

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

RESPUESTA INMUNE HUMORAL A *Trypanosoma rangeli*  
EN UNA POBLACION ENDEMICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR  
AMANDA ELISA GALVEZ FIGUEROA

PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICA BIOLOGA

GUATEMALA, MAYO 1999

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD CC.QQ. Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS



## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS ASESORAS**

Licda. Vivian Matta y Licda. Margarita Paz por las oportunidades brindadas y la inmensa confianza que han puesto en mí.

Muy especialmente a Licda. María Paula De León por su amistad y la invaluable ayuda que me brindó en esta labor.

A Licda. María Eugenia Paredes por el gran apoyo a mi trabajo.

### **AL DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGIA**

## INDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	3
3.	ANTECEDENTES	4
	3.1 Generalidades	4
	3.2 Datos Históricos	5
	3.3 Taxonomía	6
	3.4 Distribución Geográfica	7
	3.5 Ciclo Evolutivo	7
	3.5.1 Hospedero Vertebrado	7
	3.5.2 Hospedero Invertebrado	7
	3.6. Vectores	8
	3.7 Reservorios del Parásito	9
	3.8 Relaciones Hospedero-Parásito	9
	3.8.1 Vertebrados	9
	3.8.2 Invertebrados	10
	3.9 Transmisión	11
	3.9.1 Vertebrados	11
	3.9.2 Invertebrados	11
	3.10. Diagnóstico	12
	3.10.1 Cultivo	12
	3.10.2 Morfología	13
	3.10.3 Diferenciación	14
	3.10.4 Respuesta Impune	15
	3.10.5 Métodos Serológicos	16

4.	JUSTIFICACIONES	18
5.	OBJETIVOS	19
6.	HIPOTESIS	20
7.	MATERIALES Y METODOS	21
	7.1 Universo de trabajo	21
	7.2 Recursos	21
	7.3 Métodos	24
	7.4 Diseño de la Investigación	28
8.	RESULTADOS	29
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	34
10.	CONCLUSIONES	37
11.	RECOMENDACIONES	38
12.	REFERENCIAS	39
13.	ANEXOS	45

## 1. RESUMEN

El estudio se llevó a cabo con 604 sueros provenientes de la seroteca del Departamento de Citohistología, de los cuales 544 pertenecen a habitantes de Santa María Ixhuatán, Santa Rosa, que fueron previamente analizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en un estudio realizado en 1995. Además se utilizaron 60 sueros de pacientes referidos de diferentes hospitales para la prueba de Chagas, los cuales fueron positivos a ella por dos métodos diferentes. El objetivo principal fue determinar la existencia de la respuesta inmune humana contra los antígenos de *Trypanosoma rangeli* y empezar a establecer patrones que demuestren el papel inmunológico de éste en una población guatemalteca.

Previo al inicio del análisis serológico de las 604 muestras se estandarizaron las técnicas inmunológicas de aglutinación de partículas de látex (RLAT) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ello se corrieron cuatro sueros control positivo para *T. rangeli* y 100 sueros positivos para *Trypanosoma cruzi* los cuales fueron de mucha ayuda para determinar tipos de aglutinación, intensidades de inmunofluorescencia, etc. Además se analizaron diferentes variables como: tipo de conjugado, concentración del mismo, tiempo de lavado, concentración de suero, cantidad de suero-muestra etc.

El reactivo de látex fue producido en el laboratorio con epimastigotes de *T. rangeli* tomando como base la metodología de este reactivo para *T. cruzi*. Se encontraron cambios esenciales como: concentración de parásito, tiempo de sensibilización y tiempo de lectura. Así también en la producción de láminas para inmunofluorescencia se determinó una concentración más baja de parásito, que la utilizada con *T. cruzi*, como la óptima en la fijación de dichas láminas.

Los resultados demuestran que el porcentaje de anticuerpos anti- *T. rangeli* en la muestra en estudio, es del 14.57 por ciento, encontrando un solo suero positivo en ambas pruebas utilizadas y negativo para *T. cruzi*.

De las dos pruebas serológicas utilizadas para el serodiagnóstico de las muestras, la inmunofluorescencia es la que tiene mayor poder discriminatorio, es decir que detecta con más especificidad los anticuerpos buscados en este estudio; mientras que la prueba de látex presenta resultados menos específicos.

Cinco sueros positivos para *T. rangeli* y negativos para *T. cruzi* fueron evaluados con inmunofluorescencia indirecta. De estos cinco sueros solamente uno resultó positivo exclusivamente para *T. rangeli*, mientras que tres lo fueron para ambos antígenos y el último lo fue solamente para *T. cruzi*.

Ochenta y dos (14 por ciento) sueros dieron resultados positivos para ambos antígenos, lo que puede sugerir la existencia de pruebas cruzadas ó una infección mixta; sin embargo únicamente el 5 por ciento de los sueros dio una reacción positiva para anticuerpos anti-*T. cruzi*, lo que podría indicar que los anticuerpos sí pueden ser detectados por separado y que este 14 por ciento indica que hay personas que han sido infectadas por ambos parásitos. A pesar de ello no se puede aseverar ninguna de estas probabilidades con los datos obtenidos en este estudio.

Con los resultados obtenidos se demuestra que el *T. rangeli* puede producir anticuerpos en el humano, debido a una infección previa por éste.



## 2. INTRODUCCION

La tripanosomiasis causada por *Trypanosoma rangeli* es una de las infecciones poco investigadas en toda América; una de las razones es que este parásito no ha demostrado ser patógeno al hombre y otra razón podría ser que no se encuentra en todos los países que han sido reportados como áreas endémicas de la enfermedad de Chagas.

La transmisión del parásito se da por medio de vectores que también transmiten *Trypanosoma cruzi*, por lo que es muy frecuente encontrar infecciones mixtas en un hospedero. Además se ha establecido una buena cantidad de antígenos que son comunes a *T. cruzi* y *T. rangeli*, lo que da como resultado reacciones cruzadas, poco específicas y por consiguiente un mal diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Guatemala posee zonas endémicas de la enfermedad de Chagas y tomando en cuenta que este tipo de tripanosomiasis es eminentemente americana y más aún latinoamericana, se hace necesario estandarizar los métodos serológicos que puedan ser más específicos en la determinación de la naturaleza de la infección, así como determinar los valores de corte que sean específicos para nuestra población.

El propósito de este estudio es la estandarización de los métodos serológicos de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación de partículas de látex para describir la respuesta inmune humoral que *T. rangeli* puede desencadenar en el humano. Se utilizarán sueros provenientes de un muestreo según censo realizado en los habitantes de 250 casas de Santa María Ixhuatán del Departamento de Santa Rosa, el cual demostró ser zona endémica para la enfermedad de Chagas por lo que se considera la presencia de *T. rangeli*.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Generalidades

##### 3.1.1 Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas, conocida también como tripanosomiasis americana, se contrae por infección con *T. cruzi* y está limitada a Centro y Sudamérica. Los focos de infección más importantes son México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Brasil, Argentina, Uruguay y Chile. La transmisión del agente causal tiene lugar por medio de la chinche picuda, como es conocida, que es un reduvido perteneciente a los géneros *Triatoma* y/o *Rhodnius* (1).

Se reconocen tres fases de esta enfermedad: la fase aguda, que se caracteriza por producir malestar general: fiebre, anorexia, postración etc. por lo que puede pasar inadvertida. Puede existir inflamación localizada a la que se denomina "chagoma" que comúnmente se localiza en el párpado. El parásito está circulante en la sangre durante esta fase, que dura de 4 a 8 semanas. La segunda fase es la indeterminada en la que el paciente no tiene molestias y el individuo es reservorio del parásito. La tercera fase es la crónica que se presenta entre 10 y 20 años después de haberse infectado y en la que hay lesiones importantes como cardiomiopatía crónica y visceromegalias. En esta fase el diagnóstico es más difícil debido a que el parásito se encuentra intracelularmente en los tejidos afectados (1,2,3).

