

302827  
N=19  
2Ej.



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

ESTUDIO COMPARATIVO DE CUATRO METODOS  
DIAGNOSTICOS PARA LA ENFERMEDAD DE  
CHAGAS EN LA FASE CRONICA.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A  
**CASHILDA PONCE GUERRERO**

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo  
se realizó en los laboratorios  
de Entomología y Protozoología  
del Departamento de Parasitología  
de la ENCB del IPN,  
bajo la asesoría del  
M. en C. Ricardo Alejandro Aguilar.

## D E D I C A T O R I A S

Me gozo ante la oportunidad que nos dió Dios para aprender parte de las maravillas que El hizo, y hago votos porque el hombre siga dominando la creación, corrigiendo errores y compartiendo la verdad.  
Para gloria de Dios.

Dedico este trabajo a mi amada familia: Papá, Mamá, Beni, Pepe, Marco Antonio y Marco Aurelio, ya que juntos nos asombramos, trabajamos, compartimos y aprendimos. Ustedes me han formado.

Mi gratitud a mi querida escuela, la Universidad Motolinía, pues desde mi infancia colaboró en mi formación.

## I N D I C E

Capítulo I	INTRODUCCION	página
1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Objetivo	2
1.3	Hipótesis	2
Capítulo II	ANTECEDENTES	
2.1	Definición	3
2.2	Clasificación taxonómica	3
2.3	Ciclos de transmisión	4
2.3.1	Ciclo biológico	5
2.4	Patología	6
2.5	Diagnóstico	7
Capítulo III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Diagrama general	9
3.2	Material, reactivos y equipo	
3.2.1	Material biológico	10
3.2.2	Material para la preparación y conservación de reactivos y medios	10

3.2.3	Reactivos y medios	13
3.3	Metodología	
3.3.1	Sangrado de ratones infectados con T.cruzi, cepa Cid, y que están en la fase aguda de la parasitosis	14
3.3.2	Conteo de tripanosomas en la sangre obtenida	14
3.3.3	Inoculación de cobayos	16
3.3.4	Revisión periódica de los cobayos	16
3.3.5	Tratamiento del material contaminado	17
3.3.6	Tratamiento de los cobayos en la etapa crónica	17
3.3.6.1	Xenodiagnóstico	18
3.3.6.2	Sangrado de cobayos para el serodiagnóstico, la inoculación de ratones y el hemocultivo	19
3.3.6.2.1	Hemocultivos	19
3.3.6.2.1	Preparativos para el serodiagnóstico	19
3.3.6.2.3	Inoculación de ratones	20
3.3.6.2.4	Serodiagnóstico	21
3.3.7	Verificación del xenodiagnóstico	22
3.3.8	Interpretación de resultados del serodiagnóstico	23
3.3.9	Revisión de los hemocultivos	24

### Capítulo III RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Resultados	
4.1.1	Cálculo del inóculo a cobayos	26
4.1.2	Realización de cuatro métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas experimental	26

4.2 Discusión de resultados

29

Capítulo V CONCLUSIONES

36

BIBLIOGRAFIA

38

APENDICE

41

## CAPITULO I



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

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad de Chagas, parasitosis de curso agudo y crónico, causada por la infección con el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tiene un gran impacto sobre la salud pública latinoamericana, debido a la amplia distribución geográfica, elevada prevalencia, disminución de la esperanza de vida, y particularmente, sobre la calidad de ésta. (12, 24)

Según cálculos de las Organizaciones Panamericana y Mundial de la Salud, en 1981 Latinoamérica tenía 24 millones de enfermos, y 65 millones en riesgo. (20) En México, la cifra debe ser muy similar a las calculadas para los países sudamericanos, ya que tiene en común la precariedad de la vivienda rural humana -factor altamente condicionante del riesgo de transmisión-, así como la existencia de grandes concentraciones urbanas tropicales, y el éxodo masivo de campesinos (muchos de ellos parasitados) hacia las zonas industrializadas. (9, 25)

Existen diversos métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. De modo general, consideradas las bases fisiopatogénicas y la historia natural de la enfermedad, en la fase aguda conviene utilizar métodos directos (examen al fresco, gota gruesa, método de Strout, biopsia de ganglios o músculos) a través de exámenes seriados. (2, 6, 23)

Para la fase crónica, se prefieren los métodos indirectos debido a la baja parasitemia ( xenodiagnóstico, hemocultivo e inoculación de animales sensibles), y métodos serológicos debido a la presencia de altos niveles de anticuerpos específicos (reacción de fijación del complemento (RFC), reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIF), reacción de hemaglutinación indirecta (HAI), sondas de DNA y ELISA), (5, 11, 23)

En el presente trabajo, se comparan cuatro métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas experimental: serología, xenodiagnóstico, inoculación de animales y hemocultivo.

## 1.2 OBJETIVO.

Comparar cuatro métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas en fase crónica, en animales de experimentación, a distintos tiempos posteriores a la desaparición de la parasitemia.

## 1.3 HIPOTESIS.

Si existen diferencias en la sensibilidad de cuatro métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas, entonces se tendrán diferencias en el número de casos diagnosticados como positivos.

## CAPITULO II

## A N T E C E D E N T E S

### 2.1 DEFINICION.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis de curso agudo y crónico, causada por la infección con el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, siendo transmitida al hombre y otros mamíferos por hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, conocidos como triatominos. (5)

*T. cruzi* es realmente un complejo biológico de poblaciones parasitarias que circulan en la naturaleza entre los seres humanos, animales domésticos, reservorios salvajes y vectores selváticos o domiciliarios. Estas cepas muestran diferencias en las características morfológicas, curvas de parasitemia, índices de mortalidad, tropismo tisular, capacidad de destrucción neuronal, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos y tipos antigénicos. (16, 18, 25)

### 2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA.

Este parásito protozoario se clasifica taxonómicamente como sigue:

Reino: Protista	Suborden: Trypanosomatina
Phylum: Sarcostigophora	Familia: Trypanosomatidae
Subphylum: Mastigophora	Género: <i>Trypanosoma</i>
Clase: Zoomastigophorea	Especie: <i>cruzi</i> (10)
Orden: Kinetoplastida	

La infección se facilita cuando las condiciones ecológicas son favorables para la entrada o permanencia de los triatomos infectados en las viviendas humanas, principalmente en el medio rural.

