PBS 7.2.

* Solución 1: 100 de suero de conejo.

Suero normal de conejo..... 1 ml

PBS pH 7.2.....99 ml

b) Lavado de eritrocitos.

La cantidad de eritrocitos a utilizar se retiró del matraz junto al mechero y, previa agitación, se repartieron en cantidades de 4 ml.

Por tubo de centrifuga. Se aforó a 12 ml con PBS pH 7.2. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se aforó de nuevo a 12 ml con PBS. El procedimiento se repitió 4 veces.

c) Tanado de glóbulos rojos.

Después de retirar el sobrenadante del último lavado se midió la altura del paquete de eritrocitos y suspendió en 4 ml de PBS 7.2 por cada 0.1 ml del paquete, para lograr una suspensión al 2.5%; se agregó un volumen igual de ácido tánico 1: 20 000, se incubó en baño de

temperatura constante a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. El paquete se ajustó de nuevo a una proporción de 2.5% en PBS 6.4 (4 ml de PBS 6.4 por cada 0.1 ml de paquete).

d) Determinación de la concentración óptima del antígeno.

Se efectuaron diluciones del antígeno 1: 20, 1: 40, 1: 80 y 1: 160 con PBS pH 7.2 y se sensibilizaron eritrocitos tanados con cada dilución. Los eritrocitos fueron luego probados por la técnica de microhemaglutinación. La máxima dilución que produjo hemaglutinación se consideró la dilución óptima del antígeno.

e) Sensibilización de eritrocitos para microhemaglutinación.

Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión óptima del antígeno y de células tanadas al 2.5%. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y se agregó 1 ml de suero normal de conejo al 1%. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se lavó dos veces el sedimento con suero normal de conejo al 1% en PBS 7.2 y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. El paquete de células se ajustó al 1.5% con suero de conejo normal al 1% (0.1 ml de células más 6.6 ml de suero).

f) Técnica de microhemaglutinación.

Se colocaron 0.05 ml de suero de conejo a 1: 100 en cada una de las pozas de la placa de microtitulación, con excepción de la primera, en la que se le puso 0.1 ml del suero problema. Se hicieron 11 diluciones dobles seriadas y se desecharon 0.05 ml de la última poza y mezclaron bien. Se agregaron 0.025 ml de la suspensión al 1.5 % de las células sensibilizadas a cada una de las pozas. Se agitaron manualmente las placas durante 5 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 3 horas hasta que las células sedimentaron completamente, antes de hacer la lectura.

* PRUEBA POSITIVA. Hay aglutinación completa de las células.

Se tomó como punto final a la última poza donde haya formación de un anillo de células (aglutinación parcial).

* PRUEBA NEGATIVA. Estuvo indicada por la sedimentación de las células que en un paquete compacto en el fondo de la poza (ausencia de aglutinación).

g) Principio de la reacción.

El antígeno en solución de *Trypanosoma cruzi* se adhiere a la superficie del glóbulo rojo tratados con ácido tánico por adsorción inespecífica. En la reacción siguiente que utiliza anticuerpos dirigidos contra estos antígenos la reacción antígeno - anticuerpo.

provoca una aglutinación de los glóbulos rojos portadores.

Generalmente se supone que el ácido tánico actúa sobre los glóbulos rojos de tal modo que provoca una mayor adsorción de los antígenos, pero se ha demostrado que las células rojas adsorben tales antígenos y llegan a ser aglutinadas sin la adición de ácido tánico, su sensibilidad es baja. Estudios posteriores de Boyden han establecido que la función del ácido tánico es aumentar la aglutinabilidad de los glóbulos rojos; para balancear este efecto aglutinante se utiliza como estabilizador suero de conejo normal (30).

La sensibilización se lleva a cabo por simple adsorción del antígeno a los glóbulos rojos tanados. Las células así preparadas son capaces de aglutinar en presencia de pequeñas cantidades de su respectivo anticuerpo.

PRESENCIA DE CASOS HUMANOS DE TRYPANOSOMA CRUZI EN LA
REPUBLICA MEXICANA. (30).

