



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN
DIRECTA PARA A DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI
Trypanosoma cruzi EN ROEDORES EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS**

Angélica María López Troncoso

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: ALDO SOLARI ILLESCAS

PROYECTO FONDECYT 1085154

SANTIAGO, CHILE

2017

INDICE

	Página
Índice	2
Resumen	3
Introducción	4
Objetivos	7
Materiales y Métodos	8
Resultados	15
Análisis Estadístico	18
Discusión	20
Conclusiones	23
Bibliografía	24
Anexos	28

RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es una importante zoonosis en Latinoamérica. Las técnicas serológicas más utilizados para detectar la infección en humanos son Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, las cuales requieren equipos no aptos para trabajar en terreno. En medicina veterinaria no se cuenta con una técnica serológica confiable, simple y rápida, es por esto que en esta tesis se comparó la utilidad de dos técnicas: Test de Aglutinación Directa Modificado (TAM) e IFI. En el estudio se utilizaron 50 sueros de ratones experimentalmente infectados con *T. cruzi*, 50 sueros de ratones libres de infección y 5 sueros de ratones infectados experimentalmente con *Toxoplasma gondii*. Los resultados se compararon con los parámetros de sensibilidad y especificidad y permiten concluir que TAM es útil para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en suero de ratón, presentando alta especificidad. No obstante, al compararla con IFI su sensibilidad es menor. Esto se podría explicar por menores niveles de anticuerpos circulantes en roedores, conclusión a la que se llegó al comparar ambas técnicas con un panel de sueros humanos infectados con *T. cruzi*.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas, Test de Aglutinación Directa Modificado, Inmunofluorescencia Indirecta.

ABSTRACT

Chagas disease (ChD) caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* is an important zoonosis in Latin American. The serologic techniques more used for detection of infection in humans are Indirect Immunofluorescence (IIF) and ELISA, wich requires equipments not appropriate for field work. As veterinary medicine doesn't count with a serologic technique to be reliable, simple and quick, in this thesis were used two diagnosis techniques: Modified Agglutination Direct Test (MAT) and IIF. For the study were used 50 sera of mice experimentally infected with *T. cruzi* , 50 sera infection free and 5 sera infected with *Toxoplasma gondii*. The results were compared with the sensitivity and specificity parameters and suggest that MAT it's useful for the diagnosis of infection by *Trypanosoma cruzi* in mouse sera, with a high specificity. However it's sensitivity is low compared with IIF. This could be explained by lower levels of circulating antibodies in rodents when comparing both techniques with a panel of human anti *T. cruzi* sera.

Key words: Chagas disease, Modified Direct Agglutination Test, Indirect Immunofluorescence.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis vectorial de carácter crónico en hospederos inmunocompetentes, y aguda en inmunocomprometidos. La presentación de la enfermedad de Chagas se encuentra estrechamente relacionada al área de distribución de sus vectores, que abarca desde México a Sudamérica. En Chile, la infección chagásica afecta principalmente a individuos de las zonas suburbanas y rurales de Chile, entre las latitudes 18° 30' N y 34° 16' S que corresponden a zonas áridas y semiáridas del país. El área tradicionalmente endémica por la presencia del vector se extiende entre la región de Arica y Parinacota por el norte a la región de O'Higgins por el sur, incluyendo a la región Metropolitana. La población total de esta área corresponde a un 77% de la población total del país, sin embargo, considerando que la enfermedad es más frecuente en áreas rurales (6% de la población total del país), que la transmisión vectorial de la enfermedad se encuentra interrumpida, y que actualmente se realiza control de la transmisión transfusional en todos los servicios de sangre del país, la población estimada como positiva corresponde a aproximadamente 98.000 personas (incluyendo niños <1 año) (MINSAL, 2014). El agente etiológico de la tripanosomiasis americana *Trypanosoma cruzi*, pertenece a la Familia Trypanosomatidae, Orden Kinetoplástida. Los vectores de *T. cruzi* son insectos triatominos (vinchucas), pertenecientes a la Familia Reduviidae, Orden Hemiptera. Reduviidae tiene 22 subfamilias, incluyendo la Triatominae, cuyos insectos se caracterizan por sus hábitos hematofágicos (Bacigalupo *et al.*, 2006). En nuestro país, se describen dos especies principales de vinchucas. La primera, *Triatoma infestans*, participa en el ciclo doméstico y está asociada a viviendas rurales, particularmente a aquellas con paredes de barro o paja. La segunda especie corresponde a *Mepraia spinolai*, que participa en el ciclo silvestre y puede ser encontrada entre piedras, pircas, grietas de rocas y sitios de descanso de diferentes mamíferos. Ambas especies se distribuyen en forma simpátrica (Bacigalupo *et al.*, 2006). Una tercera especie, en la cual recientemente se ha demostrado la infección por *T. cruzi*, es *Mepraia gajardoi* que se encuentra en zonas costeras de las regiones de Arica y Parinacota y Tarapacá de nuestro país (Boto-Mahan *et al.*, 2008). El ciclo de vida de *T. cruzi* presenta tres formas evolutivas: epimastigote, forma extracelular no infectante del parásito y de multiplicación en el intestino medio del insecto vector; tripomastigote, forma infectante no replicativa que se encuentra en el intestino posterior del triatomino (tripomastigote metacíclico) y en la sangre periférica del mamífero infectado; y amastigote, forma de multiplicación intracelular en la célula del hospedero mamífero (Tanowitz *et al.*, 1992). Las formas infectantes de *T.*

