

Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México

Angel Ramos-Ligonio, QFB, M en C, Dr.⁽¹⁾ Michaía Elián Ramírez-Sánchez, QFB,⁽¹⁾
Juan Carlos González-Hernández, QFB,⁽¹⁾ José Luis Rosales-Encina, QFB, M en C, Dr.⁽²⁾
Aracely López-Monteon, QFB, M en C, Dr.⁽¹⁾

Ramos-Ligonio A, Ramírez-Sánchez ME,
González-Hernández JC, Rosales-Encina JL,
López-Monteon A.
Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México.
Salud Publica Mex 2006;48:13-21.

Ramos-Ligonio A, Ramírez-Sánchez ME,
González-Hernández JC, Rosales-Encina JL,
López-Monteon A.
Prevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood bank donors from the IMSS General Hospital in Orizaba, Veracruz, Mexico.
Salud Publica Mex 2006;48:13-21.

Resumen

Objetivo. Determinar la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores del Hospital General Regional del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de Orizaba, Veracruz. **Material y métodos.** Se examinaron muestras de donadores del banco de sangre del Hospital General Regional (HGRO) del IMSS para la búsqueda de anti-*T. cruzi* por ELISA, Western blot e IFI, utilizando una proteína recombinante (MBP::Hsp70) y un extracto crudo de epimastigotes. Las muestras fueron obtenidas entre los meses de octubre de 2001 a enero de 2002. **Resultados.** Los 420 donadores de sangre analizados fueron seronegativos para HBV, HCV, BrA, VDRL y HIV. Después del tamizaje de los 420 donadores, se identificaron dos individuos seropositivos por las pruebas de ELISA, Western blot e IFI, con una seroprevalencia de 0.48%. **Conclusiones.** En este estudio se muestran evidencias de seropositividad para *T. cruzi* en donadores de sangre del HGRO, lo que sugiere la existencia de riesgo de contaminación por transfusión sanguínea. Por tal motivo, es necesario aplicar programas para el tamizaje serológico a través de técnicas inmunológicas con alta sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: enfermedad de Chagas; proteína recombinante; serodiagnóstico; México

Abstract

Objective. To estimate the prevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors from Hospital General Regional (HGRO) of the Mexican Institute of Social Security (IMSS per its abbreviation in Spanish). **Material and Methods.** Between October 2001 and January 2002, blood samples were collected from voluntary donors at the blood bank of the Hospital General Regional of IMSS in Orizaba; Veracruz, Mexico. The samples were assayed for anti-*T. cruzi* by ELISA, Western blot and IFI, using a recombinant protein (MBP::Hsp70), and crude extract from epimastigotes. **Results.** A total of 420 blood donors were studied; two of them were seropositive for ELISA, Western blot and IFI, with a seroprevalence of 0.48%. **Conclusions.** Some blood donors at the HGRO hospital were seropositive for *T. cruzi*, showing the risk of contamination by blood transfusion. Routine serologic screening with highly sensitive and specific immunological techniques are needed.

Key words: Chagas disease; recombinant protein; serodiagnosis; Mexico

- (1) Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, LADISER Inmunología y Biología Molecular, México.
(2) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Patología Experimental, México.

Fecha de recibido: 9 de diciembre de 2004 • Fecha de aprobado: 28 de octubre de 2005

Solicitud de sobretiros: Dra. Aracely López Monteon. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, LADISER Inmunología y Biología Molecular. Prolongación Oriente 6, No. 1009, Col. Rafael Alvarado, Orizaba, Veracruz, México.
Correo electrónico: aralopez@uv.mx

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomosis americana, es un problema de salud pública en 17 países latinoamericanos, donde es endémica. Debido a su impacto económico, a partir de 1993 el Banco Mundial la considera como la enfermedad parasitaria más grave en América.¹ El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*; los vectores naturales de este parásito son chinches del género *Triatoma*. Al alimentarse y excretar heces infectadas, la chinche transmite al huésped mamífero este agente patógeno, lo que permite que *T. cruzi* penetre a través de las heridas o mucosas. La transmisión vectorial es la forma normal de infección entre los animales y es la más común en el hombre, pero se puede adquirir también mediante transfusión sanguínea o trasplante de órganos de personas infectadas, así como por vía congénita y, más raramente, por la ingestión de sustancias contaminadas o por la infección accidental en el laboratorio.² De éstas, la infección por transfusión sanguínea es el segundo mecanismo de transmisión después de la vectorial, debido al incremento de la migración de personas de las zonas rurales endémicas a zonas urbanas donde no existen los triatominos,³⁻⁵ e incluso a zonas rurales no endémicas. De manera que la tripanosomosis americana es otra de las enfermedades sociales o de la pobreza, y en México se podría considerar como un riesgo de salud emergente.⁶

En países en vías de desarrollo, como el nuestro, la prevención de la transmisión de enfermedades infecciosas a través de la transfusión sanguínea es difícil debido a que las fuentes necesarias para llevar a cabo los estudios no siempre están disponibles, aun cuando existan las políticas y las estrategias adecuadas. Sin embargo, la transmisión de la infección se puede prevenir al seleccionar a los donadores de sangre a través de la aplicación de cuestionarios, y al limitar el número de transfusiones. Las enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión pueden estimarse sobre las bases del nivel del tamizaje para cada agente infeccioso en la población donadora; para este fin se utilizan pruebas que se basan en la búsqueda de anticuerpos, lo cual representa la medida más adecuada para eliminar la sangre contaminada.⁷