(23)

### 2.3 CICLOS DE TRANSMISION.

Se distinguen tres tipos de ciclos de transmisión del T.cruzi:

- a) El doméstico, mantenido por el hombre, perros, gatos y los triatomos sinantrópicos adaptados a la vivienda humana.
- b) El silvestre, que comprende roedores, marsupiales, armadillos y otros mamíferos salvajes y triatomos de habitat silvestre, y
- c) Un ciclo peridoméstico intermedio. (24,25)

En una extensa zona del continente americano, comprendida entre los 42 grados latitud Norte en Estados Unidos, y los 43 grados latitud Sur en Argentina, se han detectado focos naturales de tripanosomiasis americana. Se ha hallado infección por T.cruzi en mas de 100 especies de mamíferos de todos los órdenes. (25)

Respecto a su transmisión, la enfermedad de Chagas va perdiendo poco a poco su rigurosa dependencia del triatomo transmisor, y aumentando otros mecanismos, tales como la transfusión de sangre y la enfermedad congénita. (18, 23, 25)

### 2.3.1 CICLO BIOLÓGICO.

El *T. cruzi* tiene su reservorio natural en mamíferos silvestres o domésticos. El tripanosoma circulante en el torrente sanguíneo del vertebrado infectado es ingerido por triatominos hematófagos, y en el tubo digestivo de los insectos los parásitos se multiplican, transformándose después de 8 a 10 días en tripanosomas metacíclicos importantes, los cuales se eliminan por las heces del triatomo. (10)

En el hombre, la cadena de transmisión se inicia por la contaminación a través de la materia fecal del triatomo, penetrando el protozoario a través de la piel, conjuntiva ocular y otras mucosas; la transmisión puede efectuarse también por medio de transfusiones sanguíneas, congénitamente o por contacto con la sangre de animales infectados. (5, 9)

Las transfusiones de sangre infectada ocupan el segundo lugar entre los medios de transmisión más frecuentes, puesto que se han encontrado donadores de sangre con reacciones serológicas positivas, en una proporción variable del 1 al 15%. (23)

Dentro del organismo humano los tripanosomas metacíclicos no se multiplican mientras están en el torrente circulatorio; el parásito invade rápidamente los fibroblastos y adipocitos del tejido subcutáneo, así como el bazo, hígado, médula ósea, riñones, tejido nervioso, ganglios linfáticos y miocardio. (5) Una vez que los parásitos penetran en las células de los tejidos, pierden el flagelo y la membrana ondulante, se transforman en amastigotes y se

multiplican por fisión binaria, formando gran número de amastigotes que finalmente pasan por las fases de promastigote y epimastigote y alcanzan la forma de tripanosoma, apareciendo en la sangre periférica, con lo que completan su ciclo. (9)

#### 2.4 PATOLOGIA.

Las manifestaciones clínicas de la infección por *T. cruzi* varían en función del tamaño del inóculo y la virulencia de la cepa, así como la edad, el estado nutricional y la respuesta inmunológica del huésped. El período de incubación es de 5 a 10 días y el prodrómico varía entre 1 a 5 días. (23)

Durante la fase aguda puede haber fiebre, anemia, edema facial, y general; el cuadro clínico en la fase crónica se relaciona con la localización del protozoario en el miocardio, sistemas nervioso central, nervioso vegetativo y nervioso periférico, tubo digestivo, hígado, bazo y otros órganos. (2, 5)

La enfermedad de Chagas crónica se caracteriza por un equilibrio entre el huésped y el parásito. Durante la fase crónica, en condiciones normales no se presenta curación espontánea, ni una nueva fase aguda, ya sea en la enfermedad experimental o en la humana. El huésped infectado suele desarrollar una fuerte inmunidad, de modo que la reinfección no inducirá nuevos brotes de parasitemia intensa. (2, 23)

La enfermedad de Chagas, en su fase crónica, deriva en una cardiopatía, según se ha demostrado en el 10.8% al 29% de los sujetos infectados con *T. cruzi*. Esta cardiopatía chagásica crónica

es más frecuente en la 3ra., 4ta. y 5ta. décadas de la vida, predominando en los varones. Clínicamente se caracteriza por la presencia de tres síndromes básicos: arritmias cambiantes, insuficiencia cardíaca y fenómenos de tromboembolismo. (23, 25)

La enfermedad de Chagas, en ciertas zonas endémicas, se ha relacionado con ciertas perturbaciones en la motilidad del esófago y el colon distal, así como algunas dilataciones patológicas de estos órganos (megaesófago y megacolon). (5, 25)

La inmunidad de base celular ha sido detectada. La acción protectora de los anticuerpos séricos sigue siendo discutible. (21)

## 2.5 DIAGNOSTICO.

En la fase inicial de la infección aguda con *T.cruzi*, la parasitemia periférica suele ser suficientemente elevada para ser detectada por microscopía directa de la sangre. (2, 5)

En la etapa crónica, la infección es inaparente, y métodos indirectos son requeridos para demostrar la presencia de *T.cruzi*, ya que la parasitemia es muy baja, lo cual dificulta su identificación directa. Los métodos indirectos comúnmente usados son el xenodiagnóstico, y el hemocultivo; el xenodiagnóstico consiste en la reproducción artificial del ciclo natural del parásito a través de triatomíneos sabidamente negativos, que se alimentan sobre el paciente; es un método de diagnóstico sumamente específico y de sensibilidad relativamente reducida, pero el más empleado para propósitos de rutina. (1, 14, 23)



El hemocultivo consiste en la inoculación a un medio (con los nutrientes y condiciones necesarias para el crecimiento) de los parásitos presuntamente presentes en la sangre inoculada. En la literatura, este método es considerado como el más sensible para unos (10) y el método menos óptimo para otros. (12, 23)

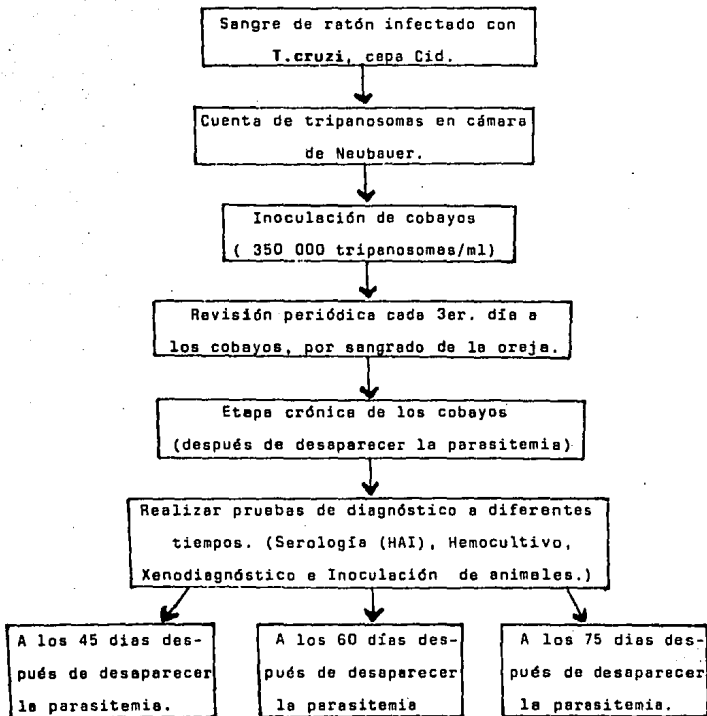
La inoculación de animales raramente se realiza, ya que es difícil de estandarizar y sólo se obtienen bajos niveles de parásitos periféricos. (15,23)

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas también se utilizan los métodos serológicos, que se basan en la detección de anticuerpos contra los parásitos. Los métodos que se han empleado son: RIF, RFC, ELISA, HAI etc. (2,6,23) Las ventajas de los métodos serológicos son el conocimiento de la incidencia y de la frecuencia de la infección, la prevención del contagio por transfusión de sangre, la identificación de los casos no sospechados. o incluso la confirmación de la enfermedad de Chagas en enfermos con manifestaciones clínicas que le sugieren. (2)

**CAPITULO III**

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA GENERAL



### 3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

#### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

- 6 cobayos hembras de 500 g, cepa Dunkin Hartley.
- 3 ratones infectados con *T. cruzi*, cepa Cid, en fase aguda de la enfermedad.
- 12 ratones albinos (de laboratorio), cepa NIH, de 22 g.
- 15 chinches *Triatoma pallidipennis*, ninfas del 3er. estadio.
- Glóbulos rojos no sensibilizados (de carnero) en suspensión al 1%, para control de heterofilia.
- 6 ml de sangre completa de carnero.
- Antígeno HAI .- liofilizado de glóbulos rojos de carnero, sensibilizados con antígeno citoplásmico de *T. cruzi*.