El diagnóstico en cualquiera de las tres fases se realiza con pruebas serológicas que detectan anticuerpos anti- *T. cruzi* presentes en el paciente (1,2,3).

### 3.1.2 Santa María Ixhuatán

Es un municipio que pertenece al departamento de Santa Rosa, localizado al sur de la República de Guatemala. Su extensión territorial es de 113 Kms<sup>2</sup> con una temperatura entre 20 y 25 °C. Cuenta con 18,000 habitantes y la mayoría viven en casas construidas de adobe y bajareque sin repello de cal, el techo es de teja o lámina. Los habitantes acostumbran tener animales domésticos dentro de la casa. Estas condiciones propician un ambiente adecuado para que las chinches habiten y se reproduzcan con gran facilidad, lo que ha hecho que el parásito infecte a esta población en una cantidad importante, y por consiguiente hacer de Santa María Ixhuatán área endémica de la enfermedad de Chagas (3).

### 3.2 Datos Históricos

*T. rangeli* fue descubierto en Venezuela por Enrique Tejera en el año de 1,920 y posteriormente fue encontrado en Colombia por Rey Matiz y Guzmán. En ambas ocasiones las observaciones fueron en el intestino de *Rhodnius prolixus* (1).

Tejera describió las formas evolutivas del nuevo flagelado hasta la forma de tripanosoma metacíclico, sugirió que podía ser un parásito de vertebrados o insectos y lo denominó como *Crithidia=blastocrithidia* por el predominio de sus formas; sin embargo nunca observó formas en división (2,4).

En 1,935 un grupo de niños de corta edad de la población de Sanarate en Guatemala, mostró ser portador de un tripanosoma diferente de *T. cruzi* desde su punto de vista micrométrico y morfológico. Estos hallazgos estimularon la investigación de eventuales casos nuevos (2).

Después de muchos estudios en Guatemala por parte de los doctores José Romeo De León y Manuel Lisandro Montenegro, en 1,946 De León nombró al parásito *Trypanosoma guatemalensis*. Poco después Pifano y colaboradores en 1,948 demostraron que el *T. guatemalensis* era *T. rangeli*, nombre que mantuvo por ley de prioridad (4,5).

De León observó los primeros casos de tripanosomiasis humana producida por *T. rangeli* el cual llegó a categoría de tripanosoma al descubrirse su forma sanguínea en el vertebrado humano (4).

### 3.3 Taxonomía

Muchas han sido las clasificaciones que se le han dado a este parásito, sin embargo la última que se le ha asignado es la siguiente:

Subreino: *Protozoa*  
Filo: *Sarcomastigophora*  
Subfilo: *Mastigophora*  
Orden: *Kinetoplastida*  
Suborden: *Tripanosomatina*  
Familia: *Trypanosomatidae*  
Género: *Trypanosoma*  
Subgénero: *Tejeraia*  
Especie: *Trypanosoma rangeli* (6).

### 3.4 Distribución Geográfica

La distribución geográfica de este parásito cada día parece incrementarse. Los países con más frecuentes aislamientos son: Venezuela, Guatemala, Panamá, Colombia, El Salvador, Brasil en donde el hallazgo más reciente fue en la zona sur y Costa Rica en menor proporción (4,7).

### 3.5 Ciclo Evolutivo

#### 3.5.1 Hospedero Vertebrado

La fase infectiva de este parásito en el hospedero vertebrado es el tripomastigote metacíclico, el cual después de ser inoculado pasa rápidamente al torrente sanguíneo. En las siguientes 72 horas y a medida que la infección progresa, sufre un continuo crecimiento. Los niveles de parasitemia son muy bajos, usualmente de 5-7 tripanosomas o menos en cada 5 mm<sup>3</sup> de sangre; no se ha demostrado la división en el hospedero vertebrado.

Se han hecho muchas investigaciones buscando fases evolutivas en tejidos de hospederos vertebrados, pero ninguna ha tenido éxito (1,4,8,9).

#### 3.5.2 Hospedero Invertebrado

En el invertebrado, el ciclo ocurre en el canal alimentario y se producen metatripanosomas en el intestino.

Las formas ingeridas de *T. rangeli* penetran la pared intestinal e invaden la hemolinfa, en donde se multiplican extracelularmente, produciendo epimastigotes y tripomastigotes. Después de la invasión de la hemolinfa, las glándulas salivales son

penetradas por los flagelados, lo cual se puede observar de 3-5 días después de la invasión de la hemolinfa.

Ya establecidos, se transforman una vez más los tripomastigotes metacíclicos, que constituyen las formas infectivas para el hospedero vertebrado (1,8,9) (Anexo No.1).

### 3.6 Vectores

Sus vectores son las chinches triatominas, que son grandes insectos hematófagos. Los adultos son largos (2-3 cm), capaces de succionar cantidades importantes de sangre y pueden contribuir a una anemia crónica. Se conocen más de 100 especies de triatominos en el Nuevo Mundo (10).

El principal género involucrado en la infección con *T. rangeli* es *Rhodnius*, aunque también otras especies pueden ser vectores. En Colombia se ha encontrado que *Rhodnius robustus* y *R. pallescens*, así como *Triatoma dimidiata* pueden infectarse con *T. rangeli* (4,10).

En Guatemala *T. rangeli* ha sido reportado en *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata* y *T. nitida*. Estos vectores son encontrados en mayor proporción en los departamentos de Zacapa, Jalapa, El Progreso y Chiquimula, ya que prefieren altitudes de más de 300 metros (1-5,8-10).

Se pueden encontrar infecciones mixtas en estos vectores, es decir, encontrar tanto *T. rangeli* como *T. cruzi* lo que hace más difícil muchas veces el estudio de *T. rangeli*.

Experimentalmente *Rhodnius neglectus*, *Triatoma proctata*, *Triatoma patagonica* y *Triatoma infestans* han podido ser infectados con este parásito; así también *Rhodnius neivai*, en el cual se comprobó su capacidad de infección por medio de glándulas salivales.

### 3.7 Reservorios del Parásito

Cuando empezaron los estudios acerca de *T. rangeli* no se pudo demostrar que en la naturaleza hubiesen reservorios del parásito. Sin embargo actualmente es bien sabido que muchos mamíferos pueden desempeñar este papel. Entre los más comunes en Guatemala están la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*), gatos de monte, ratas y ratones (10).

Entre los animales domésticos que conviven con las familias se puede encontrar el parásito, principalmente en perros y gatos, según reportes de otros países como Brasil, Chile y Venezuela (2,4,8,10).

En Brasil el más reciente hallazgo fue en *Echimys dasytrix* un roedor que se encuentra principalmente al sur de este país (7).

En Bolivia y en Brasil se ha reportado el hallazgo de *T. rangeli* en los monos-ardilla *Saimiri sciureus*, *Saguinus mistax*, *S. boliviensis* y *Cebus apella* (7,14).

### 3.8 Relaciones hospedero-parásito

#### 3.8.1 Vertebrados

La característica más notable de *T. rangeli* en los vertebrados es el amplio rango de especies en las que se puede encontrar y su aparente baja patogenicidad. La infección es de limitada duración (22-108 días), aunque en algunos animales puede estar de 18 meses hasta 3 años (4,15).

Muchos autores lo consideran no patógeno para el hospedero vertebrado, aunque se ha encontrado que puede ser responsable de algún malestar y de dolores musculares (10-12).

Se ha considerado la posibilidad que *T. rangeli* pueda producir manifestaciones patológicas, indistinguibles de las causadas por *T. cruzi*. Las infecciones experimentales en mamíferos sugieren que *T. rangeli* puede persistir como una infección oculta, caracterizada por bajas parasitemias (15).