cruzi están presentes en las deyecciones de los insectos vectores y logran penetrar al hospedero a través de contacto con heridas de la piel, mucosas y conjuntiva (mecanismo de transmisión vectorial) (Brener *et al.*, 2000). La lesión inflamatoria causada por *T. cruzi*, que puede o no aparecer en la zona de ingreso del parásito en pacientes con enfermedad aguda, se conoce como chagoma de inoculación (Tanowitz *et al.*, 1992). La infección se extiende sistemáticamente hacia las células musculares, parasitando al tejido miocárdico, entre otros. Dada su evolución en personas inmunocompetentes la enfermedad de Chagas cursa hacia la cronicidad pasando por tres etapas: aguda, latente y crónica, pudiendo causar la muerte en cualquiera de ellas. En personas con enfermedad de Chagas crónica, el corazón es el órgano más comúnmente afectado. Se estima que entre un 10-30% de los enfermos presentan discapacidad, como consecuencia de daño cardíaco o digestivo (Apt *et al.*, 2008). En este último caso se puede observar megacolon y megaesófago por dilatación e hipertrofia de los órganos afectados (Brener *et al.*, 2000). Existe también la transmisión vertical. Al respecto, la tasa de transmisión transplacentaria desde madres con infección crónica por *T. cruzi* a sus recién nacidos se describe entre el 2% y 10%. En cuanto a la transmisión de *T. cruzi* vía lactancia ésta es extremadamente rara y hoy no se considera como válida (Santos *et al.*, 2003). El parásito también puede ser transmitido vía trasplante de órganos procedentes de individuos con infección crónica (Bern *et al.*, 2007). La transmisión oral a través de alimentos contaminados con deyecciones de triatominos infectados también ha sido descrita, es el caso del brote epidémico de Santa Catarina (Brasil) y hoy se considera como más frecuente (Villalobos., 2007). La infección por *T. cruzi* es además potencialmente transmisible por transfusión sanguínea (Apt *et al.*, 2008).

En el año 1986, la enfermedad de Chagas fue declarada en Chile como una patología de notificación obligatoria, lo que permitió detectar mayor número de casos. Este aumento se hizo más notorio desde 1996, cuando se reglamentó como obligatorio el tamizaje en bancos de sangre desde la región de Arica y Parinacota hasta la de región de Coquimbo (Apt *et al.*, 2008). En el año 1999, gracias a la Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR), Chile fue considerado país con interrupción vectorial de *T. infestans* (WHO, 2000). Esto no significa la eliminación del vector ni tampoco su erradicación, sino que constituye el primer paso para lograr una futura erradicación, lo que algunos autores consideran difícil por la multiplicidad de factores asociados. Actualmente en Chile el tamizaje es la mayor fuente de identificación de infectados por *T. cruzi*, lo que no asegura que en el resto del país no

existan donantes chagásicos, dada la migración rural urbana y de norte a sur dentro del país (Apt *et al.*, 2008).