El diagnóstico serológico de la tripanosomosis americana en su fase crónica es obligado, ya que es difícil la demostración del parásito en circulación o en los tejidos;⁶ de igual manera resulta difícil establecer un diagnóstico confirmativo durante las fases asintomáticas o con cuadros clínicos leves, por lo que es importante la estandarización de las pruebas serológicas para demostrar los anticuerpos contra *T. cruzi*.^{8,9}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reco-

miendan que se utilice más de un procedimiento serológico para reducir el error en el diagnóstico.¹⁰ La confirmación de un caso indeterminado de tripanosomosis americana por diagnóstico serológico se establece cuando hay al menos dos pruebas serológicas positivas.¹¹ El reconocimiento de donadores de sangre seropositivos a *T. cruzi* es recomendado como una prueba de rutina en los bancos de sangre, pero el problema práctico que enfrentan los bancos de sangre en el tamizaje de individuos chagásicos es el porcentaje tan variado de muestras que presentan reactividad alrededor del valor de corte. Por tanto, para el tamizaje de donadores de sangre, se recomienda tener un valor de corte lo más bajo posible para asegurar la alta sensibilidad, y de esta forma no tener un gran número de falsos positivos. Para incrementar la eficiencia de la prueba se deben utilizar fracciones puras inmunodominantes de *T. cruzi* o proteínas recombinantes.¹²

En este trabajo se estimó la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en donadores del banco de sangre del Hospital General Regional (HGRO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de Orizaba; Veracruz, utilizando como antígenos un extracto crudo de *T. cruzi* y la proteína recombinante MBP::Hsp70 para el tamizaje de los sueros, encontrándose la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por las diferentes técnicas ensayadas en los sueros analizados. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante MBP::Hsp70 reconocen una proteína nativa de 85 kDa en extracto total de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes provenientes de diferentes aislados de *T. cruzi*; asimismo, reconocen una proteína en *Criethidia luciliae*, pero ésta no es compartida por los miembros del género *Leishmania*.¹³

Material y métodos

Población de estudio

Se obtuvieron sueros de 500 donadores de sangre del Banco de Sangre del HGRO del IMSS de Orizaba, Veracruz. Dentro de los criterios de selección se incluyeron personas entre 18 y 65 años de edad que presentaran una seronegatividad al virus de la hepatitis B (HBV), de la hepatitis C (HCV), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), a la *Brucella abortus* (BrA), al VDRL y al virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH).

Las muestras fueron obtenidas entre los meses de octubre de 2001 a enero de 2002; a los donadores que aceptaron participar se les aplicó un cuestionario clínico-epidemiológico sobre datos personales, hábitos y costumbres, tipos de vivienda, manifestaciones clínicas y reconocimiento de los triatominos.

Obtención de sueros

La obtención de las muestras de los donadores de sangre fue colectada de la vena periférica mediante el sistema Vacutainer. De acuerdo con las encuestas realizadas y con los estándares establecidos por el banco de sangre, de las 500 muestras sólo se obtuvieron 420 sueros de hemodonadores para la realización del estudio. El suero fue separado por centrifugación a $1\,200 \times g$ durante 10 minutos, alicuotado en tubos eppendorf y congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Expresión y purificación de la proteína MBP::Hsp70

El fragmento *TcHsp70* fue obtenido de la siguiente manera: a partir de una biblioteca de cDNA de amastigotes de *T. cruzi* en el vector lambda gt11 se obtuvo la clona *TcHsp70* mediante el tamizaje con un pool de sueros de pacientes chagásicos.⁵ Para la obtención de la proteína recombinante MBP::Hsp70 se clonó el fragmento de cDNA *TcHsp70* en el sitio *Eco* RI del vector de expresión pMAL-C2 (New England BioLabs) dando lugar al plásmido pMAL-Hsp70. Este plásmido se utilizó para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α . Finalmente, la proteína recombinante MBP::Hsp70 (125 kDa) fue inducida y purificada de acuerdo con las instrucciones del proveedor.¹⁴

Preparación del extracto crudo de *T. cruzi*

Los parásitos (epimastigotes) de la cepa Y de *T. cruzi* se cultivaron y propagaron en un medio (LIT), suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Los parásitos en fase logarítmica fueron colectados por centrifugación, la pastilla obtenida se resuspendió en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM y KH_2PO_4 1.4 mM pH 7.4) y fueron sometidos a ciclos de congelación-descongelación para lisar a los parásitos. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford.