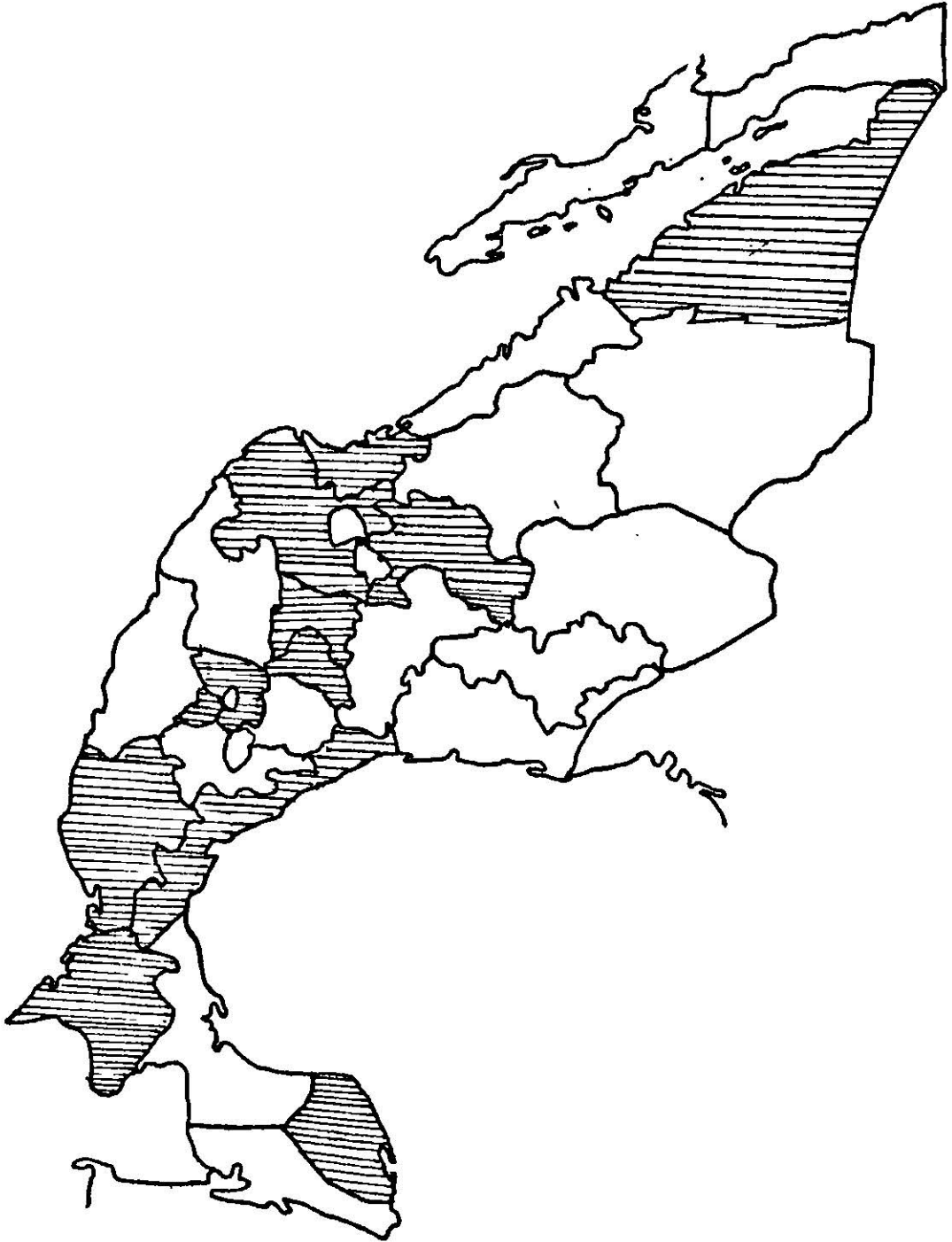


TABLA 1

DISTRIBUCION POR EDAD DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

EDAD EN AÑOS	PACIENTES	POR CIENTO
0 - 10	4	1.67
11 - 20	18	7.50
21 - 30	47	19.50
31 - 40	42	17.50
41 - 50	41	17.00
51 - 60	47	19.50
61 - 70	26	10.83
71 - 80	15	6.25
TOTAL	240	100.00