En cuanto al diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas, éste puede realizarse por métodos directos que comprueban la presencia de *T. cruzi* o el material genético en la muestra estudiada; y/o mediante métodos indirectos o serológicos que evidencian la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en las muestras biológicas, las que pueden corresponder a suero, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo u otros. La elección del tipo de examen a solicitar dependerá de la fase clínica de la enfermedad que esté cursando el paciente. En la etapa aguda, los métodos diagnósticos de elección son los directos, puesto que tienen una alta sensibilidad, y en la fase crónica o latente indeterminada y crónica determinada, los métodos indirectos o serológicos son las técnicas de elección (Apt *et al.*, 2008). Gómez *et al.*, 1987, consideró como reacción de referencia para enfermedad de Chagas a la Hemoaglutinación Indirecta (HAI) por su sencillez, alta sensibilidad y especificidad. Por otro lado, a pesar de que la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la enfermedad de Chagas presenta un mejor rendimiento que la HAI, tiene dos limitantes: es necesario contar con un microscopio de fluorescencia y la reacción requiere de conjugados fluorescentes especie específicos. En cuanto al diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* en pequeños roedores, actualmente no se cuenta con una prueba estandarizada que cumpla con los requisitos de ser rápida, fácil de ejecutar, sensible, específica y confiable. Fulton y Turk (1959), describieron un test de aglutinación directa (TAM) para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis que utilizaba organismos muertos enteros (antígenos figurados). El método era simple y útil, pero presentaba según lo observado por Desmonts y Remington (1980) dos inconvenientes: carecía de sensibilidad y de especificidad. Los mismos autores optimizaron y describieron un método que incrementa la sensibilidad del test de Aglutinación Directa (AD) y suprime la aglutinación inespecífica mediante el uso de un buffer que contiene 2-mercaptoetanol (2BME). Cuando el test AD fue modificado, su especificidad y sensibilidad se incrementaron notablemente. La prueba optimizada por Dubey y Desmonts en 1987, fue denominada Test de Aglutinación Directa Modificada (TAM) y se ha utilizado ampliamente para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi*, así como también para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* y anti-*Leishmania donovani* en variadas especies animales.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta memoria de título es estandarizar, en muestras de suero de ratón (*Mus musculus*), tanto positivas como negativas a infección por *T. cruzi*, la Técnica de Aglutinación Directa Modificada (TAM), considerando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), como técnica de referencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar título diagnóstico para la reacción de inmunofluorescencia (IFI) en sueros de ratones (*M. musculus*) positivos a infección por *T. cruzii*.

Determinar el título diagnóstico para la Técnica de Aglutinación Directa Modificada (TAM) en sueros de ratones (*M. musculus*) positivos a infección por *T. cruzii*.

Evaluar si la técnica puesta a prueba (TAM) es útil en la detección de infección por *T. cruzii* en muestras de roedores experimentalmente infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de estudio

1.1 Muestras de ratones experimentalmente infectados

Se utilizaron 50 sueros de ratón (*M. musculus*) infectados experimentalmente con *T. cruzi*, obtenidos desde la seroteca del Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Estas muestras fueron obtenidas mediante punción cardíaca (tomadas con anterioridad por terceros para otros estudios), posteriormente inactivadas y congeladas a -20°C hasta su uso.

1.2 Muestras de ratones libres de infección

Se utilizaron 50 sueros de ratón (*M. musculus*) libres de infección por *T. cruzi*, obtenidos del vivero del Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las muestras fueron obtenidas mediante sangrado de la vena de la cola y una vez separado el suero mantenidas a 4°C.

1.3 Muestras de ratones positivos a infección por *Toxoplasma gondii*

Se utilizaron 5 sueros de ratón (*M. musculus*) infectados experimentalmente con *T. gondii* y libres de infección por *T. cruzi*, obtenidos desde la seroteca del Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Estos sueros fueron obtenidos mediante punción cardíaca con previamente por terceros para otros estudios y se mantuvieron preservados a -20°C hasta su uso.