Tamizaje de sueros

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en las 420 muestras de suero empleando como prueba tamiz la técnica de ELISA y utilizando como antígeno la proteína recombinante MBP::Hsp70. Se utilizaron placas de fondo plano (Costar) las cuales se recubrieron con la proteína MBP::Hsp70 a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, y se incubaron durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el antígeno no unido y se bloquearon las placas

con 200 μl de PBS las cuales contenían 5% de leche descremada y fueron incubadas durante dos horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente se incubaron las placas con 50 μl de cada uno de los sueros de los hemodonadores a una dilución final de 1:50 por triplicado. Se lavaron cuatro veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM y KH_2PO_4 1.4 mM, pH 7.4), que contenía 0.05% de Tween 20 (PBST). Después de los lavados, se agregó a cada uno de los pozos 50 μl de un anticuerpo cabra antihumano (Zymed) acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:1 000 en PBST y fue incubado durante una hora a temperatura ambiente. Después de ocho lavados y uno adicional únicamente con PBS se adicionaron 100 μl de la solución sustrato (citrate de sodio 100 mM pH 4.2, H_2O_2 0.03%, que contenía 1mg/ml de ABTS [2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid] (Zymed); después de 10 minutos, las placas fueron leídas a 415 nm en un lector de ELISA (Multiscan Lab System). Los sueros positivos fueron sometidos a un segundo tamizaje utilizando como antígenos un extracto crudo de epimastigotes de *T. cruzi* (ECE) y la proteína MBP::Hsp70. El valor de corte (vc) para este ensayo se estableció mediante la media obtenida de una muestra de 25 sueros de sujetos sanos más cuatro desviaciones estándar. Para el caso de la proteína MBP::Hsp70, el valor de corte se fijó en 0.230 U de densidad óptica (DO), mientras que para el ECE, en 0.215 U de DO. Los sueros que arrojaron resultados positivos mediante la prueba ELISA, fueron procesados para la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* empleando otras dos pruebas serológicas diferentes (WB y IFI).

Western blot con sueros de hemodonadores (WB)

200 μg de la proteína MBP::Hsp70 y de ECE de *T. cruzi* (cepa Y) fueron separados electroforéticamente en gels de poliacrilamida-SDS al 10% en presencia de un amortiguador de muestra (Glicerol 2%, SDS 4%, Tris-HCl 50 mM pH 6.8, β -ME 200 mM, azul de Bromofenol 0.2%),¹⁵ y transferidos a papel de nitrocelulosa (BIO-RAD) para su inmunodetección.^{16,17} Los sueros de cada individuo fueron utilizados como anticuerpos primarios a una dilución de 1:100 en TBS-T (NaCl 150 mM, Tween 20 0.05 %, leche descremada 2%, y Tris-HCl 10 mM pH 7.4). Los anticuerpos unidos a la membrana fueron detectados utilizando un segundo anticuerpo IgG cabra antihumano conjugado a fosfatasa alcalina (Pierce) a una dilución de 1:5 000 y luego revelado con NBT (nitroazul de tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) (sigma).

Las muestras fueron consideradas positivas cuando se observó por lo menos una banda de reconoci-

miento diferente a la del control de segundo anticuerpo (2° Ab).

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los sueros que arrojaron resultados positivos mediante la prueba de ELISA fueron procesados por IFI de acuerdo con lo descrito por Ramos-Echevarría y colaboradores.¹⁸ Brevemente, se colocó en un portaobjetos una suspensión de epimastigotes de la cepa, se fijaron los parásitos, y los sueros de los donadores y los controles fueron diluidos 1:50 en PBS e incubados por 30 minutos en cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados e incubados con el segundo anticuerpo anti-IgG humano conjugado a fluoresceína a una dilución de 1:20 durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, los portaobjetos fueron observados en un microscopio de epifluorescencia. La presencia de una fluorescencia verde sobre los parásitos fue considerada como prueba positiva. Las muestras positivas se marcaron con una +/+++ de acuerdo con el grado de fluorescencia observado, utilizando como punto de referencia un control positivo.

En todos los ensayos serológicos se utilizó como control positivo un *pool* de sueros de pacientes chagásicos y como control negativo sueros de humanos normales.

Resultados

La población estudiada tuvo las siguientes características: 420 donadores voluntarios en edad reproductiva (entre 18 y 65 años), de los cuales 402 (95.7%) eran hombres y 18 (4.3%) mujeres, con una edad promedio de 35.4 años, y con un promedio de 20.3 años de residencia. 173 (41.3%) provenían de la ciudad de Orizaba, 62 (14.8%) de Ixtaczoquitlán, 62 (14.8%) de Río Blanco, 37 (8.8%) de Ciudad Mendoza, 31 (7.4%) de Córdoba, 31 (7.4%) de Nogales, 12 (2.8%) de Tezonapa, 6 (1.4%) de Ixhuatlancillo y 6 (1.4%) de Amatlán de los Reyes, Veracruz. 25.5% (107) eran empleados, 13.6% (57) obreros, 11.2% (47) profesionistas, 9.5% (40) se dedicaba al comercio, 7.6% (32) al campo, 6.9% (29) eran estudiantes, 4.3% (18) se dedicaba a labores del hogar y 21.4% (90) a otras actividades. 89% (374) habitaba en viviendas con pared de ladrillos y 11% (46) en casas con paredes de lámina. 70.4% (296) habitaba en viviendas con techo de lámina de asbesto, 6.6% (28) en casas con techo de teja y 23% (96) de concreto; 100% habitó en viviendas con piso de cemento. 42% (177) convivió con animales domésticos (perros y gatos) y sólo 7.1% (30) reconoció a los triatominos.