TABLA 2

SUJETOS ESTUDIADOS DEL SEXO FEMENINO

EDAD EN AÑOS	PACIENTES	POR CIENTO
0 - 10	2	1.28
11 - 20	13	8.33
21 - 30	37	23.72
31 - 40	30	19.23
41 - 50	28	17.95
51 - 60	33	21.15
61 - 70	11	7.05
71 - 80	2	1.20
TOTAL	156	100.00

TABLA 3

SUJETOS ESTUDIADOS DEL SEXO MASCULINO

EDAD EN AÑOS	PACIENTES	POR CIENTO
0 - 10	2	2.38
11 - 20	5	5.95
21 - 30	10	11.90
31 - 40	12	14.29
41 - 50	13	15.48
51 - 60	14	16.67
61 - 70	15	17.86
71 - 80	13	15.48
TOTAL	84	100.00

TABLA 4

TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON HEMAGLUTINACION
INDIRECTA EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO.

TITULO	PERSONAS ESTUDIADAS	POR CIENTO
=1:16	214	89.17
1:32	0	-----
1:64	6	2.50
1:128	16	6.67
1:256	4	1.67
TOTAL	240	100.00

TABLA 5

REACTORES A TRYPANOSOMA CRUZI

EDAD EN AÑOS	PACIENTES POSITIVOS *	POR CIENTO DEL TOTAL	POR CIENTO DEL GRUPO DE EDAD
0 - 10	0/4	--	--
11 - 20	2/18	0.83	11.1
21 - 30	6/47	2.50	12.8
31 - 40	4/42	1.67	9.5
41 - 50	5/41	2.08	12.2
51 - 60	3/47	1.25	6.4
61 - 70	6/26	2.50	23.1
71 - 80	0/15	--	--
TOTAL	26	10.83	--

* = Igual o más de 1:32

TABLA 6

REACTORES FEMENINOS A TRYPANOSOMA CRUZI

EDAD EN AÑOS	PACIENTES POSITIVOS *	POR CIENTO DEL TOTAL DE MUJERES.	POR CIENTO DEL GRUPO DE EDAD.
0 - 10	0/2	--	--
11 - 20	2/13	1.3	15.4
21 - 30	4/37	2.6	10.8
31 - 40	3/30	1.9	10.0
41 - 50	2/28	1.3	10.0
51 - 60	3/33	1.9	7.1
61 - 70	2/11	1.3	9.1
71 - 80	0/2	--	18.2
TOTAL	16/156	10.2	

* = Igual o más de 1:32

TABLA 7

REACTORES MASCULINOS A TRYPANOSOMA CRUZI

EDAD EN AÑOS	PACIENTES POSITIVOS *	POR CIENTO DEL TOTAL DE HOMBRES	POR CIENTO DEL GRUPO DE EDAD
0 - 10	0/2	--	--
11 - 20	0/5	--	--
21 - 30	2/10	2.4	20.0
31 - 40	1/12	1.2	8.3
41 - 50	2/13	2.4	15.4
51 - 60	1/14	1.2	7.1
61 - 70	4/15	4.8	26.7
71 - 80	0/13		--
TOTAL	10/84	11.9	

* = Igual o más de 1:32

RESULTADOS.

En nuestras manos, la técnica de microhemaglutinación a partir de sangre desecada en papel filtro fue sencilla y fácil de manejar con volúmenes elevados de muestras. Los reactivos conservaron su estabilidad de manera satisfactoria a lo largo del tiempo que nos tomó la recolección y el proceso de los especímenes y el punto final de positividad en cada prueba puede leerse nítidamente.

Como era de esperarse, la mayor parte de la población muestreada no presentó títulos significativos de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* (tabla 4). Se encontraron 26 reactores, con un total de positividad (títulos mayores de 1:32) de 10.8 %.