2. Obtención de parásitos y preparación del antígeno (Vattuone y Yanovski., 1971)

A partir de formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, cultivadas en medio Diamond (aportadas por el Dr. Juan Diego Maya, Programa de Farmacología del ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile) se realizaron cultivos sucesivos para mantener un número adecuado de formas parasitarias, las cuales fueron cosechadas periódicamente (Anexo N°1). Este procedimiento se realizó en campana estéril, tomando

las medidas de bioseguridad pertinentes (Anexo N°4). Después de la cosecha se procede a la preparación del antígeno: El medio de cultivo se dispuso en tubos Falcon los cuales fueron centrifugados a 10.000 g por 15 minutos a 4°C y lavados 5 veces en PBS pH 7,2 (K₂PO₄ 28 ml, NA₂HPO 72 ml , NaCl 8.4 grs y agua destilada llevado a 1000 ml). El sedimento fue incubado en una solución de tripsina (4 gr de tripsina/litro) durante 45 minutos a 37°C. Después del tratamiento enzimático los parásitos fueron lavados 4 veces con PBS pH 7,2. Se eliminó el sobrenadante y se agregó una solución de formalina tamponada al 1% para fijar las células parasitarias. Con ayuda de una cámara de Neubauer se determinó la cantidad necesaria de parásito que requiere el estudio (Anexo 2).

3. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La técnica se realizó según lo descrito por Astorga *et al.*, 1988, para detectar la existencia de anticuerpos IgG dirigidos contra *T. cruzi*, utilizándose como antígeno formas epimastigotas del parásito previamente obtenidas y fijadas. Para esta reacción se utilizó el conjugado Anti-ratón IgG (Fab específico)-FITC producido en cabra (Sigma-Aldrich) (Anexo 3).

3.1 Estandarización de IFI

Con ayuda de una micropipeta multicanal, se realizaron microdiluciones de cada uno de los sueros en microplacas ELISA de fondo redondo, siendo 8 diluciones decrecientes de suero de ratón infectado en total (de 1/10 hasta 1/1.280), las cuales fueron enfrentadas posteriormente con diferentes concentraciones del conjugado fluorescente, esto con el fin de determinar el título diagnóstico de la técnica para *M. musculus*. En la placa ELISA, al primer pocillo de cada fila se agregó 250µl de PBS pH 7,2 y a los siguientes pocillos 150µl. Con la micropipeta se tomó 50µl de suero y se agregó al pocillo n°1, se mezcló bien, se tomó 150µl y se traspasó al pocillo n°2 (dilución 1/10), se mezcló bien, luego se tomó 150µl y se traspasó al pocillo n°3 (dilución 1/20) y así sucesivamente hasta llegar al pocillo n°8 (dilución 1/1.280) para cada uno de los sueros. El último pocillo de cada fila quedó con un volumen total de 300µl. Por otro lado, se realizaron diluciones del conjugado para conocer cuál es la concentración óptima que detecta la positividad a

anticuerpos anti *T. cruzi*. Para ello se enumeraron cinco tubos de ensayo. Se preparó una solución de PBS pH 7,2 y azul de Evans (1800µl de PBS + 200µl de azul de Evans 10%) a partir de una solución stock de azul de Evans que se mantiene refrigerada a 4°C (10mg de azul de Evans + 100ml de PBS y, al momento del procedimiento, se mezcla una parte de la solución stock más 9 partes de PBS). De esta solución se tomó 500µl para agregar al primer tubo y a los siguientes 250µl a cada uno. Luego se tomó 2µl de conjugado y se agregó al tubo n°1 (dilución 1/250), se mezcló bien, luego se tomó 250µl y se traspasó al tubo n°2 (dilución 1/500), se mezcló bien, se tomó 250µl y se traspasó al tubo 3 (dilución 1/1000) y así sucesivamente hasta la dilución 1/4000. Una vez preparadas las diluciones de suero y conjugado, se realizó la estandarización de IFI.

3.2 Criterio de positividad

Se consideró como reacción positiva la observación al microscopio de fluorescencia de epimastigotes fluorescentes (color verde) en su membrana y/o citoplasma. Por el contrario, se consideró una reacción como negativa al observar formas epimastigotes de *T. cruzi* no fluorescentes con campo de fondo verde opaco y leves tintes rojos.