Detección de anticuerpos por ELISA

Los 500 sueros que se obtuvieron de los donadores de sangre se probaron de forma rutinaria para la presencia de anticuerpos contra HBV (1.6%), HCV (0.2%), BrA (2.6%), VDRL (0.2%) y VIH (0), de los cuales 80 sueros resultaron positivos para la presencia de estos antígenos y, por lo tanto, fueron eliminados, por lo que quedaron únicamente 420 sueros (cuadro I). El tamizaje de los 420 sueros de los hemodonadores se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA, y se utilizó como antígeno la proteína recombinante *MBP::Hsp70*. El tamizaje se realizó por triplicado de acuerdo con lo descrito en Materiales y métodos. Los sueros que resultaron discordantes en sus lecturas se procesaron nuevamente para determinar el resultado definitivo. Con el valor de corte obtenido para la proteína *MBP::Hsp70* se descartaron 384 sueros (dato no mostrado) por lo que quedaron solamente 36 muestras, a las cuales se les realizó un segundo tamizaje por el método de ELISA, para el que se utilizaron las diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 de cada uno de los sueros problema.

Dado que con todas estas diluciones se tenía el mismo resultado, se decidió trabajar con la dilución de 1:200 (dato no mostrado). Los 36 sueros seleccionados en el primer tamizaje fueron sometidos a un segundo tamizaje, para el que se utilizaron como antígenos un ECE y la proteína *MBP::Hsp70*. Los sueros fueron diluidos 1:200; se incluyó además un control de segundo anticuerpo (antihumano-peroxidasa), la lectura obtenida con este control se restó al valor obtenido para cada una de las 36 muestras de suero, en donde sólo 16 (3.8%) de los 420 sueros resultaron positivos contra ECE (figura 1A) y 11 (2.62%) contra la proteína *MBP::Hsp70* (figura 1B), ya que estos sueros dieron valores por arriba del valor de corte. Cuando se utilizó la proteína recombinante se observó la presencia de cinco falsos positivos, ya que los sueros 3 (donador 32), 4 (donador 78), 7 (donador 105), 19 (donador 209) y 26 (donador 238) reaccionaron contra ECE pero no contra la proteína *MBP::Hsp70* (cuadro II).

Los sueros que resultaron positivos (valores de DO arriba del valor de corte) por la prueba de ELISA fueron sometidos a la prueba de Western blot e IFI para confirmar la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

Western blot con sueros de hemodonadores

Para confirmar la positividad de 36 de las 420 muestras ensayadas por el método de ELISA, se realizaron pruebas de Western Blot; se utilizaron como antígenos la

Cuadro I
SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA HBV, HCV, BRA, VDRL Y VIH EN HEMODONADORES DEL BANCO DE SANGRE DEL HGRO, ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO

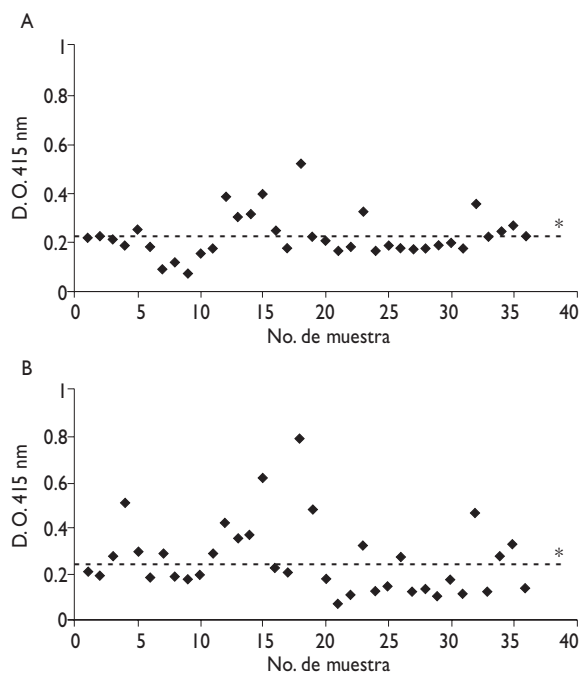
Antígenos	Porcentaje
HBV	1.6
HCV	0.2
BrA	2.6
VDRL	0.2
VIH	0
Total de muestras= 500 sueros	

proteína recombinante *MBP::Hsp70* purificada (figura 2A) y ECE (figura 2B) de una cepa de referencia de *T. cruzi*, los cuales se separaron electroforéticamente y se transfirieron a papel de nitrocelulosa; de acuerdo con lo descrito en los Materiales y métodos, se utilizó una dilución de 1:100 de los sueros de los hemodonadores y de los controles positivos y negativos.

En la figura 2, se observa el reconocimiento de los sueros, en donde los sueros 32 (carril 3), 78 (carril 4), 80 (carril 5), 105 (carril 7), 138 (carril 16), 196 (carril 18), 209 (carril 19), 223 (carril 24), 232 (carril 25), 238 (carril 26) y 362 (carril 33) reconocen bandas en el ECE que son diferentes a las bandas observadas en el control de segundo anticuerpo (2° Ab), mientras que los sueros de los carriles 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 20 no pueden considerarse positivos ya que reconocen las mismas bandas que el control de 2° Ab (figura 2B); el patrón de reconocimiento de los sueros por las proteínas fue muy variado y reconocen de 1-15 bandas en el ECE. Sin embargo, de todos estos sueros únicamente el suero 196 (carril 18) reconoce a la proteína *MBP::Hsp70*; por lo tanto, sólo 11 (2.62%) de los 420 sueros reconocen por lo menos una banda en ECE (figura 2B) y sólo 1 (0.24%) reconoce a la proteína *MBP::Hsp70* (figura 2A).