La distribución por edades de los individuos con títulos importantes de anticuerpos se muestra en la tabla 5. Salvo por el hecho de que en los grupos extremos (menores de diez y mayores de setenta y un años) la negatividad fue completa, no se encontraron diferencias en la concentración de positivos en los demás grupos. Si consideramos en conjunto a todos los sujetos entre los once y setenta años, y los comparamos con el de sesenta y uno a setenta años, la prueba de chi cuadrada (31) nos sugiere una diferencia estadísticamente significativa [$p < (0.050)$]. Esta diferencia, sin embargo, no se mantiene cuando se analizan por separado a las mujeres y los hombres en nuestro estudio (tablas 6 y 7), con $p > 0.02$ y $p > 0.01$ respectivamente. No se encontraron tampoco diferencias entre los dos grupos ($p > 0.7$).

CONCLUSIONES.

Encontramos una frecuencia global de 10.8 % de reactores a títulos significativos. Salvo en la encuesta realizada por Goldsmith y col en 1979 (32), esta frecuencia no difiere sensiblemente del 4 % obtenido por Díaz y col en Apatzingán en 1947, del 8.5 % que Biagi y col informaron en Tetitlán, Gro. En 1964, del 7.2 % que Tay y col reportaron en Tuxpan, Michoacán, en 1966 y del 13 % que Tay, Biagi y Biagi encontraron en el estado de Zacatecas en 1968.

Se ha sugerido una mejor respuesta humoral en el sexo femenino, predominio que puede ser debido a factores hormonales. Tay y col demostraron que niveles altos de progesterona y testosterona en ratones inoculados experimentalmente con *T. cruzi* se acompañan de una menor mortalidad, más baja parasitemia y menor número de nidos de amastigotes en los tejidos. Apoyados en esto, propusieron la idea de que estas hormonas pueden producir una estimulación inespecífica del sistema reticuloendotelial, que ayudaría a potenciar la respuesta de anticuerpos (33). En este trabajo, sin embargo, no nos fue posible confirmar tal diferencia ($p > 0.02$).

No encontramos variaciones significativas con la edad, salvo en el grupo de sesenta y un a setenta años que rindió mayor frecuencia de reactores ($p < 0.05$). No obstante, es preciso señalar que al hacer el análisis estadístico por sexos tal diferencia no pudo mantenerse ($p > 0.02$ en mujeres; $p > 0.01$ en varones).

En encuestas serológicas como la informada aquí, en las que se requiere probar gran cantidad de sueros, es muy útil la disponibilidad de métodos sencillos de muestreo. La obtención de muestras de sangre por punción digital o auricular es más fácil y más aceptable por las personas en estudio que la punción venosa.

Entre las ventajas derivadas de utilizar muestras en papel filtro podemos mencionar las siguientes:

1. El método de colecta es sencillo y fácil de realizar, tanto en niños como en adultos.
2. El traumatismo para el donador es mínimo.
3. Se puede obtener un gran número de muestras en poco tiempo y a muy bajo costo.
4. La muestra seca rápida y fácilmente.
5. No es necesario mantener la muestra en condiciones estériles.
6. Las muestras pueden enviarse por correo desde el área de estudio al laboratorio.
7. Pueden detectarse a partir de ellas, anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi por reacciones de hemaglutinación, fijación de complemento e inmunofluorescencia.

8. La actividad de los anticuerpos no varía de manera significativa bajo condiciones variables de humedad, ya que aparentemente no hay desnaturalización de proteínas.
9. La muestra puede guardarse a temperatura ambiente por un mínimo de 60 días y la reactividad de sus anticuerpos no varía significativamente.

La técnica de microhemaglutinación indirecta presentó en nuestras manos las siguientes ventajas:

1. Puede efectuarse a partir de muestras absorbidas en papel filtro.
2. Se necesita un pequeño volumen de sangre.
3. Se requieren pequeñas cantidades de antígeno.
4. Es de simple ejecución y no es cara.
5. Las diluciones se hacen fácilmente.
6. Se pueden correr numerosas muestras en corto tiempo.
7. Las reacciones son de fácil lectura.
8. Es una prueba cuantitativa.