#### 3.2.2 MATERIAL PARA LA PREPARACION Y CONSERVACION DE REACTIVOS Y MEDIOS.

- Refrigerador (4 °C)
- 6 tubos de vidrio con tapón de rosca de 15 cm x 150 mm
- 1 vaso de precipitados de 250 ml
- 1 matraz Erlenmeyer de 500 ml
- 1 autoclave
- 1 balanza granataria
- 2 pipetas serológicas de 10 ml
- 2 pipetas serológicas de 5 ml
- 2 pipetas serológicas de 1 ml
- 2 pipetas serológicas de 0.1 ml
- 1 pipetor estéril

#### **PARA EL SANGRADO E INOCULACION DE ANIMALES.**

- 25 lancetas
- 20 ml de eter
- 1 jaula grande para cobayos
- 2 jaulas para ratones
- 10 jeringas estériles para insulina con su aguja (25 x 16mm)
- 5 agujas estériles para jeringa del número 21 x 32 mm
- 20 agujas estériles para jeringa del número 20 x 32 mm
- 1 ampolleta de heparina de 5 ml
- 2 mecheros Fisher con manguera de látex
- 1 campané para sacrificio por inhalación de eter.
- 3 pares de guantes
- 10 tubos de 13 x 100 mm

#### **PARA LAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO.**

- 2 trampas de red de plomo para inmovilizar ratones
- 1 cámara de Neubauer con cubreobjetos
- 1 microscopio óptico
- 1 caja de portesobjetos
- 1 caja de cubreobjetos
- 1 asa microbiológica
- 1 paquete de torundas de algodón
- 1 cordón de 5 m de largo
- 1 tabla de madera con un agujero al centro, de 10 cm de diámetro
- 1 paquete de etiquetas
- 1 marcador

- 1 caja de cerillos
- 2 mecheros Fisher con manguera de látex
- 6 frascos medianos para guardar las chinches
- 1 picahielo para horadar la tapa de los frascos
- 1 pinza para depilar
- 10 pipetas Pasteur
- 10 tubos de 13 x 100 mm
- 1 gradilla para tubos de distintos diámetros
- 1 incubadora ( 37 ° C)
- 2 pipetas serológicas de 10 ml
- 2 pipetas serológicas de 5 ml
- 2 pipetas serológicas de 1 ml
- 2 pipetas serológicas de 0.1 ml
- 1 centrifuga
- 30 cuadros de papel parafilm
- 2 dispositivos para la alimentación de chinches, que consisten en 2 recipientes de plástico de aproximadamente 10 cm por 15 cm de largo y 8 cm de alto, con tapadera ajustable hueca.
- 1 tijeras
- 30 palillos de madera
- 2 pedazos de malla de tul, de 1 dm<sup>2</sup> (cada pedazo)
- 3 pares de guantes de látex
- 1 frasco de vidrio con solución de fenol al 3%
- 1 micropipeta ajustable a 25 µl
- 500 boquillas para micropipeta, estériles
- 1 caja porta boquillas para micropipeta

### **3.2.3 REACTIVOS Y MEDIOS.**

- 0.5 g de yodo metálico
- 50 ml de alcohol etílico
- 0.85 g de NaCl
- 1 g de ácido pícrico
- 3 g de cristales de fenol
- 4.8 g de base de agar sangre (BIOXON)
- 1000 ml de agua destilada

### **3.2.4 REACTIVOS DEL EQUIPO CHAGATEST HAI, marca Wiener lab, con vigencia.**

- 2-Mercaptoetanol al 1%
- Solución proteica: solución fisiológica tamponada con fosfatos a pH 7.5 con colorante inerte.
- Reconstituyente HAI: solución fisiológica tamponada a pH 7

### **MATERIAL DEL EQUIPO CHAGATEST HAI, Marca Wiener lab.**

- 1 frasco vacío para trasvasar el 2-Mercaptoetanol de la ampolla
- 3 policubetas con 96 pocillos de fondo en U ( 8 hileras y 12 columnas) cada una
- 2 tetinas
- 1 cinta adhesiva

### 3.3 METODOLOGIA.

#### 3.3.1 SANGRADO DE RATONES INFECTADOS CON T.cruzi, CEPA CID, Y QUE ESTAN EN LA FASE AGUDA DE LA PARASITOSIS.

- Trabajar en zona estéril y con guantes.
- Alistar una jeringa con 0.5 ml de solución salina.
- Tomar un algodón con eter, y dormir el ratón a sangrar.
- Por punción cardíaca, sangrar lo más posible al ratón (se requieren 3.5 ml). Mover continuamente la jeringa con la sangre y la solución salina.
- Sacrificar al ratón por desnucamiento.

#### 3.3.2 CONTEO DE TRIPANOSOMAS EN LA SANGRE OBTENIDA.

- Integrar perfectamente la solución salina con la sangre infectada, tomar 0.5 ml de la sangre y hacer una dilución 1:2 con solución salina. Integrar perfectamente.
- Colocar la cámara de Neubauer sobre una superficie horizontal, y poner el cubreobjetos sobre las mesetas.
- Cargar la cámara con una gota de la sangre infectada, depositándola entre la meseta y el cubreobjetos para que difunda por capilaridad, evitando que se formen burbujas o caiga el líquido a los surcos. Dejar en reposo por 2 minutos, en ambiente húmedo.
- Disminuir la intensidad luminosa del microscopio y proceder a la localización de la cuadrícula a seco débil.
- Hacer el recuento de tripanosomas visibles en los cuatro cuadros de las esquinas de la cuadrícula central.



-Calcular el número de tripanosomas por  $\text{mm}^3$ , considerando que cada cuadrante mide  $1 \text{ mm}^2$ , y que la altura de la superficie de la meseta (cuadrícula) al cubreobjetos, es de  $0.1 \text{ mm}$

$$\frac{\text{No. de tripanosomas contados en los 4 cuadrantes}}{4} = \text{promedio de tripanosomas por } \text{mm}^2$$

Para determinar el promedio de tripanosomas en  $1 \text{ mm}^3$ , y conociendo que la altura es de  $0.1 \text{ mm}$ , se considera que  $0.1 \text{ mm} = 1/10 \text{ mm}$

Por tanto:

$$\frac{\text{Promedio de tripanosomas}}{\text{por } \text{mm}^2} \times 10 = \frac{\text{promedio de tripanosomas}}{\text{por } \text{mm}^3}$$

Y considerando que la dilución de la sangre infectada, al hacer ese conteo, fue 1:2, entonces

$$\frac{\text{Promedio de tripanosomas}}{\text{por } \text{mm}^3} \times 2 = \frac{\text{concentración de tripanosomas}}{\text{por } \text{mm}^3 \text{ de suspensión inoculada.}}$$

Haciendo la conversión a  $\text{cm}^3$  (donde  $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ ) :

Si  $1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$ , entonces  $1 \text{ mm}^3 = 0.001 \text{ cm}^3$

Por tanto:

$$\frac{\text{tripanosomas}}{\text{mm}^3} \times \frac{1 \text{ mm}^3}{0.001 \text{ cm}^3} = \text{tripanosomas} / \text{cm}^3$$
$$= \text{tripanosomas} / \text{ml}$$

-Luego del conteo, colocar la cámara y el cubreobjetos en una solución de fenol al 3%, y posteriormente se someten a esterilización.