En 1,959 se reportó en Guatemala que de 3 pacientes infectados con *T. rangeli*, uno presentó en el electrocardiograma, signos de isquemia subendocárdica (5).

### 3.8.2 Invertebrados

*T. rangeli* es patogénico para los vectores triatominos. La patogenicidad para el vector *R. prolixus* ha sido reportada en la naturaleza (11,16).

Watkins reportó la reducción severa del proceso de excreción en *R. prolixus* infectados con *T. rangeli*. También propuso que el parásito posee una enzima para remover alguna sustancia que produciría cambios en la permeabilidad, ocasionando un incremento en el volumen de hemolinfa observada en los insectos infectados (16).

Cuando la hemolinfa está muy aumentada, se observa la siguiente patología : (a) desaparición del pigmento rojo de la epidermis, (b) agrandamiento del recto e intestino, reduciendo o anulando las contracciones musculares de la pared abdominal, (c) reducción en el diámetro del vector y (d) no hay muda (5).



Se piensa que esta patogenicidad puede ser consecuencia de varios mecanismos: (a) daño en los tejidos, (b) reducción en la hormona diurética debido a inhibidores químicos producidos por *T. rangeli* y (c) cambios en la presión osmótica en la hemolinfa (4,16).

### 3.9 Transmisión

#### 3.9.1 Vertebrados

La principal vía de contaminación por *T. rangeli* es la inoculación de la fase infectiva del parásito en los vertebrados mediante la descarga de saliva del vector mientras éste se está alimentando, ya que descarga a los tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en sus glándulas salivales (1,4).

La transmisión fecal ha sido observada en recientes cepas aisladas, pero su importancia bajo condiciones naturales es indeterminada (12).

*T. rangeli* presenta algunas características en especies que no transmiten el parásito por vía fecal: (a) una pobre colonización rectal, (b) ausencia de verdaderos tripomastigotes en las heces, (c) ausencia de flagelados en la orina del insecto infectado, (d) un alto y significativo porcentaje de epimastigotes en el hemocele (4).

#### 3.9.2 Invertebrados

Existe una transmisión directa entre vectores, por medio de canibalismo, al comerse unos a otros (4).

La principal es cuando una chinche libre de parásitos pica a un vertebrado portador de *T.rangeli* y succiona la sangre con el flagelado, comenzando su ciclo en el intestino del vector y completando su ciclo vital para ser nuevamente inoculado en cualquier otro vertebrado (4,10).

En el laboratorio se puede provocar la transmisión de *T.rangeli* en chinches, a través de una membrana con una suspensión del cultivo (4).

### 3.10 Diagnóstico

#### 3.10.1 Cultivo

Los cultivos pueden realizarse a partir de sangre completa de humano o de otro vertebrado, así también como de las glándulas salivales o hemolinfa de los triatomíneos (9).

En Guatemala se inició el cultivo de este parásito en el medio NNN (Nicolle-Novy-McNeal), que es un medio semi-líquido, en donde pueden obtenerse buenos resultados, que a la fecha es utilizado y recomendado por varios autores (2,4,7,17,18).

También es utilizado el medio LIT (Liver Infusion Tryptose), que posee una alta proporción de sangre completa o suero usualmente de bovino o humano; *T. rangeli* posee más requerimientos nutricionales que *T. cruzi* (7,19).

Los cultivos son mantenidos a temperaturas entre 26-28 °C y los subcultivos que se quieran obtener se pueden ejecutar a intervalos de 2 a 4 semanas. Los parásitos crecen en medios líquidos o en la fase sólida de los medios difásicos, formando colonias de 1.5 mm de diámetro, convexas, brillantes y transparentes (4).

### 3.10.2 Morfología

Desde su descubrimiento se ha podido establecer una identificación a través de su morfología (1,2).

Aunque es diferente a *T. cruzi*, es muy parecido a otros miembros del género *Herpetosoma*. *T. rangeli* es largo y delgado, con un mejor desarrollo de membrana la que presenta aproximadamente cinco vueltas o repliegues, flagelo largo, núcleo situado en la región submediana próximo a la extremidad anterior, de forma ovalada y posee un kinetoplasto más pequeño que otros flagelados de su género (2,15,16). Los epimastigotes miden de 28 a 67  $\mu\text{m}$  de largo mientras que los tripomastigotes de 23 a 49  $\mu\text{m}$  (4,9) (Anexo No. 2).

Grewal en 1,969 y Añez en 1,981 reportaron ciertos cambios progresivos en la morfología del parásito en infecciones experimentales. Se han sugerido varias hipótesis acerca de esto, la primera considera que el pleomorfismo de esta especie se debe al resultado de una respuesta inmune agresiva del hospedero; sin embargo esto ha sido rechazado debido a que también se han encontrado estas formas en hospederos inmunológicamente deficientes (18).

Por otro lado, la segunda hipótesis considera que son cambios fenotípicos naturales del parásito a las condiciones ambientales, estos cambios incluyen : vacuolización, que ha sido relacionada con la poca virulencia hacia el hospedero mamífero, y represión mitocondrial que influye en los cambios de energía en el metabolismo (19).

Se han realizado estudios con microscopio electrónico para determinar la ultraestructura de este parásito. Analizando cada organelo del parásito se determinó por ejemplo que la membrana citoplasmática presenta tres capas: interna, externa e intermedia.

El núcleo es oval o redondo y está localizado en el tercio medio del cuerpo, el kinetoplasto está localizado en las vecindades del núcleo y tiene forma de una barra densa, corta, generalmente de aspecto fibrilar, constituida por ADN. El corpúsculo basal se encuentra en la parte cóncava del kinetonúcleo y tiene una forma cilíndrica, las vacuolas están presentes en número variable, se distribuyen irregularmente en todo el citoplasma y algunas poseen un material finamente granuloso y denso. La morfología y el tamaño del kinetonúcleo llaman la atención, ya que éste es de reducidas dimensiones a diferencia de como se observa en otros tripanosomas (18).

### 3.10.3 Diferenciación

Se ha utilizado todo tipo de métodos serológicos para el diagnóstico de la tripanosomiasis existente en cualquier hospedero. Algunos de ellos presentan reacciones cruzadas, debido a la presencia de antígenos parecidos e iguales en ambas especies, refiriéndonos a *T. cruzi* y *T. rangeli* (20-23).

Por esta razón se han desarrollado nuevos métodos que permiten determinar cuáles son específicos para cada una. Las pruebas más utilizadas para la determinación e identificación de antígenos en cada especie han sido Western blot, patrones isoenzimáticos y unión de lecitina. La neuraminidasa ha sido una proteína distintiva entre las dos especies, siendo secretada en mayor cantidad en cultivos de tripomastigotes de *T. rangeli*. Esta enzima puede ser detectada por medio de un ensayo fluorométrico y mediante pruebas de hemaglutinación (9).

Por medio de Western blot se ha podido determinar que ratones inmunizados con *T. cruzi* son capaces de reconocer después de algunas semanas, antígenos de *T. rangeli* que poseen alto y bajo peso molecular. Se ha informado que *T. cruzi* y *T. rangeli* comparten

El núcleo es oval o redondo y está localizado en el tercio medio del cuerpo, el kinetoplasto está localizado en las vecindades del núcleo y tiene forma de una barra densa, corta, generalmente de aspecto fibrilar, constituida por ADN. El corpúsculo basal se encuentra en la parte cóncava del kinetonúcleo y tiene una forma cilíndrica, las vacuolas están presentes en número variable, se distribuyen irregularmente en todo el citoplasma y algunas poseen un material finamente granuloso y denso. La morfología y el tamaño del kinetonúcleo llaman la atención, ya que éste es de reducidas dimensiones a diferencia de como se observa en otros tripanosomas (18).

### 3.10.3 Diferenciación

Se ha utilizado todo tipo de métodos serológicos para el diagnóstico de la tripanosomiasis existente en cualquier hospedero. Algunos de ellos presentan reacciones cruzadas, debido a la presencia de antígenos parecidos e iguales en ambas especies, refiriéndonos a *T. cruzi* y *T. rangeli* (20-23).