MODELO GRÁFICO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

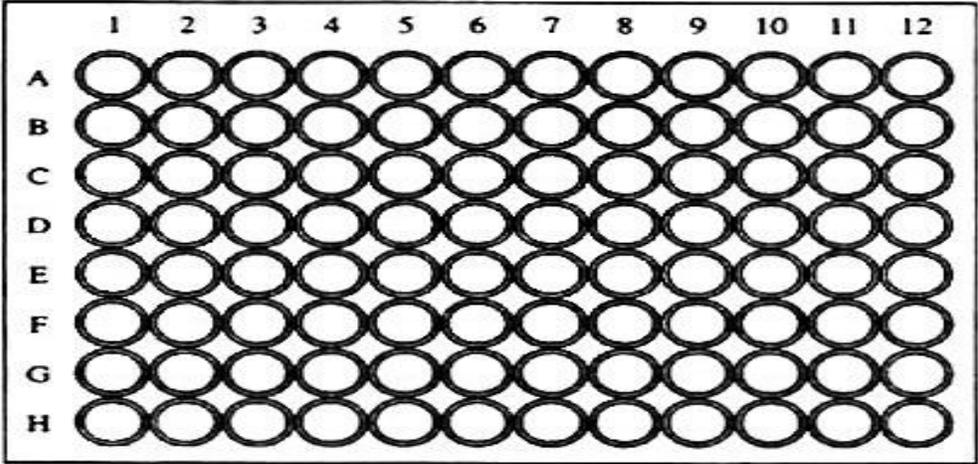
Estandarización

Diluciones de suero

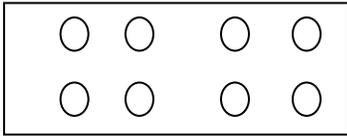
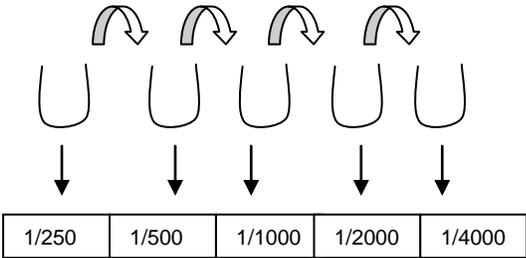
1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/16	1/320	1/640	1/1280
-----	------	------	------	------	------	-------	-------	--------



- Suero 1
- Suero 2
- Suero 3
- Suero 4
- Suero 5
- Suero 6
- Suero 7
- Suero 8



Dilución conjugado



Placa de IFI

4. Estandarización de TAM

La técnica fue estandarizada según la metodología descrita por Desmonts y Remington en 1980, y para la preparación del antígeno se utilizó como referencia el trabajo de Vattuone y Yanovsky (1971). Se utilizó como antígeno epimastigotes muertos fijados de *T. cruzi* y las muestras de sueros fueron tratadas con 0,2 M de 2-mercaptoetanol (2BME) para reducir las moléculas inespecíficas de inmunoglobulina M.

Con ayuda de una micropipeta multicanal, se realizaron microtitulaciones en microplaca ELISA de fondo redondo (se prefieren éstas antes que las de fondo en forma de V ya que facilita la observación de los resultados), enfrentando diluciones decrecientes de antígeno preparado de *T. cruzi* (de 1/50 a 1/1.600), versus diluciones decrecientes de suero de ratón infectado (de 1/2 hasta 1/512), esto con el fin de lograr determinar el título diagnóstico de la técnica. No es necesario inactivar el suero (debido al uso de 2BME). Se utiliza una solución de 2BME 0,2M (14ml/litro) diluido en PBS. Es importante que esta solución esté fresca (no más de dos semanas) y preservada a 4°C. En la placa ELISA, se enumeraron los pocillos por fila desde el n°1 al n°8. Se realizaron diluciones dobles comenzando con 1/2. En el primer pocillo de cada fila se agregaron 50 µl de antígeno preparado como control para evidenciar autoaglutinación espontánea. En el segundo pocillo de cada fila se agregó 80 µl de 2BME diluido en PBS (1ml de 2BME en 10ml de PBS) y 40 µl en cada uno de los siguientes pocillos. Luego se procede a diluir los sueros, para lo cual se agregó 40µl de cada uno en el segundo pocillo de cada fila. Se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a la 1/512, traspasando 40µl del contenido de un pocillo a otro cada vez. Finalmente en cada pocillo quedó un volumen total de 80µl, excepto en el último pocillo de cada fila, con un volumen total de 120µl. Después de que todos los sueros fueron diluidos se distribuyen 40µl de la solución antigénica en todos los pocillos de cada placa. En consecuencia, el volumen total de los pocillos fue de 120µl, a excepción de los pocillos de la última columna, con un volumen total de 160µl. Con la pipeta multicanal se agita la placa para mezclar muy bien el contenido. Finalmente las placas se cubrieron con papel celofán (se debe procurar que queden bien cubiertas para evitar que se sequen) y se incubaron a 32°C por toda la noche (al menos 16 hrs). Las placas se pueden leer a las 16, 24, 48 e incluso 72 horas sin resultar un cambio significativo en los títulos. Al día siguiente se procedió a su lectura con ayuda de espejo oblicuo con fondo oscuro con luz lateral.