### 3.3.3 INOCULACION DE COBAYOS.

-Utilizar guantes en ambas manos.

-Con una mano, sujetar las patas delanteras y la cabeza, y con la otra mano, sujetar las patas traseras. Otra persona limpiará con alcohol yodado la zona de inoculación, e inoculará intraperitonealmente 0.5 ml de sangre infectada de ratón.

### 3.3.4 REVISION PERIODICA DE LOS COBAYOS.

1.- Hasta que se llegue a la fase aguda de la enfermedad, la revisión será semanal.

-Utilizar guantes y proteger la mesa de trabajo con papel estresa. Colocar sobre la mesa al cobayo.

-Tomar una torunda con alcohol y limpiar la superficie externa de las orejas, haciendo masaje sobre una vena, hasta que se yerga.

-Tomar una lanceta estéril y picar transversalmente la vena, hasta que salga una gota. En un portaobjetos limpio, colocar la gota de sangre obtenida y taparla con el cubreobjetos.

-Observar al microscopio, a 10x. Si la preparación es muy densa, repetir la operación, pero agregar al portaobjetos una gota de solución salina y volver a observar.

2.- A partir de la fase aguda, en la que el número de tripanosomas es alrededor de 30 por campo, la revisión será cada tercer día.

3.- Cuando ya no sea observable microscópicamente la parasitemia, contar 30 días, revisando semanalmente la sangre de los cobayos.

### **3.3.5 TRATAMIENTO DEL MATERIAL CONTAMINADO.**

-Todas las jeringas, agujas, portaobjetos y cubreobjetos utilizados se envuelven en papel estrasa, se sellan con cinta testigo y se esterilizan en autoclave, a calor húmedo, 115 °C, 20 minutos.

### **3.3.6 TRATAMIENTO DE LOS COBAYOS EN LA ETAPA CRONICA.**

-Luego de 30 días de que desapareció la parasitemia, hacer 3 lotes, de 2 cobayos cada uno.

-A cada lote se le harán 4 pruebas de diagnóstico, en diferentes tiempos:

Al primer lote a los 45 días de desaparecer la parasitemia, al 2do. lote a los 60 días de desaparecer la parasitemia, y al 3er. lote a

los 75 de desaparecer la parasitemia.

-Marcar a cada uno de los cobayos, para diferenciarlos, con solución de ácido pícrico al 1%.

### 3.3.6.1 XENODIAGNOSTICO.

-Tomar un cobayo y colocar su parte anterior sobre una tabla con agujero, y sujetar con un cordón sus 4 patas, de modo que quede inmobilizado.

-Tomar 5 trietominos del 3er. estadio, sometidos a ayuno de 4 semanas, y colocarlas en un dispositivo para su alimentación; tomar un recipiente que contenga una cartulina plisada de la altura del recipiente, cubrir el recipiente con la malla de tul y sujetar la malla con la tapadera hueca del recipiente, de modo que las chinches puedan escalar la cartulina y fácilmente asomen su probosis por los orificios de la malla.

-Colocar la tabla donde se sujetó al cobayo, sobre el dispositivo de alimentación de las chinches, de modo que la zona que descubre el vientre del cobayo quede en contacto directo con los trietominos.

-Asegurarse de que las chinches pueden alimentarse de la sangre del cobayo; cuando se hayan alimentado hasta la repleción se retiren del recipiente y se colocan en un frasco limpio, con un círculo de papel en su base interna, y una cartulina plisada.

-Cerrar el frasco y etiquetar. Guardar 4 semanas.

### **3.3.6.2 SANGRADO DE COBAYOS PARA EL SERODIAGNOSTICO, LA INOCULACION DE RATONES Y EL HEMOCULTIVO.**

-Luego de alimentar a las chinches con la sangre del cobayo, desatar al cobayo.

-Preparar área estéril. Usar guantes.

-Dos personas sujetarán las patas y cabeza del cobayo, mientras otra persona, con su mano, localiza el corazón; ya ubicado, se limpia el área con un hisopo bañado en alcohol yodado. Luego, con una jeringa de 10 ml, previamente bañada en su interior con heperina, se procede al sangrado intracardíaco; se requieren unos 8 ml de sangre para las pruebas, de cada uno de los cobayos.

-Colocar el capuchón a la aguja y mover la sangre obtenida en la jeringa, para asegurar el efecto anticoagulante.

#### **3.3.6.2.1 HEMOCULTIVOS.**

-Trabajar en área estéril.

-Tomar 2 tubos con gelosa sangre al 4% con el medio dispuesto en pico de flauta, y hasta el pico, lleno de solución salina estéril.

-En zona estéril, retirar el capuchón (incluyendo la aguja) de la jeringa. Inocular a un tubo y taparlo bien.

-Repetir la operación con un tubo más.

-Poner el capuchón a la punta de la jeringa. Colocar los hemocultivos en una gradilla, e incubar a 37°C durante 3 semanas.

#### **3.3.6.2.2 PREPARATIVOS PARA EL SERODIAGNOSTICO.**

-Retirar el capuchón (incluyendo la aguja) de la punta de la

jeringa, y vertir en 2 tubos de 13x100 limpios, a cada uno, 2.5 ml de sangre de cobayo.

-Colocar el capuchón en la punta de la jeringa.

-Sellar con papel parafilm los tubos. Centrifugar a 3000 r.p.m., hasta separar el suero del paquete globular.

Mientras se centrifuga:

### 3.3.6.2.3 INOCULACION DE RATONES.

-Utilizar guantes.

-Por cada cobayo, se utilizarán 2 ratones.

-Marcar con solución de ácido pícrico al 1%, a 2 ratones.

-Con una mano, sujetar al ratón por el lomo y el cuello, y con la otra, desinfectar el área a inocular con alcohol yodado; retirar el capuchón (sin quitar la aguja) a la jeringa, e inocular 0.5 ml de sangre de cobayo al ratón, intraperitonealmente.

-Tomar otro ratón y repetir la operación.

-Se revisarán los ratones a partir de los 15 días de la inoculación.

### 3.3.6.2.4 SERODIAGNOSTICO.

-Previamente, se preparan los reactivos para el Chagatest, según indicaciones del fabricante del equipo.

-Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U, y pasar un trapo húmedo por la base antes de usar.

### I.- TITULACION SIN 2-MERCAPTOETANOL (2-Me):

1) Con microgotero de 25  $\mu$ l, colocar 1 gota de diluyente de sueros

HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.