Por esta razón se han desarrollado nuevos métodos que permiten determinar cuáles son específicos para cada una. Las pruebas más utilizadas para la determinación e identificación de antígenos en cada especie han sido Western blot, patrones isoenzimáticos y unión de lecitina. La neuraminidasa ha sido una proteína distintiva entre las dos especies, siendo secretada en mayor cantidad en cultivos de tripomastigotes de *T. rangeli*. Esta enzima puede ser detectada por medio de un ensayo fluorométrico y mediante pruebas de hemaglutinación (9).

Por medio de Western blot se ha podido determinar que ratones inmunizados con *T. cruzi* son capaces de reconocer después de algunas semanas, antígenos de *T. rangeli* que poseen alto y bajo peso molecular. Se ha informado que *T. cruzi* y *T. rangeli* comparten

aproximadamente el 60 por ciento de los antígenos estudiados. Sin embargo aunque todos los estudios demuestran que pueden haber pruebas cruzadas debido a la existencia de antígenos comunes, también se explica la diferente respuesta que puedan demostrar los pacientes (20,21,24).

La identificación de epítomos específicos puede ser facilitada por medio de la producción de anticuerpos monoclonales. Sin embargo en infecciones mixtas se hace todavía más difícil establecer un patrón, por lo que las técnicas de biología molecular pueden ser aún más útiles. La digestión total del ADN con enzimas de restricción es una prueba confiable para la diferenciación (21,25,26).

La electroforesis en gel y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también han sido utilizadas para este fin (24,27).

#### 3.10.4 Respuesta Inmune

La capacidad de *T. rangeli* para producir una respuesta inmune ha sido analizada y se ha estudiado el curso de la infección en animales de laboratorio. Se ha sugerido que la infección primaria con este parásito puede tener relevancia para la protección contra *T. cruzi*. Los estudios realizados por Basso *et al* (28) sugieren que *T. rangeli* puede inducir una respuesta inmune humoral y celular contra *T. cruzi*, lo que puede ayudar a la protección o al incremento de la resistencia contra la enfermedad de Chagas causada por este último (21,26). Esta respuesta es más débil que la respuesta demostrada contra *T. cruzi*; se ha demostrado en ratones repetidamente infectados que los títulos de anticuerpos más altos, detectados por medio de hemaglutinación indirecta, son de 1:8 (9).

### 3.10.5.2 Prueba de aglutinación de partículas de látex

La muestra se pone en contacto con un reactivo de látex sensibilizado con antígenos citoplasmáticos y de membrana del *T. rangeli*, en presencia (o no) de un líquido de contraste.

Si la muestra contiene anticuerpos anti *T. rangeli*, estos reaccionarán en forma sensible y específica, produciéndose una aglutinación visible macroscópicamente (33).

#### 4. JUSTIFICACIONES

En Guatemala hay muy poca información acerca del aspecto clínico y patogénico de *Trypanosoma rangeli*, lo que conduce, entre otras cosas, a diagnósticos serológicos poco específicos para la enfermedad de Chagas ya que se han demostrado reacciones cruzadas con *Trypanosoma cruzi*. Al describir la respuesta inmune humoral que pueda provocar *T. rangeli* se podrían caracterizar mejor los antígenos involucrados en ella, y por consiguiente disminuir esas reacciones cruzadas. Así también puede obtenerse conocimiento sobre la patogenia que este parásito pueda producir.

La Organización Mundial de la Salud considera indispensable que cada país estandarice sus reactivos, defina su propio punto de corte y se usen como mínimo dos pruebas serológicas diferentes a fin de confirmar una infección. En Guatemala esto es importante, no solo por ser un país endémico de la enfermedad de Chagas sino por ser uno de los pocos en donde se encuentra *T. rangeli*.

Por lo tanto, además de realizar la estandarización de dos métodos serológicos para la determinación de la respuesta inmune humoral a *T. rangeli*, se comenzará a determinar su posible papel patológico en una población endémica de la enfermedad de Chagas.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

5.1.1 Determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. rangeli* en sueros de la población de Santa María Ixhuatán.

### 5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Estandarizar las pruebas inmunológicas de Inmunofluorescencia indirecta y aglutinación de partículas de látex para la detección de anticuerpos anti-*T. rangeli*.

5.2.2 Establecer los valores de corte para el método de Inmunofluorescencia indirecta.

## 6. HIPOTESIS

Los sueros provenientes de Santa María Ixhuatán poseen anticuerpos anti-*Trypanosoma rangeli*.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Universo de Trabajo:

544 muestras de suero provenientes de habitantes de 250 casas de Santa María Ixhuatán del Departamento de Santa Rosa. Estas muestras fueron incluidas en un estudio para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, realizado en 1995, por medio de los métodos serológicos de prueba rápida de aglutinación en látex (RLAT), hemaglutinación indirecta (HAI) y aglutinación de partículas de gelatina. Los resultados de dicho estudio se citan en anexo 3. Además se incluyeron 60 sueros positivos para serología de *T. cruzi* de la seroteca del Departamento de Citohistología, seleccionados por conveniencia para la estandarización de las pruebas y cuatro sueros control positivo para *T. rangeli* los cuales pertenecían a un paciente del que se aisló la cepa denominada EAM y a conejos sensibilizados.

### 7.2 Recursos:

#### 7.2.1 Recursos humanos:

- Estudiante de Química Biológica: Amanda Elisa Gálvez Figueroa.
- Asesoras: Licda. Vivian Matta Ríos y Licda. Margarita Paz de Ramírez.
- Licda. María Paula De León

#### 7.2.2 Recursos físicos:

##### Recursos Institucionales:

- Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

-Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

-Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.

-Biblioteca del Departamento de Entomología de la Universidad del Valle de Guatemala.

-Biblioteca del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

### 7.2.3 Material y Equipo

#### 7.2.3.1 Equipo

- Microscopio de fluorescencia
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Microscopio de luz
- Baño sonicador
- Refrigerador
- Incubadora
- Autoclave
- Agitador automático
- Pipetas automáticas
- Tubos Eppendorf
- Gradillas para tubos de ensayo
- Guantes descartables
- Botellas para cultivo
- Jeringas 1 ml
- Magnetos

- Espátulas
- Recipientes para pesado

-Papel filtro

-Papel aluminio

-Bata de manga larga

#### 7.2.3.2 Reactivos

-Medio de cultivo LIT

-Medio de cultivo MEM

-Medio de cultivo HM

-Solución de Buffer de fosfatos (PBS)

-Glicerina Bufferada

-Isotiocianato de Fluoresceína

-Partículas de Látex

-Azida de sodio

-2-Amino,2-Metil,1-Propanol

#### 7.2.3.3 Material de Vidrio

-Pipetas Pasteur con punta de aguja

-Pipetas seológicas

-Portaobjetos de 25x75 mm

-Cubreobjetos

-Cámara húmeda

-Láminas con pozos para IFI

-Cubetas para espectrofotómetro de 10x45 mm

-Tubos de ensayo

-Capilares con heparina

-Beakers 100, 200 y 1,000 ml

### 7.3 Métodos

7.3.1 Preparación del antígeno de *T. rangeli* para la reacción de Inmunofluorescencia.

7.3.1.1 Se obtuvieron epimastigotes de *T. rangeli* del medio LIT al 20 por ciento de suero bovino fetal, de aproximadamente 8 días de incubación a 25-28°C .

7.3.1.2 Se centrifugaron a 3,000 rpm .

7.3.1.3 Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en PBS 0.01M con pH 7.2, nuevamente se centrifugó a 3,000 rpm. Este procedimiento se repitió 3 veces.

7.3.1.4 El sedimento se suspendió en PBS-formalina 2 por ciento. La concentración de parásitos correspondió a 20-30 epimastigotes por campo en una alícuota de 10 µl de solución preparada.