Inmunofluorescencia indirecta con sueros de hemodonadores

Debido a las discrepancias observadas en el reconocimiento de los sueros en los ensayos de ELISA y WB, se decidió realizar una tercera prueba serológica recomendada por la OMS y por la OPS. Los 36 sueros de los donadores que resultaron positivos mediante ELISA fueron utilizados para confirmar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por ensayos de IFI, de los cuales solamente dos sueros resultaron positivos (donadores



*Valor de corte

FIGURA 1. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS α -*T. CRUZI* POR ELISA UTILIZANDO LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *MBP::Hsp70* (A) Y ECE (B). CADA PUNTO CORRESPONDE A UNO DE LOS 36 SUEROS DEL SEGUNDO TAMIZAJE REALIZADO MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA A UNA DILUCIÓN DE 1:200. ESTE RESULTADO ES REPRESENTATIVO DE TRES EXPERIMENTOS INDIVIDUALES

127 y 196) por la técnica de IFI, lo cual resulta en una prevalencia final de 0.48% (cuadro II).

Discusión

La transfusión sanguínea es una de las formas de transmisión de la enfermedad de Chagas y es considerada como la segunda vía de adquisición de la infección.¹⁹ La infección por *T. cruzi* no es autolimitante, y todo individuo infectado representa un reservorio potencial del parásito. De esta forma, la alta prevalencia de la infección en áreas que experimentan altos índices de migración representa un riesgo en la diseminación del parásito, y justifica de forma importante la realización de estudios adicionales sobre el riesgo que representa la transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea en México.²⁰

El diagnóstico etiológico de la tripanosomosis americana está basado en la presencia de anticuerpos contra el parásito protozoario *T. cruzi* en el suero de

Cuadro II
DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-T. CRUZI EN HEMODONADORES DEL BANCO DE SANGRE DEL HGRO
DE ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO

Folio/Donador	Prueba tamiz ELISA Dilución 1:200		Western blot* Dilución 1:100		IFI* Dilución 1:50
	ECE vc 0.215	MBP::Hsp70 vc 0.230	ECE	MBP::Hsp70	
1/27	0.209	0.216	-	-	-
2/28	0.194	0.220	-	-	-
3/32	0.280	0.212	+	-	-
4/78	0.508	0.184	+	-	-
5/80	0.300	0.249	+	-	-
6/81	0.187	0.178	-	-	-
7/105	0.291	0.085	+	-	-
8/108	0.189	0.117	-	-	-
9/114	0.179	0.074	-	-	-
10/118	0.195	0.152	-	-	-
11/121	0.290	0.176	-	-	-
12/127	0.425	0.386	-	-	++
13/128	0.356	0.302	-	-	-
14/130	0.369	0.313	-	-	-
15/136	0.619	0.396	-	-	-
16/138	0.229	0.247	+	-	-
17/193	0.204	0.173	-	-	-
18/196	0.790	0.519	+	+	+++
19/209	0.479	0.220	+	-	-
20/210	0.181	0.208	-	-	-
21/211	0.072	0.166	-	-	-
22/217	0.108	0.177	-	-	-
23/220	0.326	0.324	-	-	-
24/223	0.124	0.163	+	-	-
25/232	0.142	0.185	+	-	-
26/238	0.273	0.174	+	-	-
27/252	0.126	0.168	-	-	-
28/274	0.133	0.173	-	-	-
29/347	0.105	0.185	-	-	-
30/351	0.176	0.194	-	-	-
31/356	0.113	0.173	-	-	-
32/357	0.466	0.354	-	-	-
33/362	0.122	0.220	+	-	-
34/395	0.279	0.245	-	-	-
35/398	0.330	0.265	-	-	-
36/412	0.140	0.224	-	-	-
	16/420	11/420	11/420	1/420	2/420
Prevalencia					0.48%

* Los criterios de positividad se mencionan en Material y métodos

vc: valor de corte

individuos infectados. Estos anticuerpos se han detectado principalmente empleando diferentes pruebas serológicas; de estas pruebas convencionales, las más ampliamente utilizadas son las de HAI, IFI y ELISA, debido a su simplicidad, bajo costo y a los buenos resultados que arrojan en términos tanto de especificidad

como de sensibilidad. Todas estas técnicas se basan en el empleo de fracciones antigénicas semipurificadas o totales de epimastigotes de *T. cruzi*. La inclusión de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* ha mostrado avances en términos de la especificidad,