- 2) Tomar una alícuota de cada suero a ensayar con microdilutores de 25  $\mu$ l (uno para cada muestra) y colocar en los pocillos de la columna 1. Se utilizarán tantas hileras horizontales como sueros deban procesarse.
- 3) Realizar diluciones a partir de la columna 1 (dilución 1:2), pasando los microdilutores a la columna 2 (dilución 1:4), y así sucesivamente hasta la columna 12 (dilución 1:4096).
- 4) Colocar en las columnas 1 y 2 (diluciones 1:2 y 1:4), una gota (25  $\mu$ l) de glóbulos rojos no sensibilizados, para control de heterofilia.
- 5) En el resto de los pocillos agregar 1 gota (25  $\mu$ l) de antígeno HAI.
- 6) Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos.
- 7) Dejar en reposo, al resguardo de las vibraciones por 90 min.
- 8) A partir de los 90 minutos, leer sobre un espejo.

## II.- TITULACION CON 2-ME (Para casos de heterofilia).

- 1) Colocar una gota de suero en cada uno de los pocillos, utilizando una pipeta descartable por cada suero, en posición vertical.
- 2) Agregar una gota de 2-Me al 1% a los pocillos, utilizando una pipeta descartable.
- 3) Sellar los pocillos con cinta adhesiva y agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales.
- 4) Incubar por 30-60 min., a 37°C, o 90 min. a temperatura ambiente.

- 5) Retirar la cinta adhesiva, pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta, y con microgotero de 25  $\mu$ l, colocar una gota de diluyente de sueros HAI en los pocillos restantes de las hileras utilizadas.
- 6) Realizar los pasos 3 a 8 anteriormente descritos en la titulación sin 2-Me.

### 3.3.7 VERIFICACION DEL XENODIAGNOSTICO.

A los 30 días de haber sido alimentadas las chinches, se alimentan nuevamente, pero con sangre de ratón no infectado:

- En una trampa hecha de una red de plomo, introducir a un ratón sano y cerrar la trampa, de modo que quede inmóvil.
- Preparar en el dispositivo de alimentación de chinches, a los triatominos en estudio; colocar sobre el dispositivo la trampa con el ratón inmovilizado.
- Cuando estén repletas, esperar a que defequen; luego, tomar una pipeta Pasteur y adicionar una gota muy pequeña de solución salina; mezclar, y con la misma pipeta, tomar la mezcla y colocarla en un portaobjetos limpio. Cubrir con el cubreobjetos.
- Si las chinches no defecan, tomar una chinche con las pinzas y oprimirla ligeramente, para forzar la salida de las heces.
- Observar el microscopio óptico, a 10x, en busca de tripomastigotes. Si es negativo, repetir la operación a los 10 días siguientes.
- Tanto pipetas Pasteur, como porta y cubreobjetos, colocarlos en un recipiente con fenol al 3%; luego, esterilizar el material.



- Si el resultado es negativo, esperar otros 20 días, y practicar la técnica de Maeckelt, modificada:

#### **MODIFICACION DE LA TECNICA DE MAECKELT:**

La técnica original consiste en colocar en una moladora mecánica (licuadora doméstica) a las chinchas en estudio, y molerlas con solución salina, para luego filtrar el líquido con una gasa y hacer una preparación en fresco, para buscar al microscopio los tripomastigotes.

La técnica modificada a seguir es:

- Tomar los tritominos y colocarlos en un mortero.
- Adicionar 1 ml de solución salina estéril y macerar.
- Tomar una gota del macerado, colocarla en portaobjetos (si es necesario, agregar a la preparación más solución salina, para mejorar la visión), tapar con cubreobjetos y observar al microscopio óptico, en busca de tripomastigotes.

#### **3.3.8 INTERPRETACION DE RESULTADOS DEL SERODIAGNOSTICO.**

A partir de los 90 minutos, leer sobre un espejo.

No reactivo.- Presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Si reactivo.- Formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.

I.- Para la titulación sin 2-Me :

Se consideran presumiblemente parasitados aquellos individuos cuyos

sueros son reactivos en diluciones mayores o iguales a 1:16 .

II.-Para la titulación con 2-Me :

Se presume parasitosis por T.cruzi en aquellos individuos cuyos sueros son reactivos en diluciones mayores o iguales a 1:8 .

### 3.3.9 REVISION DE LOS HEMOCULTIVOS:

-Revisar a partir de los 22 días de inoculados.

-Anotar la fecha y lote del hemocultivo que se va a revisar.

-Trabajar en zona estéril.

-Destapar un tubo y flamearlo, introducir el asa previamente esterilizada a la flama, y tomar una asada del líquido; colocarlo sobre un portaobjetos limpio y volver a esterilizar el asa, repitiendo dos veces más la operación sobre el mismo portaobjetos; flamear la boca del tubo y cerrarlo.

-Observar al microscopio la preparación a 10x y 40x.

### 3.3.10 REVISION DE LOS RATONES INOCULADOS.

-Verificar la fecha de inoculación y el número de cobayo de cuya sangre se inoculó en ese ratón.

-Cortar la punta de la cola del ratón con unas tijeras; apretar la cola hasta que salga una gota de sangre, y colocarla en un portaobjetos, sobre una pequeña gota de solución salina; mezclar con un palillo y colocar encima un cubreobjetos.

-Observar al microscopio óptico a 10x y a 40x.

-Repetir la operación con cada ratón.

-Si el resultado es negativo, continuar en otros días la revisión,  
hasta los 30 días después de haber sido inoculado el ratón.

## CAPITULO IV

## **R E S U L T A D O S   Y   D I S C U S I O N**

### **4.1 RESULTADOS**

#### **4.1.1 CALCULO DEL INOCULO A COBAYOS.**

A cada cobayo se inoculó intraperitonealmente una suspensión de 0.5 ml de sangre infectada y solución salina fisiológica.

En la cámara de Neubauer, la concentración de tripanosomas por mm<sup>3</sup>, en dilución 1:2, fue de 350 tripanosomas / mm<sup>3</sup>.

Por tanto, la concentración de la suspensión real fue:

$$700 \text{ tripanosomas/mm}^3$$

Expresando la concentración en cm<sup>3</sup>, se tienen:

$$700 \text{ 000 tripanosomas/cm}^3 = 700 \text{ 000 tripanosomas/ml}$$

Y como se inoculó a cada cobayo 0.5 ml de esa suspensión, entonces el inóculo por cobayo fue 350 000 tripanosomas/ml

#### **4.1.2 REALIZACION DE CUATRO METODOS DE DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EXPERIMENTAL.**

A cada par de cobayos en estudio se le denominó con un número de lote, mismo que se dió progresivamente de acuerdo al mayor tiempo posterior a la desaparición de la parasitemia.

En el cuadro I se comparan los tiempos en que se obtuvo un diagnóstico positivo en los cuatro métodos de diagnóstico en estudio.

**CUADRO I**  
**COMPARACION DE LOS TIEMPOS EN QUE SE OBTUVO**  
**UN DIAGNOSTICO POSITIVO EN LOS CUATRO METODOS EN ESTUDIO.**

Método de diagnóstico	Identificación del cobayo: Lote    Nº		Día posterior a la parasitg mia en que se verificó el método de dx.	Tiempo en días para que el dx fuera positivo.	Días que prosiguió el estudio de los casos negativos.
SEROLOGIA (HAI)	1	1 y 2	45	0	0
	2	3 y 4	60	0	0
	3	5 y 6	75	0	0
XENO- DIAGNOSIS	1	1	45	negativo	90
		2	45	75	0
	2	3 y 4	60	60	0
	3	5 y 6	75	45	0
INOCULA- CION DE ANIMALES	1	1 y 2	45	negativo	30
	2	3	60	negativo	52
		4	60	15	0
	3	5 y 6	75	12	0
HEMO- CULTIVO	1	1 y 2	45	negativo	90
	2	3 y 4	60	negativo	90
	3	5 y 6	75	negativo	90

Las chinchas utilizadas para el xenodiagnóstico, en su mayoría, dieron resultados positivos por simple compresión abdominal o bien por el estudio de las heces espontáneamente emitidas. Sólo se presentó un lote donde todas las chinchas fueron negativas en el xenodiagnóstico, y por ello se les practicó la técnica de Maeckelt modificada, resultando aún así negativas.