7.3.1.5 Después de evaluar esto se dejó en suspensión a temperatura ambiente por 24 horas.

7.3.1.6 Se centrifugó a 3,000 rpm. Descartando el sobrenadante y lavando el sedimento una vez con PBS.

7.3.1.7 Se agregó al sedimento la mitad del volumen de PBS anotado en el paso 7.3.1.4

7.3.1.8 La solución obtenida se evaluó una vez más agitando bien y observando al microscopio con aumento de 400X la cantidad de parásitos por campo . Número ideal 20-30 parásitos por campo.

7.3.1.9 Se homogenizó bien y con una pipeta pasteur con punta de aguja se colocó el antígeno a las láminas.

### 7.3.2 Reacción de Inmunofluorescencia

7.3.2.1 No se preparó ninguna dilución de sueros

7.3.2.2 Se agregaron 10  $\mu$ l de cada suero en cada uno de los pozos, incluyendo el control positivo y el control negativo.

7.3.2.3 Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos .

7.3.2.4 Se lavaron las láminas 3 veces con PBS cada 10 minutos .

7.3.2.5 Posteriormente se dejaron secar las láminas.

7.3.2.6 Se agregaron a cada pozo 10  $\mu$ l de conjugado anti-IgG-FITC, a la dilución 1:32

7.3.2.7 Se incubó una vez más en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.

7.3.2.8 Se realizó la última lavada 3 veces con PBS cada 10 minutos.

7.3.2.9 Se dejaron secar las láminas.

7.3.2.10 Se montaron las láminas con glicerina amortiguada y se prosiguió a leer la fluorescencia.

7.3.2.11 La prueba se considera positiva si se observa fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se midió subjetivamente mediante cruces en base a un control positivo y uno negativo. La ausencia de fluorescencia se tomó como un resultado negativo.

### 7.3.3 Estandarización de la prueba de Inmunofluorescencia

7.3.3.1 Se corrieron 12 sueros positivos para *T. cruzi* y 2 sueros positivos para *T. rangeli* excluyendo los de conejo. Así como 2 sueros control negativo para ambos. Estos sueros se analizaron en láminas con antígeno de *T. rangeli* y en láminas con antígeno de *T. cruzi*.

7.3.3.2 Los conjugados probados fueron de dos casas comerciales: SIGMA y CAPPEL en dos diluciones 1:32 y 1:64.

7.3.3.3 Los sueros se trabajaron en diluciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8

7.3.3.4 El conjugado de la casa comercial CAPPEL requirió un tiempo más prolongado de lavado.

### 7.3.4 Sensibilización de partículas de látex para la prueba rápida de aglutinación (RLAT).

7.3.4.1 Se obtuvieron epimastigotes en AMP 0.2M pH 8.0 a diferentes concentraciones, a partir de  $1 \times 10^5$  epimastigotes por ml.

7.3.4.2 Para obtener antígenos solubles se sonicó en baño sonicador y se centrifugó 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para sensibilizar las partículas de látex.

7.3.4.3 Posteriormente se lavaron las partículas de látex en AMP. El lavado se efectuó 3 veces.

7.3.4.4 Se agregaron las partículas de látex junto con el antígeno preparado en una relación 1:1 y posteriormente se sensibilizaron las partículas de látex a 37°C .

7.3.4.5 Se lavaron con AMP dos veces.

7.3.4.6 Después de la segunda lavada, se eliminó el sobrenadante y se añadió AMP + azida de sodio.



### 7.3.5 Prueba rápida de aglutinación de partículas de látex

7.3.5.1 Se mezclaron 3  $\mu$ l de reactivo con 3  $\mu$ l de suero y de los controles positivo y negativo.

7.3.5.2 Se homogenizó .

7.3.5.3 Se mezcló por rotación.

7.3.5.4 Se agitó la lámina hasta que secó la mezcla.

7.3.5.5 Se evaluó a simple vista, sin magnificación. Si había aglutinación la prueba se consideró positiva .

### 7.3.6 Estandarización de la prueba

7.3.6.1 Se determinó la concentración óptima de parásitos para la realización del reactivo de látex, por medio de cuatro sueros control positivo para *T. rangeli*, dos sueros control negativo y 100 sueros control positivo para *T. cruzi* con los que se pudo determinar el tipo de aglutinación esperada.

7.3.6.2 Se evaluaron diferentes cantidades de reactivo-suero aunque la relación siempre fue de 1:1. Las cantidades probadas fueron 3, 5 y 10  $\mu$ l.

7.3.6.3 La técnica determinó como tiempo óptimo de agitación 3 minutos exactos, luego de este tiempo las placas dejaban de rotarse y se dejaban secar en una superficie plana.

#### 7.4 Diseño de Muestra

Para el estudio se utilizó un muestreo no probabilístico. Se procesaron 604 muestras, 544 provenientes de habitantes de 250 casas seleccionadas de Santa María Ixhuatán del Departamento de Santa Rosa, área que fue elegida por ser endémica y 60 sueros positivos para *T. cruzi*, todos seleccionados por conveniencia de la seroteca del Departamento de Citohistología .

El análisis de datos se realizó por medio de porcentajes e intervalo de confianza al 95%. Para determinar la existencia de discriminancia de resultados en la prueba de Inmunofluorescencia indirecta se utilizaron los sueros control.

## 8. RESULTADOS

El estudio tuvo dos etapas: la estandarización de los métodos (RLAT e IFI) y el análisis de los sueros. En la primera se obtuvieron 36 cosechas de epimastigotes de *T.rangeli* utilizando una para la preparación de solución formalina-PBS, que posteriormente se utilizó en la fijación de láminas y tres para la producción de reactivo de látex.

En lo referente a la prueba de látex se determinó que 3  $\mu$ l del suero y del reactivo son suficientes para obtener una buena reacción y que el tiempo de agitación debe ser de 3 minutos. El reactivo producido produjo una aglutinación macroscópica visible, cuya lectura puede realizarse sin magnificación y a simple vista.

En relación a la inmunofluorescencia se encontró que el conjugado SIGMA a una dilución 1:32 fue el que dio un mejor resultado ya que la fluorescencia observada fue fuerte y permitió diferenciar un negativo de un positivo con claridad. Los tiempos de lavado fueron determinados en 10 minutos cada uno y los sueros fueron analizados sin dilución alguna.

En la segunda etapa se utilizaron 544 sueros procedentes del municipio de Santa María Ixhuatán, los cuales fueron analizados para la enfermedad de Chagas en 1995 y 60 sueros positivos para *T. cruzi*, analizados con por lo menos dos métodos diferentes. Dichos sueros fueron seleccionados por conveniencia de la seroteca del Departamento de Citohistología.

Con respecto a los sueros control positivo para *T. rangeli*, dos de ellos fueron suero de conejo sensibilizado y dos pertenecen al paciente del que se aisló la cepa trabajada. Estos fueron analizados por medio de inmunodifusión doble, aglutinación de partículas de gelatina, aglutinación de partículas de látex e inmunofluorescencia para *T. cruzi* obteniendo resultados negativos, por lo que se utilizaron para el presente estudio.

El primer parámetro comparado fue la reacción de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con *T. rangeli* para lo cual se procesaron las muestras siguiendo el procedimiento indicado, obteniendo los resultados que se detallan en la Tabla 1.

TABLA No. 1 RESULTADOS DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE LATEX DE LOS SUEROS EN ESTUDIO.

Total	<i>Trypanosoma rangeli</i> Dilución 1:1		<i>Trypanosoma cruzi</i> Dilución 1:1	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
604	88	516	123	481
100%	14.57%	85.43%	20.36%	79.64%

Se presentan también los resultados obtenidos previamente con el reactivo para *T. cruzi* en 1995 para tener una mejor comparación de resultados. Se debe tomar en cuenta que 60 de los sueros fueron seleccionados por conveniencia precisamente por ser positivos a *T. cruzi*, lo que aumenta los resultados positivos en el lado derecho de la tabla.