Creemos que la prueba de hemaglutinación indirecta realizada en muestras de sangre en papel filtro resulta de gran utilidad para estudios serológicos y encuestas seroepidemiológicas, en este caso, sobre la infección chagásica. Además, provee de un método simple para coleccionar y probar cantidades pequeñas de sangre en áreas endémicas de este padecimiento.

En estudios seroepidemiológicos de la enfermedad de Chagas puede utilizarse la técnica de hemaglutinación indirecta, como una prueba rápida para detectar reactores positivos puede ser también de utilidad en bancos de sangre en los que sea necesario descartar a donadores positivos.

Hay que hacer hincapié en que la prueba serológica es solamente una ayuda para el diagnóstico para detectar *Trypanosoma cruzi* y no un indicador patognómico de la enfermedad en ausencia de datos clínicos, radiológicos o electrocardiográficos (34).

El frecuente estudio nos ilustra sobre la posible presencia del padecimiento en la región oriental del estado de San Luis Potosí y nos da idea de la frecuencia con que la infección por *T. cruzi* ocurre en el medio rural y en la población aborigen y de bajos recursos de la región. Estas posibilidades deben de ser conocidas y tomadas en cuenta por los médicos que eventualmente tengan que atender pacientes radicados en o procedentes de esa zona geográfica.

RESUMEN

Se absorbieron 240 muestras de sangre en papel filtro de aborígenes de la zona Huasteca del estado de San Luis Potosí, de ambos sexos y entre uno a ochenta años de edad.

*Las muestras eluidas se procesaron por hemaglutinación indirecta con eritrocitos sensibilizados con antígeno de *Trypanosoma cruzi*.*

Un 10.8 % de los sujetos estudiados mostró títulos por arriba de 1:16. El grupo de 61 - 70 años proporcionó una mayor frecuencia de reactores. No hubo diferencia entre los grupos de ambos sexos.

REFERENCIAS.

1. Botero D, Restrepo M: *Parasitosis humanas*. Medellín, Colombia, Ediciones Corporación para Investigaciones Biológicas. 1984, pp 243-245.
2. Salazar Schettino P M, de Haro Arteaga I, Jiménez Martínez J, García Carrera E: *Dos nuevas localizaciones de transmisores de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana*. *Sal Pub Mex* 1983; 25:77-82.
3. Cortes J M, Velasco Castrejón O, Labastida M H, Duarte N: *La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México*. *Rev Invest Sal Pub Mex* 1985; 27:60-63.
4. Goldsmith R S, Zárate R J, Zárate L G, Kagan I, Jacobson L B, Morales G: *Estudios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México y un estudio complementario de siete años*. 1. Cerro del Aire. *Bol Of Sanit Panam* 1986; 100:145-169.
5. Allain D S, Kagan I G: *An evaluation of the direct agglutination test for Chagas disease*. *J Parasit* 1974; 60:179-184.
6. Cerisola J A, Alvarez M, Lugones H: *Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas*. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24:2-8.
7. Camargo M E: *Serologic diagnosis of Chagas disease. New approaches in american tripanosomiasis*. *Proceedings of an International Symposium, Brasil P.A.H.O* 1975: 289-291.
8. Petana W B: *Sensitivity of the direct fluorescent test (IFT) for Chagas disease in large scale serologic surveys. New approaches in american tripanosomiasis research*. *Proceedings of*