El resultado del serodiagnóstico se obtuvo a los 90 minutos de realizar el método, siendo en todos los casos nítida la lectura.

En la tabla II se resumen los resultados de diagnóstico obtenidos por la verificación de los cuatro métodos en estudio para la enfermedad experimental de Chagas.

**CUADRO II**  
**COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN CUATRO**  
**MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN COBAYOS.**

Días post-parasitemia:	45		60		75	
Nº de cobayo:	1	2	3	4	5	6
Método de diagnóstico						
SEROLOGIA	+	+	+	+	+	+
título:	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:1024
XENODIAGNOSIS	+	-	+	+	+	+
HEMOCULTIVO	-	-	-	-	-	-
INOCULACION DE ANIMALES	-	-	-	+	+	+

#### 4.2 DISCUSION DE RESULTADOS:

En el cuadro III se comparan los resultados obtenidos por el uso de cuatro diferentes métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas:

**CUADRO III**  
**COMPARACION DE RESULTADOS POSITIVOS EN EL EMPLEO**  
**DE CUATRO METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.**

Método de dx.	Lote 1		Lote 2		Lote 3		% por método de dx.
	frec.	%	frec.	%	frec.	%	
SEROLOGIA	1	100	1	100	1	100	100
XENODIAG- NOSTICO	0.5	50	1	100	1	100	83.3
INOCULA- CION DE ANIMALES	0	0	0.5	50	1	100	50
HEMOCUL- TIVO	0	0	0	0	0	0	0



**CUADRO IV**  
**COMPARACION DEL CONJUNTO DE LOS CUATRO METODOS EMPLEADOS**  
**RESPECTO AL TIEMPO.**

	% de positividad en las cuatro pruebas.	% de positividad respecto a todos los lotes.
Lote 1	37.5	21.4
Lote 2	62.5	35.7
Lote 3	75	42.8

Se evaluó en cada lote la presencia de inmunoglobulinas clase IgG, obteniéndose un diagnóstico positivo y un comportamiento exponencial del título de IgG's en todos los lotes. El gráfico de este tipo de curva se obtuvo a partir de una regresión exponencial, cuya ecuación es la siguiente:

$$y = A e^{xB}$$

donde A = 0.183

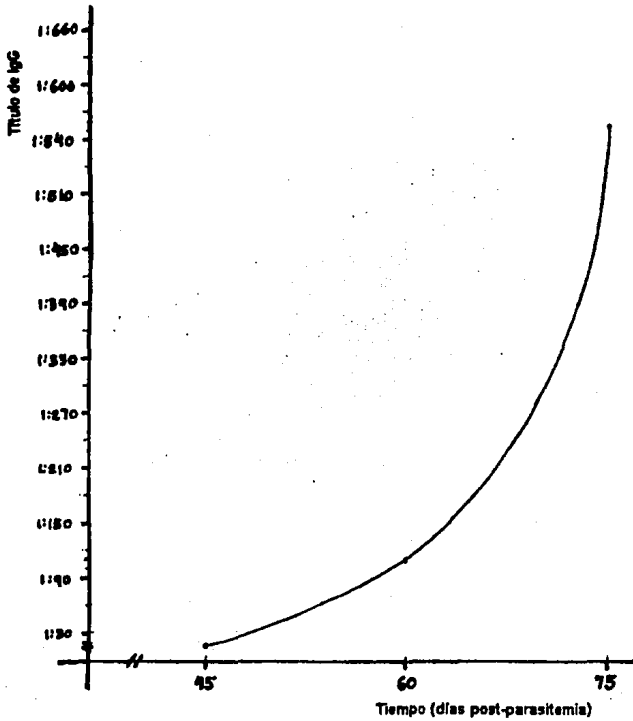
B = 0.107

Ver figura 1.

Para el diagnóstico serológico, en la práctica se utilize la técnica

Figura 1

GRAFICA DE LA FUNCION OBTENIDA POR EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO



que se ajuste más a las facilidades y disponibilidad de cada laboratorio. La técnica serológica aquí utilizada, la hemaglutinación indirecta (HAI), se considere tan sensible como la reacción de inmunofluorescencia (RIF). (23)

La HAI mostró ser eficaz respecto a su reactividad específica, es decir, a la capacidad de diagnosticar el mayor número de casos reales de la enfermedad.

Las reacciones serológicas para la demostración de anticuerpos anti *T.cruzi* son muy específicas, no se observan regularmente reacciones cruzadas derivadas de otras infecciones o de otra naturaleza, con excepción de leishmaniasis, especialmente en RIF y en HA.(3,4)

El aumento exponencial de los anticuerpos de memoria probablemente se deba a las consecuencias de la infección crónica, como son la presencia de antígenos circulantes; estimulación antigénica persistente y formación de complejos inmunes. (18, 21)

Los antígenos liberados por el parásito interfieren en la respuesta inmunitaria del huésped, entre otras formas, por activación policlonal, ya que muchos de esos antígenos son mitógenos para los linfocitos T y B, y las elevadas concentraciones de IgG comúnmente conducen a trastorno de la función de las células B, disminución progresiva de los linfocitos B reactivos para el antígeno, e inmunosupresión consiguiente. (21)

Por otra parte, hay que recordar que en la enfermedad crónica, se establece un equilibrio dinámico entre el parásito y las defensas del huésped, fijándose aquél especialmente en los nichos intracelulares. Se caracteriza por baja parasitemia o subpatente, en

contraposición con un elevado y persistente nivel de anticuerpos. Las lesiones inflamatorias son mínimas en esa fase, surgiendo a largo plazo mayores o menores grados de fibrosis en sustitución de tejidos nobles destruidos por la secuencia de ciclos del tripanosoma. (23)

Durante la fase crónica, los anticuerpos pueden intensificar la fagocitosis mediada por receptores para Fc en los macrófagos. La fagocitosis de los parásitos, mediada por receptores para C3, aumenta aún más con la adición del Complemento. El número de receptores para Fc y para C3 aumenta a consecuencia de la activación de los macrófagos. Estos mismos anticuerpos también participan en la citotoxicidad dependiente del anticuerpo (ADCC). (21)

Así, la serología por HAI resultó ser un método claramente eficaz para el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, con un 100% de positividad en todos los tiempos de la fase crónica estudiados.

Según Chierí (23), el uso principal del método serológico es: la realización de diagnósticos individuales, levantar niveles de endemidad, evaluar medidas de control de transmisión, seleccionar donadores de sangre, evaluar actividades de drogas y comprobar respuestas inmunológicas.