4.1 Criterios de positividad

Una muestra se consideró positiva para el título en donde se pudo observar claramente una aglutinación en forma de manto uniforme (como una delgada malla), que en contraste con el fondo oscuro se observa de color blanco. Por lo contrario, la muestra se consideró negativa cuando no se pudo observar dicho manto y en su lugar se observó claramente un precipitado de antígeno al fondo del pocillo, que en contraste con el fondo oscuro se ve de forma de un suave botón color blanco. También es posible observar lecturas intermedias o dudosas, en estos casos se observó un manto difuso no bien definido, estos casos se consideraron como sospechosos, se repitieron esas muestras (en lo posible) y además se verificó con su resultado por IFI.

5. Análisis estadístico

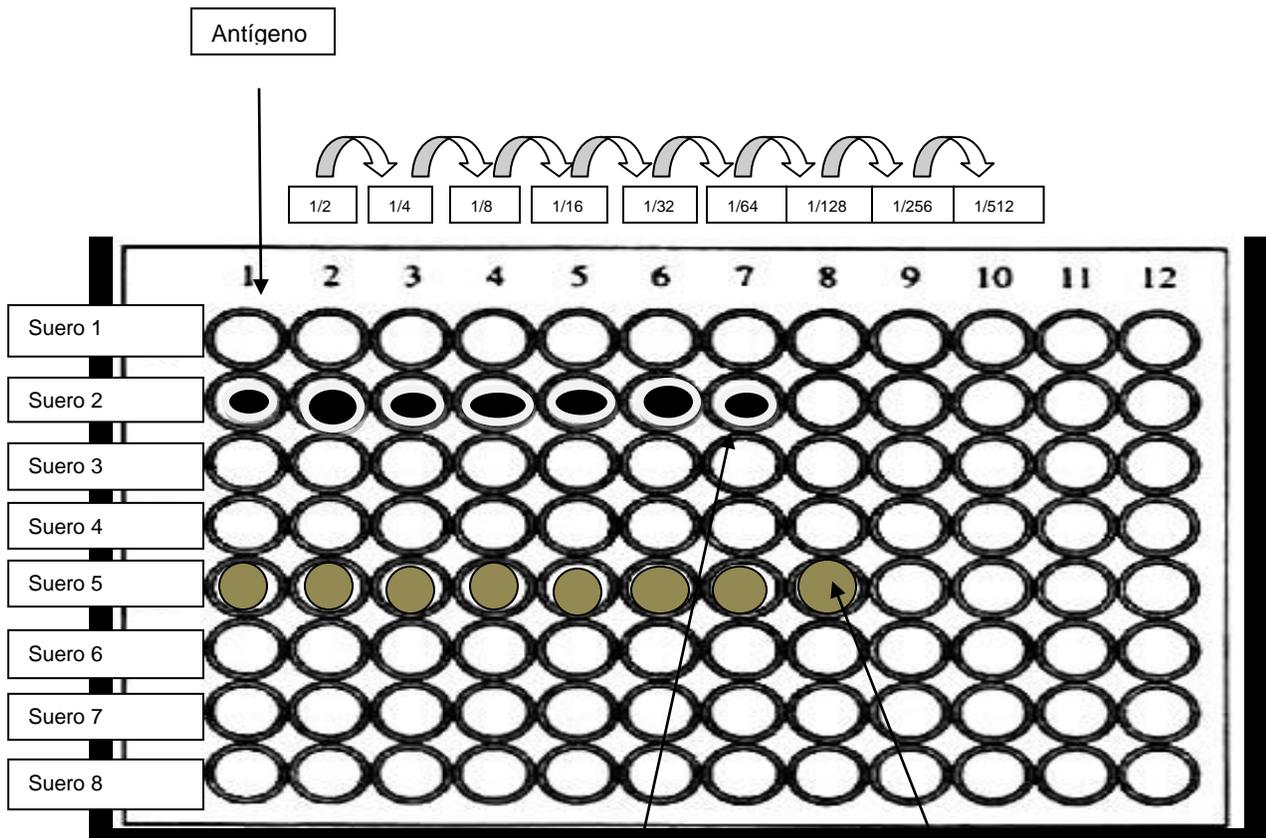
El análisis estadístico contempló la comparación de proporciones para datos pareados (comparación de métodos diagnósticos), por ende se calcularon los parámetros de Sensibilidad (Se), Especificidad (Sp), Valor predictivo positivo (VP +), y Valor predictivo negativo (VP -) tanto para IFI, como para la técnica puesta a prueba (TAM), en sueros de ratones (*M. musculus*). La sensibilidad fue definida como el porcentaje de muestras de suero de ratón positivas por IFI que fueron identificados como positivas por TAM. La especificidad fue definida como el porcentaje de muestras de suero de ratón negativas por IFI que fueron identificados como negativos por TAM. El valor predictivo positivo fue definido como la probabilidad de que un resultado positivo por TAM podría ser positivo por IFI. El valor predictivo negativo fue definido como la probabilidad de que un resultado negativo por TAM podría ser negativo por IFI. Para comprobar si existen diferencias significativas en el uso de una técnica u otra, se calculó el índice de χ^2 cuadrado. (Altman y Bland., 1994).