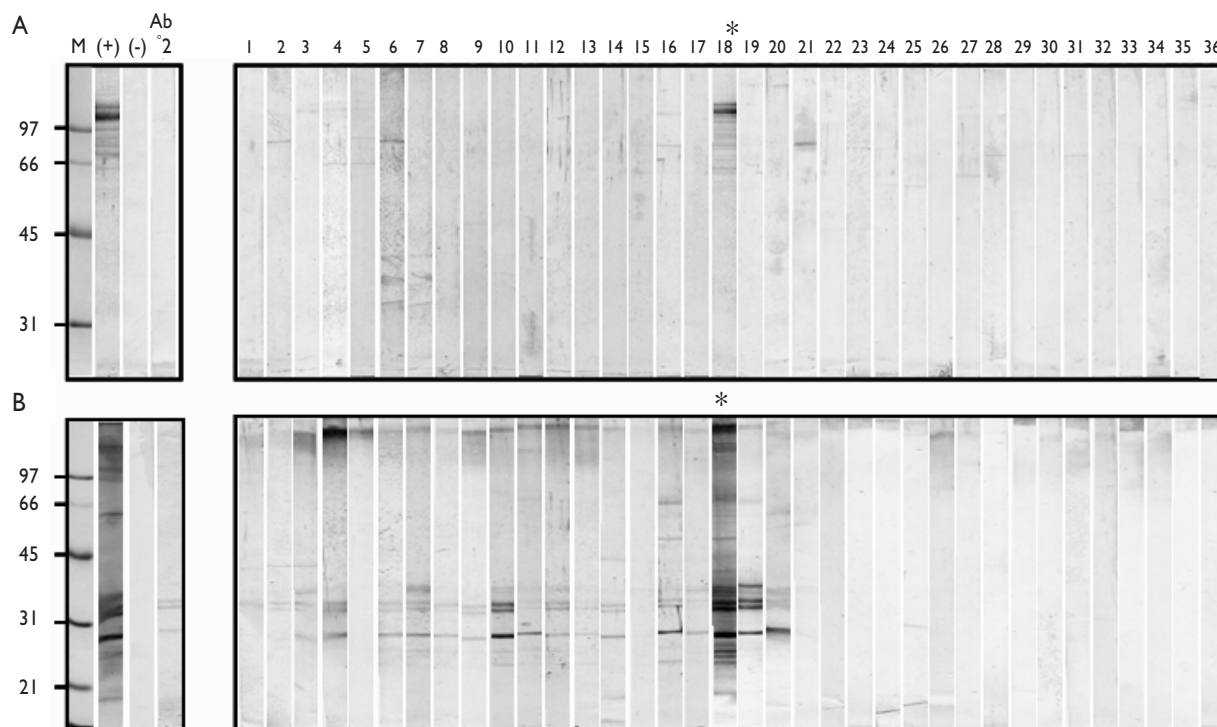


FIGURA 2. WESTERN BLOT CON EL SUERO DE HEMODONADORES. LOS SUEROS DE LOS DONADORES QUE RESULTARON POSITIVOS AL SEGUNDO TAMIZAJE POR EL MÉTODO DE ELISA SE PROBARON EN UN ENSAYO DE WESTERN BLOT A UNA DILUCIÓN DE 1:100 PARA CONFIRMAR SU POSITIVIDAD CONTRA (A) LA PROTEÍNA MBP::Hsp70, Y CONTRA (B) EXTRACTO CRUDO DE *T. CRUZI* DE LA CEPA Y. (M) MARCADORES DE PESO MOLECULAR, (+) CONTROL POSITIVO, (-) CONTROL NEGATIVO, (2° Ab) CONTROL DE SEGUNDO ANTICUERPO. (1-36) SUEROS DE LOS DONADORES DE SANGRE. (*) INDICA LA POSITIVIDAD DE LA MUESTRA. ESTE RESULTADO ES REPRESENTATIVO DE TRES EXPERIMENTOS INDIVIDUALES

además tiene la ventaja de que pueden purificarse fácilmente y en cantidades considerables con un alto grado de pureza.²¹ Los antígenos recombinantes son más específicos que los extractos del parásito, ya que estos últimos pueden presentar una reacción cruzada con sueros de pacientes con otras enfermedades tales como la leishmaniasis²² o la infección con *Trypanosoma rangeli*.²³ En este estudio se utilizaron la proteína recombinante MBP::Hsp70, anteriormente llamada pMalE63⁵ y tres pruebas serológicas diferentes (ELISA, WB e IFI) para determinar anticuerpos anti-*T. cruzi* en 420 muestras séricas de hemodonadores. A todas las muestras se les detectaron primero anticuerpos contra *T. cruzi* con la prueba tamiz de ELISA, debido a que presenta una alta sensibilidad. La proteína MBP::Hsp70 se utilizó para el diagnóstico, ya que no presenta reacción cruzada contra otros tripanosomátidos y además se encuentra expresada en todos los estadios de *T. cruzi*,¹³ así como un extracto crudo de epimastigote (ECE). Con esta técnica se obtuvieron 16 positivos de 420 (16/420)

cuando se utilizó como antígeno ECE, mientras que con MBP::Hsp70, solamente 11 positivos (11/420), en donde los sueros 32, 78, 105, 121 y 238 tienen valores cercanos al valor de corte (cuadro II). Los resultados obtenidos con la prueba tamiz pueden indicar que la detección de casos con títulos muy bajos de anticuerpos y cercanos al límite de detección de la prueba resulta un problema, ya que al ajustarlas a alta sensibilidad se incrementa el riesgo de falsos positivos, como informan Sosa-Jurado y colaboradores,⁶ pues las muestras discordantes se ubicaron en valores cercanos al límite de detección de la prueba. Por esta razón, las muestras fueron sometidas a análisis mediante Western blot contra ambos antígenos. Esta técnica ha sido empleada también por otros investigadores;^{5,24,25} aunque esta prueba no se utiliza de rutina, representa una buena prueba secundaria, pues es rápida y fácil de realizar, además de que no se necesita equipo especial y los datos pueden ser leídos visualmente o por densitometría. No se considera como un sustituto para la sero-

logía convencional, pero se puede utilizar como una prueba alternativa y complementaria para la confirmación de la tripanosomosis americana.²⁴