En este estudio, el xenodiagnóstico probó ser un método bueno, además de ser el más sensible y específico, siendo más efectivo en tiempos medianamente lejanos de la desaparición de la parasitemia. Esto apoya la opinión de Fistein (13) sobre este método, quien dice que sólo detecta la infección en 20 - 40% de los pacientes

potencialmente infectados. Una inconveniencia es que el exámen podrá dar resultados hasta las 3 a 6 semanas después de la primera alimentación de las chinches.

La sensibilidad del xenodiagnóstico se ha descrito del 15 al 40% para casos crónicos. (23) Cerisola (7,22), hace referencia a la bondad de este método, pero aplicando un número elevado de triatomíneos, y hay evidencias de que se acrecienta la positividad de este método casi en 10% con el uso de más de una especie de chinches transmisoras. (1) La especie de uso preferente debe ser aquella natural de las regiones donde se está aplicando el xenodiagnóstico. (23)

Pereira (17) confirmó la variación en sensibilidad del xenodiagnóstico en pruebas reiteradamente practicadas.

La SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública) de Brasil (23), menciona que al menos 60% de los chagásicos crónicos presentan permanentemente al *T. cruzi* circulando en su sangre. De ahí la preferencia de muchos para usar el hemocultivo como método de diagnóstico de opción.

Brofen y Chiari (8) reportaron datos de hemocultivos y xenodiagnóstico con una muy alta incidencia de positividad, y en sus estudios utilizaron 30 ml de sangre para cada hemocultivo, y 40 ninfas de triatomíneos por paciente. Es claro que el presente trabajo difiere en mucho respecto a esos números, pero Minter y Goedbloed (15), comparando xenodiagnóstico y hemocultivo, obtienen una ventaja mucho mayor para los cultivos in vitro, indicando que diferían de

todos los trabajos anteriormente hechos con hemocultivos, en que la cantidad de sangre inoculada fue menor, 0.1 a 0.2 ml de sangre por 5 ml de medio, y cultivaron 1 a 2 ml de sangre por cada sujeto a prueba; la observación de sus cultivos se extendió más allá de los seis meses posteriores a la inoculación, y además se brindó mucha mayor atención a la detección de las fases amastigotes (intracelulares, no móviles) del T cruzi, que son las primeras en aparecer, y las cuales permanecen por períodos prolongados en el sedimento de los cultivos hechos en pacientes crónicos, en ausencia de las formas móviles.

En el presente trabajo, tanto los medios de cultivo para el diagnóstico, como los tiempos de observación, fueron distintos a los de Minter y Goedbloed, esperando observar formas móviles y no amastigotes. basado en el ciclo biológico del T. cruzi, en el cual el tripanosoma metacíclico pasa a amastigote, pero lo hacen preferentemente en células nucleadas, y si lo hicieran en células sanguíneas nucleadas como los polimorfonucleares, éstos contienen enzimas que provocan un estallido oxidativo, y sus gránulos secretores contienen proteínas altamente citotóxicas (21).

Si bien en 1972 Cerisola probó que los tripanosomas son viables en sangre total almacenada por el menos 18 días (19), hay que considerar también que algunos factores en la sangre, como las inmunoglobulinas presentes en el suero del paciente crónico, pueden aglutinar formas circulantes del parásito, e incluso producir una inhibición de su crecimiento en medio de cultivo, según advirtieron Minter y Goedbloed (15). Amado Neto, en 1966 (19) reportó que el

plasma es la fracción menos adecuada para la permanencia del parásito, considerando a los pacientes crónicos.

En el presente trabajo, este método de diagnóstico fue del todo negativo.

Por otro lado, la inoculación de animales, contrariamente a los resultados reportados bibliográficamente, fue medianamente sensible (50%), siendo más eficaz a mayor distancia de la inoculación con sangre infectada. La presencia de tripanosomas en la sangre indica que en los cobayos, en fase crónica y cuando se halló el mayor título de IgG (1:560), existían formas sanguíneas de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo.

El SUCAM (23) señala que los animales irradiados suelen aumentar bastante la sensibilidad del método de diagnóstico.

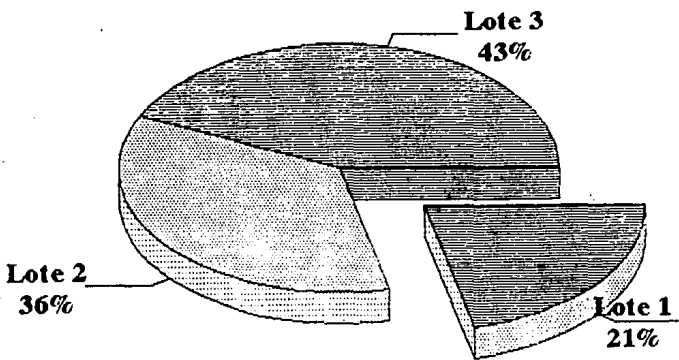
En vista de estos resultados, puede decirse que se estudió el diagnóstico de la fase crónica indeterminada (desde los 45 días a los 75 días posteriores a la desaparición de la parasitemia, es decir, por debajo del umbral microscópico), donde la concentración de anticuerpos se incrementa y no hay signos de la enfermedad de Chagas, características todas de carácter útil para el diagnóstico temprano y control de esta enfermedad.

Es claro, según muestra la figura 2, que el mayor porcentaje de positividad utilizando cuatro métodos de diagnóstico, es mucho mayor a los 75 días posteriores al alcance del umbral microscópico (42.8%), que a los 60 días (35.7%) y a los 45 días (21.4%).

**Figura 2**

**GRAFICA DE SECTORES CIRCULARES**

Comparación del porcentaje de positividad de cada lote respecto a todos los lotes.





**CAPITULO V**

## C O N C L U S I O N E S .

-Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas experimental en etapa crónica, el mayor porcentaje de positividad lo presentó el estudio serológico, siendo positivo en todos los tiempos posteriores al alcance de la etapa crónica aquí estudiados: 45,60 y 75 días.

-El xenodiagnóstico resultó ser un método eficaz para el diagnóstico de la misma enfermedad en fase crónica, con una positividad de 83.3%

-La inoculación de animales fue un método de diagnóstico también con resultados positivos, aunque no con la frecuencia que se obtuvo por xenodiagnóstico.

-El xenodiagnóstico y la inoculación de animales presentan mayor porcentaje de positividad a los 60 y 75 días posteriores al alcance de la etapa crónica.

-El hemocultivo resultó ser un método de diagnóstico ineficaz en todos los tiempos posteriores a la etapa crónica aquí estudiados.

-El estudio serológico por hemaglutinación indirecta resultó ser el más eficaz por su reactividad específica, y el más rápido para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas experimental en fase crónica.