Posteriormente se compararon las positividades obtenidas en cada suero con los reactivos de látex para ambas especies, los datos obtenidos se detallan en la Tabla 2.

TABLA No. 2 COMPARACION DE POSITIVIDAD OBTENIDA PARA LAS ESPECIES *T. cruzi* Y *T. rangeli* CON LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN DE PARTICULAS DE LATEX.

RLAT <i>T. rangeli</i> / RLAT <i>T. cruzi</i>	Positivos		Negativos	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
Positivos	83	13.74%	40	6.62%
Negativos	5	0.83%	476	78.80%

Estos resultados demuestran que en la población estudiada un 13.74 por ciento (83/604) fue positivo para ambas especies y un 78.80 por ciento (476/600) fue negativo. Así también que el 40 por ciento fue positivo únicamente para *T. cruzi* y 0.83 por ciento para *T. rangeli*.

De los 604 sueros, 5 fueron positivos para *T. rangeli* y negativos para *T. cruzi* por medio de la aglutinación de partículas de látex. Estos sueros se analizaron con inmunofluorescencia indirecta, con el fin de confirmar dichos resultados, obteniéndose un solo suero positivo (Tabla 3).

TABLA No. 3 POSITIVIDAD A *T. rangeli* POR DOS METODOLOGIAS

IFI <i>T. rangeli</i> \ RLAT <i>T. rangeli</i>	Positivos	
	Total	Porcentaje
Positivos	1	20%
Negativos	4	80%

Con la tabla anterior podemos confirmar la existencia de anticuerpos únicamente para *T. rangeli* en al menos un suero humano de los analizados, lo que representa un rango del 0.13-0.21 por ciento de toda la muestra con un nivel de confianza del 95 por ciento.

Los resultados de la inmunofluorescencia se reportan en la Tabla 4 , en la que se comparan resultados obtenidos con antígeno de *T. cruzi* el cual fue utilizado para detectar posibles falsos positivos en la reacción de aglutinación de partículas de látex.

Como se puede observar 3 de ellos (60 por ciento) son positivos para ambos antígenos lo que nos lleva a considerar la posibilidad de falsos negativos en la prueba de látex para *T. cruzi*, mientras que el único suero que fue positivo únicamente para *T. cruzi* demuestra claramente que en este caso sí hubo un resultado falso negativo para dicha prueba.

TABLA No. 4 POSITIVIDAD POR MEDIO DE LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

<i>T. rangeli</i>	Positivos		Negativos	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
<i>T. cruzi</i>				
Positivos	3	60%	1	20%
Negativos	1	20%	0	0%

Por fines estadísticos la anterior tabla se interpreta por medio del número de veces que los sueros fueron corridos, es decir por duplicado ya que se utilizaron dos láminas de antígenos. Esto nos ayuda a aplicar la F exacta de Fisher que es igual a 0.18 lo que nos indica que no hay relación entre resultados y por lo tanto la inmunofluorescencia es un método discriminatorio.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Este estudio se llevó a cabo con bases ya establecidas para *T. cruzi*; sin embargo hubo que estandarizar procedimientos para los dos métodos serológicos. El primer aspecto a determinar fue el cultivo del parásito que demandó condiciones nutricionales estrictas, teniéndose que preparar dos tipos de medio, uno de ellos fue LIT con un 20 por ciento adicional de suero bovino fetal y el otro LIT y MEM en proporción 1:1. El medio que dio mejor resultado fue el LIT al 20 por ciento ya que en el otro predominaron formas parecidas a amastigotes que no progresaron.

A partir de este cultivo se pudo producir reactivo de látex. El lavado de partículas fue satisfactorio ya que se utilizó un diámetro apropiado con lo cual no se tuvo problema. La sensibilización de dichas partículas se llevó a cabo con una concentración de  $10^5$  epimastigotes de *T. rangeli* lo cual es una cantidad menor a la establecida ( $10^6$ ) ya que este parásito es de mayor tamaño que *T. cruzi* y el estadio en el que se trabajó lo es aún más. Utilizando concentraciones menores a  $10^5$  no se obtuvieron buenos resultados ya que no se conseguía una buena aglutinación. Igualmente trabajando con mayores concentraciones la aglutinación fue demasiado sensible, disminuyendo la especificidad del método.

Para determinar la proporción óptima a la que debían correrse las muestras se trabajó con los controles positivos y negativos. En toda prueba la relación fue de 1:1 utilizando 3, 5 y 10  $\mu$ l, siendo la de 3  $\mu$ l la de mejor resultado ya que 5 y 10  $\mu$ l representaban mayor cantidad de reactivo a preparar y por consiguiente condiciones de preparación más difíciles de controlar (tiempos de sensibilización, cantidad de partículas a lavar etc.). Además de ello no se contaba con una buena cantidad de suero de todas las muestras a analizar. El tipo de aglutinación esperado en un resultado positivo fue determinado después de evaluar los cuatro sueros control positivo, siendo una aglutinación muy evidente sin necesidad de magnificación.



Así mismo se corrieron los 100 sueros positivos para *T. cruzi* con los que se comparó el tipo de aglutinación debido a las posibles reacciones cruzadas. El tiempo de reacción fue igualmente determinado en base a que los mejores resultados de los controles se obtuvieron a los 3 minutos de agitación.

La estandarización de inmunofluorescencia indirecta se logró realizar con sueros control y análisis de láminas con antígeno de ambas especies. Para la fijación de láminas se necesitó de una concentración menor de parásitos que *T. cruzi* en PBS-formalina ya que por ser un parásito de tamaño considerable no se lograba una distribución homogénea .

De los conjugados utilizados, SIGMA fue el que mejor resultados dio a una dilución 1:32 ya que 1:64 no emitió fluorescencia satisfactoria. El conjugado de la casa comercial CAPPEL no se utilizó en el análisis de muestras ya que presentó el problema de fluorescencia inespecífica causada por una película sobre la lámina muy difícil de remover por medio de los lavados, que se prolongaron 3, 5 y 7 minutos más del tiempo establecido para intentar removerla. Con esto los resultados no fueron confiables ya que no se consiguió una preparación homogénea. En esta prueba se excluyeron dos de los sueros control utilizados en aglutinación de partículas de látex debido a que su origen era conejo, lo que requería conjugado anti-conejo con el cual no se contaba.

En lo referente al análisis de sueros se realizó comparación en todo momento con *T. cruzi* para tener un mejor enfoque de los resultados obtenidos. En el caso de aglutinación de partículas de látex ya se contaba con estudios previos, mientras que para inmunofluorescencia hubo que fijar láminas para dicho fin. Los resultados obtenidos de la aglutinación de partículas de látex (Tabla No.1) demuestran un menor porcentaje de positividad para *T. rangeli* 14.6 por ciento (88/604) vs. 20.4 por ciento (123/604) para *T. cruzi*.

Esto probablemente es debido a que *T. rangeli* induzca a la producción de títulos bajos de anticuerpos.

Comparando la positividad obtenida para ambas especies se logró detectar anticuerpos por separado, aunque el 13.7 por ciento (83/604) sigue reflejando resultados positivos para ambos lo que en este caso nos puede dar la idea de que pertenezcan a individuos infectados por ambos parásitos, es decir una infección mixta (Tabla 2).

Los cinco sueros positivos exclusivamente para *T. rangeli* por medio de aglutinación de partículas de látex fueron corridos por inmunofluorescencia indirecta encontrando un suero positivo mientras que los cuatro restantes lo fueron para *T. cruzi*. Estos resultados pueden deberse a una reacción falsa negativa para *T. cruzi* por el método de aglutinación de partículas de látex aunque esto no pueda determinarse debido a que no se cuenta con una prueba standard para *T. rangeli* con la cual comparar los resultados de este estudio, es decir que no se puede establecer la especificidad de los métodos utilizados. El único aspecto que se puede determinar es que la prueba de inmunofluorescencia indirecta tiene mejor capacidad discriminatoria siendo la más apropiada para la detección de anticuerpos anti-*T. rangeli*.