Mediante esta técnica se obtuvieron 11 positivos de 420 cuando se utilizó como antígeno el ECE y solamente un positivo contra la proteína MBP::Hsp70 (donador 196); sin embargo, las muestras positivas por ELISA no fueron las mismas que se detectaron por la técnica de WB. Estas diferencias pueden deberse al tipo de anticuerpo detectado, puesto que en la prueba de ELISA se reconocen generalmente anticuerpos dirigidos contra conformación (epitopos conformacionales), mientras que en los ensayos de WB se reconocen anticuerpos dirigidos contra secuencia (epitopos lineales) puesto que el antígeno se encuentra desnaturalizado.^{26,27} Aunado a esto, Schechter y Nogueira informaron que pueden existir variaciones en el perfil de antígenos de superficie de *T. cruzi* cuando los extractos se preparan por diferentes metodologías.²⁸ La variación en la composición antigénica de los parásitos asociados a la respuesta inmune de cada individuo puede dar como resultado la activación de diferentes clones de linfocitos y por lo tanto la producción de anticuerpos con diferentes especificidades.²⁹ Debido a estas diferencias, se realizó una tercera prueba serológica distinta pero de igual sensibilidad que la prueba de ELISA, como es el caso de la prueba de IFI, en donde únicamente los sueros 127 y 196 resultaron positivos, ambos de sexo masculino. La muestra 127 proviene de un individuo que vive en Ixhuatlancillo y la muestra 196 de un individuo proveniente de Ixtaczoquitlán; en este último municipio se ha registrado la presencia del vector (*T. dimidiata*).³⁰ La edad promedio de los casos positivos fue de 43.5 años y ninguno de ellos reconoció a los triatominos.

Los resultados obtenidos mediante los análisis de ELISA, Western blot e IFI muestran una seropositividad para *T. cruzi* de 0.48% (2/420). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en 1999 por el grupo de Monteón-Padilla y colaboradores,⁵ en donde emplearon el mismo antígeno recombinante MBP::Hsp70 (pMal-E63). Dicho estudio obtuvo una seropositividad de 0.30% en pacientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología en la ciudad de México, más alta aún que para VIH, VDRL, hepatitis B y C. Existen informes que expresan la necesidad de llevar a cabo una evaluación de la distribución y la prevalencia de esta infección en México.^{4,19,31} De igual manera, en un estudio realizado con 65 000 donadores de sangre provenientes de 18 centros de transfusión gubernamental se mostró una prevalencia de anticuerpos anti*T. cruzi* de 1.5%, en donde la mayor prevalencia se encontró en la Huasteca y en el sureste de México.⁴ Sánchez-Guillén y colaboradores³² registraron una pre-

valencia de anticuerpos anti*T. cruzi* de 8.5% y de 9% con las técnicas de IHA y ELISA, en bancos de sangre de las clínicas y hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de Puebla.³² En todos estos estudios se propone la realización rutinaria del tamizaje serológico de donadores de sangre por medio de técnicas inmunológicas con alta sensibilidad y especificidad para reducir el riesgo de contaminación por transfusión sanguínea. En los últimos años, en México se ha aprobado una ley para el tamizaje de muestras que permite determinar la presencia de anticuerpos anti*T. cruzi*, así como programas de vigilancia epidemiológica en diversas partes del país; sin embargo, en algunas entidades todavía no se llevan a cabo.

Si bien la ciudad de Orizaba, Veracruz, no es un punto crítico de interés económico para el país, experimenta una tasa de migración alta debido a la cercanía de zonas rurales tales como Zongolica, Tequila, Tuxpanguillo, La Perla y Jalapilla, entre otras 11 localidades, además de ser el paso obligado de inmigrantes de Centro y Sudamérica hacia el norte del país, quienes al igual que la población estudiantil que arriba a esta ciudad desde diferentes puntos del estado de Veracruz, constituyen un flujo de migración importante. Los resultados que arroja este trabajo indican que la infección está presente y sugieren que existe un riesgo de contaminación por transfusión sanguínea; asimismo, reiteran a ésta como una vía para la transmisión de la enfermedad de Chagas. Además, recientemente, a través de campañas de control vectorial realizadas por la VII Jurisdicción Sanitaria, se han capturado ejemplares de *Triatoma* en domicilios de la región (Ixtaczoquitlán, Ayojapa I y II, Chicomapa, San Vicente, El Palmar, Mochichino, Tuxpanguillo, Tezonapa, Ixhuatlancillo, etc.) con infección natural, lo cual indica la posibilidad de la transmisión vectorial del parásito. Con base en estos hallazgos y en la amplia heterogeneidad de los estudios realizados en México, está claramente demostrado que la enfermedad de Chagas está presente en varias áreas del país, por lo cual es necesario contar con mayor información sobre la biología y epidemiología de la infección, así como de los reservorios identificados, y por otra parte identificar si los reservorios pueden influenciar en la virulencia del parásito y de su transmisión en la región, para que permitan un mejor desarrollo de estrategias que aseguren la disminución del riesgo de infección y garanticen la calidad de vida de los habitantes de esta región.