-La respuesta humoral del huésped experimental se manifestó con inmunoglobulinas clase IgG, con un comportamiento exponencial, alcanzando como máximo título 1:540, a los 75 días posteriores a la desaparición de la parasitemia.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bronfen, E., F.S. Assis, G. Brandão. Isolamento de amostras do *T.cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 84 (2): 237-240; 1989.
- 2.- Camargo, M.E. Reacciones serológicas y consecuencias sociales de los resultados positivos a la enfermedad de Chagas. Bol Of Sanit Panamericana : 576-581, 1972.
- 3.- Camargo, M.E., C. Rebonato. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Amer J Trop Med Hyg 18 : 500-505, 1969.
- 4 - Camargo, M.E. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride formalin treated erythrocytes sensitized with *T.cruzi* extracts. Rev Inst Med Trop São Paulo 13: 45-55, 1971.
- 5.- Carraza-Bravo, T. Tripanosomiasis americana de Chagas. Bol Med Hosp Infant Mex 40 (8): 408-416, 1983.
- 6.- Cerisola, J., M. Alvarez. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Prensa Médica Argentina. : 2-8, 1980.
- 7.- Cerisola, J., E. Segura. EL XENODIAGNOSTICO Edit. Ministerio de Bienestar Social 1ra. ed. p 127. Argentina, 1974.
- 8.- Chiari, E., J. Dias. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease Rev soc bras med trop . 22 : 19 - 23 , 1989.

- 9.- Craig & Faust. PARASITOLOGIA CLINICA Edit.SALVAT 1ra ed. p 107 e 122. España, 1984.
- 10.- Despommier-Karapelou PARASITE LIFE CYCLES Edit. Springer Verlag, p 6 y 7. USA, 1990.
- 11.- Diaz, C., V. Nussenzweig. An improved polymerase chain reaction assay to detect *T.cruzi* in blood. Am J Trop Med Hyg 46 (5): 616 a 623, 1992.
- 12.- Figuerêdo-Silva, J.,Y. Kaneda. Epidemiological Survey of *T.cruzi* infection in North-Eastern Brazil using different diagnostic methods. Rev Inst Med Trop São Paulo 33 (3): 193-198, 1991.
- 13.- Fistein, B., M. Chowdhury. *Trypanosoma cruzi*. A suggested adjunct to xenodiagnosis. Annals of Tropical Medicine of Parasitology. 74 (2): 251-252, 1980
- 14.- Markell-Voge. PARASITOLOGIA, DIAGNOSTICO, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO. El Manual Moderno. De la 5ta. ed en inglés. p 382 México, 1987.
- 15.- Minter-Goedbloed, E., D.Minter. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *T.cruzi* in experimental and natural chronic infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 72 (3): 217-225, 1978
- 16.- Nazareth, M de , H. Santos. Recent contributions for a better understanding of the *T.cruzi* muscle cell interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz Suppl. 79 : 7-11, 1984.
- 17.- Pereira, V., A. Levy. Xenodiagnóstico, Hemocultura e Teste de lise mediada pelo complemento, como critérios de seleção de pacientes chagásicos crônicos para quimioterapia. Rev Inst Med Trop

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

São Paulo 31 (5): 305-307, 1989.

- 18.- Pinto D., J.C. Acute Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz Suppl 79: 85-91, 1984.
- 19.- Pinto D., J.C., S. Brener. Chagas' disease and blood transfusion. Mem Inst Oswaldo Cruz Suppl 79: 139-147, 1984.
- 20.- Pless, M., D. Juraneck. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *T.cruzi*, xenodiagnosis and domiciliary triatomine distribution. Am J Trop Med Hyg 47 (5): 539 - 546, 1992.
- 21.- Roitt, I. IMMUNOLOGY Edit. Mosby Company. 3ra. ed. p 17.1 a 17.21; Canada, 1985.
- 22.- Schenone, E. Alfaro. Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica. Bol Chil Parasitol 23: 149-154, 1968.
- 23.- SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública). Ministerio de Saúde. DOENÇA DE CHAGAS, CLINICA E TERAPÊUTICA. Edit. SUCAM 1ra ed. 94 pp Brasilia, 1990.
- 24.- Velasco-Castrejón, D., C. Guzmán. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev Lat-amer Microb 28: 275-283, 1986.
- 25.- Zigmen Brener. Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la tripanosomiasis americana. Organización Panamericana de la Salud. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; 21 de Marzo de 1975.

## A P E N D I C E

### PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

-PARA EL SERODIAGNOSTICO (reactivos incluidos en el equipo Chagatest HAI):

Antígeno HAI.- Preparar integrando el liofilizado con 5.2 ml de reconstituyente HAI. Esperar una hora antes de usar, mezclando cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplee, homogenizar mediante agitación evitando la formación de espuma. Una vez reconstituido, es estable durante 2 meses en refrigeración.

Glóbulos rojos no sensibilizados.- Homogenizar mediante agitación antes de usar, evitando la formación de espuma.

Diluyente de sueros HAI.- Agregar 0.2 ml de solución proteica por cada 10 ml de buffer HAI. Mezclar, rotular y fechar. Será estable en refrigeración 5 días, desde su preparación.

2-Mercaptoetanol ( 2-Me).- Una vez abierta la ampolleta, preparar una dilución 1:100 con solución fisiológica en cantidad suficiente, de acuerdo al número de pocillos que se utilizan. Usar inmediatamente después de prepararlo.

Nota: Los reactivos son estables en refrigeración ( 2- 10 ° C) hasta la fecha de vencimiento de la caja. No congelar.

**-PARA EL MANEJO DE ANIMALES.**

Mezcla de alcohol yodado .- Colocar en un mortero 0,5 g de cristales de yodo y macerar poco a poco con alícuotas de 15 ml de etanol, para un total de 500 ml hasta que se disuelva. Vertir en un frasco ámbar, tapar y etiquetar.

Fenol al 3%.- Colocar 3 g de fenol en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar hasta la marca con agua. Vertir en un frasco de vidrio de boca ancha, tapar y etiquetar.

Solución fisiológica salina al 0.85% .- Pesar 0.85 g de NaCl (químicamente puro), colocarlo en un matraz volumétrico de 100 ml; adicionar 30 ml de agua destilada y disolver; luego, aforar hasta la marca de aforo con agua destilada. Vertir en un frasco de vidrio, tapar y etiquetar.

Solución de ácido pícrico al 1% .- Tomar un matraz Erlenmeyer, adicionar 1 g de ácido pícrico y disolver (con alícuotas agregadas poco a poco) con agua destilada. Si es necesario, ayudar la disolución con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado.

**-PARA EL HEMOCULTIVO.**

Gelosa sangre al 5% .- En una balanza granataria, pesar 4.8 g de



base de agar sangre. Vertir el polvo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y adicionar 120 ml de agua destilada.

Tapar el matraz y dejar reposar 5 minutos.

Mezclar hasta que la suspensión sea uniforme. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante 1 minuto.

Esterilizar a 121 ° C (15 libras de presión) durante 20 minutos.

Después de esterilizar, hacer rotar el matraz para asegurar una buena distribución.

Esperar a que la temperatura del medio en el matraz sea tolerada por la mejilla, y vertir, en medio estéril, 6 ml de sangre completa con anticoagulante, sin dejar de mover el medio en el matraz para asegurar una buena distribución.

Rápidamente, instalar un pipetor estéril a la boca del matraz (en zona estéril) y bombear el medio con la sangre: tomar un tubo de 15 x 150 mm de rosca, estéril, y vertir 10 ml, tapar e inclinar para que solidifique en pico de flauta; repetir la operación con los otros 5 tubos de rosca. Guardar a temperatura ambiente.

Luego de 2 días, verificar la esterilidad del medio.

Si no hubo contaminación, en zona estéril vertir solución salina al 0.85% estéril a cada tubo hasta que llegue al nivel del pico de flauta. Tapar bien los tubos y mantenerlos en refrigeración (4°C) hasta que se utilicen.