## 10. CONCLUSIONES

1. *Trypanosoma rangeli* puede infectar al humano y producir anticuerpos detectables en el laboratorio.
2. La prueba de inmunofluorescencia indirecta es discriminatoria, siendo más recomendable que la aglutinación de partículas de látex para la detección de anticuerpos anti-*T.rangeli*.
3. El porcentaje de anticuerpos exclusivos para *Trypanosoma rangeli* encontrado en las muestras que conformaron este estudio fue entre el 0.13 y 0.21 por ciento
4. Se comprobó la presencia de anticuerpos anti-*T. rangeli* en sueros de la población de Santa María Ixhuatán, encontrándose un 14.57 por ciento.
5. Se logró la estandarización de los métodos serológicos de aglutinación de partículas de látex e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-*T.rangeli*.
6. Se necesitan métodos más específicos para localizar antígenos exclusivos de *T.rangeli* que permitan eliminar una reacción cruzada entre éste y *T. cruzi*.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios posteriores que ayuden a determinar el verdadero papel patogénico de *T. rangeli* en la población guatemalteca que se ve afectada por este parásito, para una acción inmediata, preferentemente en poblaciones definidas como zona endémica de la enfermedad de Chagas para establecer algún patrón o localizar más casos.
2. Utilizar métodos bioquímicos más específicos para una mejor determinación de componentes antigénicos de *T. rangeli* y obtener mejores resultados.

## 12. REFERENCIAS

1. Aguilar F. Parasitología Médica. Guatemala:Litografía Delgado. 1,987. 366p. (p.262-264)..
2. De León JR. El *Trypanosoma rangeli* observado en seres humanos en Guatemala. Pub. Inst. Inv. Cient. Gua. Usac. 1,949: 35p.
3. De León MP, Matta V. Estudio Clínico, serológico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhutatán, Santa Rosa. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1,997.7p.
4. D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. London: W.H.R. Lumsden and D.A Evans, eds.,1,976.
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Homenaje al cincuentenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) 1,909-1,959. Guatemala: Instituto de Enfermedades Tropicales "Doctor Rodolfo Robles", 1,959.52p.
6. Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. OMS, trad. Ginebra: OMS, Doc. Tec. No. 811, 1991. VI+102p.
7. Steindel M *et al.* *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1,920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasithrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State:First report of this trypanosome in southern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1,991;86:73-79
8. Rodas E, Monroy C. Morfometría de cepas guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* . Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala.(tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1,995.82p.

9. Kreier J, Baker J. Parasitic Protozoa. Segunda ed. California: Academic Press, Inc, 1992. XVII + 110 p. (p. 1-50).
10. Schofield CJ. Triatominae; Biología y Control. Eurocomunica Publications. 1,994. 77p.
11. Monroy C *et al.* Caracterización biológica de *Trypanosoma rangeli*. Enfermedades Tropicales en Guatemala 95 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,995;4:63-67.
12. Holguín A, Saravia NG, D'Alessandro A. Lack of enzyme polymorphism in *Trypanosoma rangeli* stocks from sylvatic and domiciliary transmission cycles in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1,987;36:53-58.
13. D'Alessandro A, Hincapie O. *Rhodnius neivai*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. Am. J. Trop. Hyg. 1,986;35:512-514.
14. D'Alessandro A *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri sciureus* from Bolivia and *Saguinus mistax* from Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1,986;35:285-289.
15. Osorio Y *et al.* Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a Promonocytic mammalian cell line. J. Parasitol. 1,995;81:687-693.
16. Vallejo GA, Marinkelle CJ. Estudio sobre la presencia de Neuraminidasa en *Rhodnius prolixus* infectado con *Trypanosoma rangeli*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 1,992;34:91-94.
17. Joklik W *et al.* Microbiología de Zinsser, 20ed. Boxaca M, Meeroff N, Mikkelsen K, trad. México: Editorial Panamericana, 1,995, 1696p.
18. Alemán C. Ultraestructura del *Trypanosoma rangeli* Tejera 1,920 formas de cultivo. Acta Cient. Ven. 1,970;21:145-153.

19. Urdaneta S, Tejero F. *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1,920): Observations upon pleomorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1,992;87:511-516.
20. Saldaña A, Sousa OE, Orn A. Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. J. Immunol. 1,995;42:644-650.
21. Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: cross reaction among their immunologic components. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1,996;91:81-82.
22. Rosfjord E *et al.* Analysis of antibody cross-reactivity in experimental American Trypanosomiasis. J. Parasitol. 1,990;76:698-702.
23. Matta V. Avances en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala 94 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,994;3:40-45.
24. Grogl M, Kuhn R. Identification of Antigens of Culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas disease. J. Parasitol. 1,984;70:822-824.
25. Rudin W, Schwarzembach M, Hecker H. Binding of lectins to culture and vector forms of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1,920 (protozoa kinetoplastida) and to structures of the vector gut. J. Protozool. 1,989;36:532-538.
26. Vallejo GA *et al.* A simple laboratory method for distinguishing between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1,993;87:165-166.

27. Brechiere SF *et al.* Copy number differences in the 195 BP repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potencial use for epidemiologic surveys. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1,993;88:163-165.
28. Basso B, Moretti E, Vottero-Cima E. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infections in *Trypanosoma rangeli* immunized mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1,991;44:413-419.
29. Harith A *et al.* Trypsin-treated and Coomassie blue-stained epimastigote antigen in a microagglutination test for Chagas disease. Am. J. Trop. Hyg. 1,987;37:66-71.
30. Andrews N, Einstein M, Nussenzweig V. Presence of antibodies to the major surface Glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes in sera from chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1,989;40:46-49.
31. Stites EP, Derr AI. Inmunología Básica Clínica. 7ed. Ramírez JA. trad. México: Editorial Manual Moderno S.A.de C.V.,1,993,1055p.
32. Pelczar M, Reid R, Chan ECS. Microbiología. 4ed. Capella A, trad. México: Editorial McGraw-Hill, 1993, XIV+826p.
33. Wiener Lab. Chagatest-látex. Rosario, Argentina. 1,995,2p.
34. Sgambatti A *et al.* Risk Factor for *Trypanosoma cruzi* infection among children in Central Brazil: a case control study in vector control settings. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1,995;52:183-187p.
35. Paz M *et al.* Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán. Enfermedades Tropicales en Guatemala 95 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). 1,995;4:33-38.