Finalmente, el empleo de varias técnicas serológicas asegura la confiabilidad de los resultados; se recomienda la inclusión de antígenos recombinantes para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* si se realiza en paralelo con una prueba convencional, como es el caso de la prueba de ELISA y de IFI, con lo que se puede

obtener la especificidad deseada con el antígeno recombinante y la sensibilidad requerida empleando un extracto crudo del parásito.²¹

Agradecimientos

Al personal del Banco de Sangre del Hospital General Regional de Orizaba del IMSS por su asistencia técnica para la obtención de las muestras empleadas en este trabajo. A la Dra. Elena Rustrián Portilla por la revisión crítica de la propuesta, y a la Biol. Lidia Baylón Pacheco por su ayuda en la realización de las inmunofluorescencias.

Referencias

- Schofield CJ, Dias JCP. Introduction and historical overview. En: Schofield CJ, Dujardin JP, Jurberg J, ed. Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatomos. México, D.F.: INDRE, 1996:11-16.
- Schumis GA. La tripanosomiasis americana como problema de salud pública. En: La enfermedad de Chagas y el sistema nervioso. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud (Publicación científica núm. 547), 1994:3-31.
- Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo, Ed. ISBT; 1992:1-3.
- Guzmán-Bracho C, García-García L, Florián-Verdugo J, Guerrero-Martínez S, Torres-Cosme M, Ramírez-Melgarejo et al. Riesgos de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre. Rev Panam Salud Pública 1998;4:590-601.
- Monteón-Padilla VM, Hernández-Becerril N, Guzmán-Bracho C, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA. American tripanosomiasis (Chagas disease) and blood banking in Mexico City: Seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. Arch Med Res 1999;30:393-398.
- Sosa-Jurado F, Zumaquero-Ríos JL, Reyes PA, Cruz-García A, Guzmán-Bracho C, Monteón VM. Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. Salud Publica Mex 2004;46:39-48.
- Schmunis AG, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk for transfusion-transmitted infectious disease in central and South America. Infect Dis 1998;4:5-11.
- Moncayo MA. Chagas' disease. Tropical Disease Research. A global partnership. Eight Programme Report. World Health Organization 1987:87-98.
- Tropical Disease Research. Twelfth programmer report of the UNDP/World bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease 1995.
- Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Pacheco-Souza JM, Carvalheiro JR, Yanovsky JF. Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Las Américas: evaluación de tres años de colaboración. Bol Oficina Sanit Panam 1987; 102:449-463.
- Secretaría de Salud. PROY-NOM-032-SSA2-2000. Para la vigilancia, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación, 21 Nov 2000. 2ª sección.
- Moncayo MA, Luquetti AO. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnosis reagent. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990;85:489-495.
- Guzmán-Bracho C. Producción y caracterización parcial de un péptido recombinante y su valor diagnóstico en la enfermedad de Chagas (tesis de maestría). México, D.F.: Sección de estudios de posgrado e investigación, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, 1996.
- pMAL protein fusion and purification system: Expression and purification of protein from cloned genes. New England Biolabs 2004.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad Sci USA 1979;76:4350-4354.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to dibenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:3116-3120.
- Ramos-Echevarría A, Monteón VM, Reyes PA. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. Salud Publica Mex 1993;35:56.
- Schmunis AG. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:93-101.
- Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends Parasitol 2001;17:372-376.
- Da Silveira JF, Setsu-Umezawa E, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol 2001;17:286-291.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, González A et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Microbiol 1999;37:1554-1560.
- Coura JR, Fernández O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996;90:278-279.
- Vissochi REM, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1998;59:750-756.
- Rangel-Flores H, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabé C, Brentère FS, Ramos C et al. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: Correlation with electrocardiographic alterations. Am J Trop Med Hyg 2001; 65:887-895.
- Kenney JS, Hughes BW, Masada MP, Allison AC. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. J Immunol Methods 1989;121:157-166.
- Lövgren-Bengtsson K. Preparation and use of adjuvants. En: Kaufmann SHE, Kabelitz D, ed. Methods in Microbiology: Immunology of infection. Nueva York: Academic Press, 1998;vol.:25.
- Schechter M, Nogueira N. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. Mol Biochem Parasitol 1988;29:37-46.
- Silva AMM, Brodskyn CI, Takehara HA, Mota I. Differences in the antigenic profiles of bloodstream and cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1989;31:146-150.
- Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. Infección natural de chinches *Triatominae* con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Publica Mex 2000;42:496-503.
- Dumontiel E. Update on Chagas disease in México. Salud Publica Mex 1999;41:322-327.
- Sánchez-Guillen MC, Bernabé C, Guégan JF, Tibayrenc M, Velásquez-Rojas M, Martínez-Munguía J et al. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non-endemic area of Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:947-952.