- an International Symposium, Brasil P.A.H.O 1975; 227-234.*
9. Fuchs P, Fioratti V L, de Mello V A, Boainain E: *Diagnóstico serológico na doença de Chagas. Estudo comparativo de diferentes técnicas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1980; 22:242-245.*
 10. Camargo M E, Guimares M G, Pérez B A: *Antigenic fractionation and development of new antigens and new approaches in american tripanosomiasis. Proceedings of an International Symposium, Brasil P.A.H.O 1975; 227-234.*
 11. Kagan I G, Goldsmith R S, Zarate Castaneda R, Allain D S: *Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. Bol Of Sanit Panam 1979; 87:309-312.*
 12. Neal R A, Miles R A: *Indirect hemagglutination test for Chagas disease with a simple method for survey work. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1978; 12:325-332.*
 13. Sadun E H, Anderson R I, Williams J S: *Fluorescent antibody test for laboratory diagnosis for Schistosomiasis in humans by using dried blood smears on filter paper. Exp Parasit 1961; 11:117-120.*
 14. Pizzi T: *Inmunología de la enfermedad de Chagas. Santiago, Chile Universidad de Chile, 1957.*
 15. Maekelt G A, de Alayán Colmenares C: *Método sencillo para el envío de sueros chagásicos por inmunofluorescencia desde las zonas rurales. Arch Venezolano Med Trop Parasit 1960; 3:133-142.*
 16. Anderson R I, Sadun E H, Williams J S: *A technique for the use of minute amounts of fixed blood in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. Exp Parasit 1961; 11:111-116.*

17. Souza S L, Camargo M E: The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american tripanosomiasis serodiagnosis. *Rev Inst Med Sao Paulo* 1966; 8:225-228.
18. Alvarez M, De Rissio A M, Winne G J: Recolección de sangre para la infección chagásica por inmunofluorescencia. *Bol Chil Parasitol* 1971; 26:2-6.
19. Franco N F, Chamma L G: Technical modification on indirect immunofluorescent antibody test using filter paper blood eluates. *Int Arch Allergy* 1973; 44:692-696,
20. Tay Zavala J, Velasco Castrejón O, Gutiérrez Quiroz M: *Parasitología Médica*. México, D. F. Francisco Méndez Cervantes 1985; pp 114-118.
21. Carrol E, Farr Russell O: *Parasitología Clínica de Craig y Faust*. México, Editorial Hispano Americana, 1961.
22. Beck J W, Davies J E: *Parasitología Médica*. Buenos Aires, Editorial Interamericana, 1984; 84:324-329.
23. Barretto A C, Marsden P D, Cuba C C, Alvarenga N J: Estudo preliminar sobre o emprego de *Dipetalogaster maximus* (triatominae) na tecnica do xenodiagnostico em forma crônica de doenca de Chagas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1978; 20:183-189.
24. Cedillos R A, Wilton D P: Los triatomíneos domésticos (redúvidos) y las infecciones tripanosómicas en insectos en el Salvador. *Bol Of Sanit Panam* 1979; 86:148-157.
25. Camargo M E, Amato N V: Anti-tripanosoma cruzi IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1974; 16:200-202.

26. R Alderete J, Rivera V: *Geografía del estado de San Luis Potosí, México, D. F., Editorial Tizoc. 1969.*
27. Fong P F: *Encuesta sobre la enfermedad de Chagas en Tetitlán, Gro. Tesis recepcional. UNAM, 1963.*
28. Fudenberg H H, Stiles D P, Caldwell J L: *Manual de Inmunología Clínica, México, D. F. Manual Moderno. 1978; pp:745-746.*
29. Boyden S V: *Adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J Exp Med 1951; 93:107-120.*
30. Tay Zavala y cols: *La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal Pùb Mèx 1980; 22:409-450.*
31. Bradford H A: *Principios de estadística mèdica, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 1965.*
32. Tay J, F Biagi y A M de B de Biagi: *Estudio actual de conocimiento sobre triatoma y la enfermedad de Chagas en el estado de Zacatecas. Rev Mexicana 48:121-129, 1968.*
33. Tay J, Alonso J T, Salazar P M: *Efecto de las hormonas (progesterona y testosterona) sobre patogenicidad de Trypanosoma cruzi. En Prensa.*

34. Petana W B: *Importancia de los efectos clínicos, psicológicos, y sociales experimentados por pacientes con tripanosomiasis americana. Bol of Sanit Panam 1980; 80:23-26.*