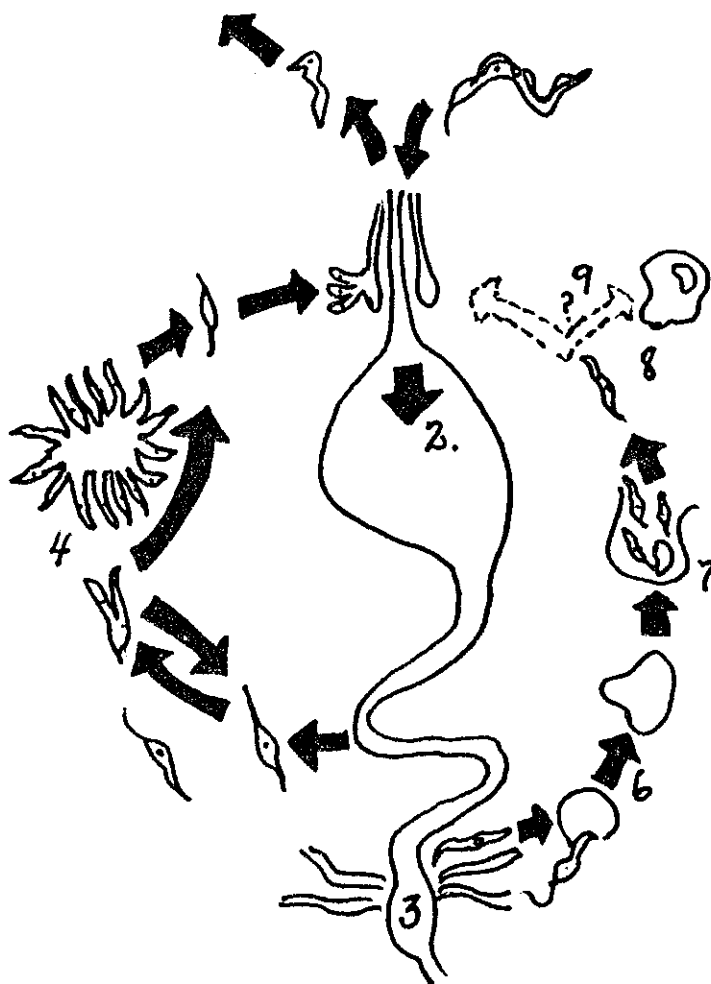


36. Avila JL, Rojas M. Elevated cerebroside antibody levels in human visceral and cutaneous Leishmaniasis, *Trypanosoma rangeli* infection, and chronic Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1,990;43:52-60.
37. Anthony RL, Cody T, Constantine N. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal-hybridoma antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1,981;30:1192-1197.
38. Acosta L *et al.* Trypanosomatid isolates from Honduras differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1,991;44:676-683.
39. Warren L. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J. Parasitol.* 1,960;46:529-539.
40. Johnson E. Experimental transmission and Biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasit.* 1,961;11:1-9.
41. Schotteliks J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop. med. parasit.* 1,987;38:323-327.
42. Amorim MI, Momen H, Traub-Cseko Y. *Trypanosoma rangeli*: sequence analysis of *Btubulin* gene suggests closer relationship to *Trypanosoma brucei* than to *Trypanosoma cruzi*. *Act. trop.* 1,993;53:99-105.
43. D'Alessandro A, Del Prado CE. Search for *Trypanosoma rangeli* in endemic areas of *Trypanosoma cruzi* in Argentina and Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1,977;26:623-627.
44. Barret TV. A trypanosome, indistinguishable from *Trypanosoma rangeli*, in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1,977;71:445-446.

45. Esquenazi D. Mapping of tubulin genes in *Trypanosoma rangeli* . Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1986; 81: 102.
46. Gregorio EA. The prophenoloxidase system and the *in vitro* recognition of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* haemolymph. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1986;81:124.
47. Buschiazzo A, Campetella O, Frasch A. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. Glycob. 1997;7;1167-1173.

## 13. ANEXOS

## ANEXO No. 1

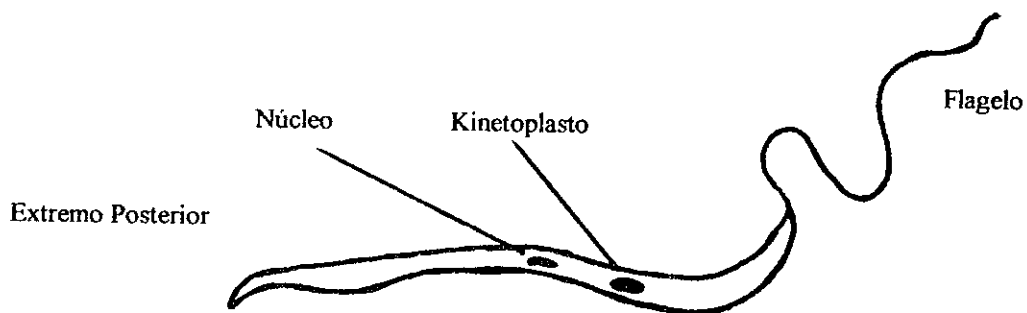
CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma rangeli* EN *Rhodnius* sp.

(1) Trypomastigote ingerido con sangre infectada. (2) Llegan al intestino en donde ya presentan estadio de epimastigote al igual que trypomastigotes. (3) En el recto los parásitos pasan a la hemolinfa para un desarrollo extracelular o invaden hemocitos para desarrollarse intracelularmente. (4-5) Ocurre la fisión binaria para llegar a las glándulas salivales en donde están listos los metatrypomastigotes para ser inoculados en un nuevo hospedero vertebrado. (6-9) Desarrollo intracelular. Se desconoce hacia donde llega el trypomastigote.  
**REFERENCIA:** Kreier J, Baker J. Parasitic Protozoa. Segunda ed. California: Academic Press, Inc, 1992. XVII + 110p. P.12.

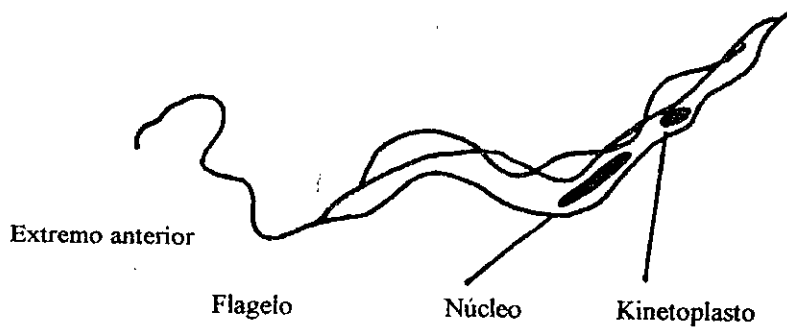
## ANEXO No. 2

*Trypanosoma rangeli*: ESTADIOS EN SU CICLO DE VIDA

## AMASTIGOTE Y FORMAS PIRIFORMES



## EPIMASTIGOTE



## TRYPOMASTIGOTE: forma infectiva

**REFERENCIA:** D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. London: W.H.R. Lumsden and D.A Evans, eds., 1976. 337p.

## ANEXO No. 3

TABLA No. 1 Resultados de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas

Total de muestras	No. de mx positivas	Porcentaje de positividad
544	50	9.2

TABLA No. 2 Resultados serológicos positivos para tres diferentes metodologías

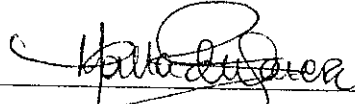
Pruebas Positivas	No. de Casos	(%)
HAI/RLAT/GAT	31	62.0
RLAT/GAT	11	22.0
HAI/GAT	5	10.0
HAI/RLAT	3	6.0
Total	50	100.0

**REFERENCIA:** Paz M *et al.* Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán. Enfermedades Tropicales en Guatemala 95 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). 1,995;4:33-38.



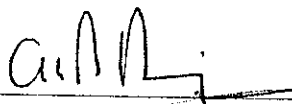
Amanda Elisa Gálvez Figueroa

Tesista



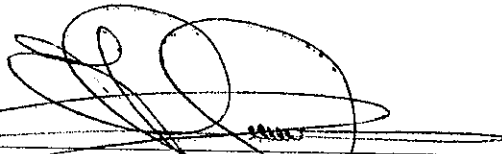
Licda. Vivian Matta Ríos de García

Asesora



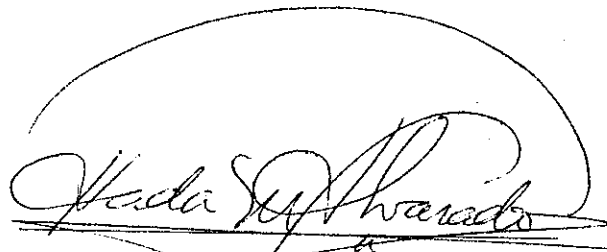
Licda. Margarita Paz de Ramírez

Asesora



Licda. Heidi Elke Logemann Lima

Directora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

Decana