Esta memoria de título contempló el uso de animales de laboratorio, por ello se adjuntan los anexos referentes a Normas de Bioseguridad en el laboratorio Fondecyt-Conecyt (Anexo 4) y Certificado de Bioética (Anexo 5).

MODELO GRÁFICO DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN DIRECTA MODIFICADA (TAM)

Placa tipo ELISA

Diluciones



Reacción negativa (precipitación de antígeno en ausencia de anticuerpos en suero)

Reacción positiva (unión de antígeno con los anticuerpos presentes en suero)

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos al evaluar 50 sueros de ratón experimentalmente infectados con *T. cruzi*; 55 sueros de ratón libres de infección por *T. cruzi* (de los cuales 5 eran positivos para *T. gondii*), con las técnicas de IFI Anti-IgG ratón y TAM.

En el Cuadro 1, se observan los resultados de IFI-IgG anti ratón obtenidos en 50 sueros de ratón infectados experimentalmente con *T. cruzi*. Los títulos obtenidos fluctúan entre 1/10 y 1/160. Al considerar como título diagnóstico arbitrario, es decir positivo, 1/10 (14% de los casos), la positividad alcanza el 100% (se considera 1/10 como título ya que todos los sueros testeados correspondían a roedores que fueron inoculados con el parásito, por ende existe 100% de probabilidad de que estuvieran infectados). El 62% presenta títulos mayores a 1/20 y el 30% de los casos resultó con título 1/80. Por otro lado, los 50 sueros de ratones de vivero (ratones libres de infección) fueron negativos a IFI-IgG para infección por *T. cruzi*. (ninguno de ellos mostró fluorescencia frente a alguna dilución).

Cuadro 1. Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta anti-IgG en sueros de ratón infectados experimentalmente con *T. cruzi*, dilución Anti-IgG ratón 1/500.

Suero	Título	Suero	Título	Suero	Título	Suero	Título	Suero	Título
1	1/160	11	1/80	21	1/20	31	1/80	41	1/40
2	1/80	12	1/10	22	1/20	32	1/20	42	1/160
3	1/80	13	1/40	23	1/40	33	1/80	43	1/40
4	1/160	14	1/10	24	1/160	34	1/40	44	1/80
5	1/160	15	1/80	25	1/20	35	1/10	45	1/80
6	1/160	16	1/10	26	1/10	36	1/40	46	1/40
7	1/20	17	1/20	27	1/160	37	1/20	47	1/80
8	1/10	18	1/160	28	1/80	38	1/40	48	1/40
9	1/80	19	1/80	29	1/10	39	1/80	49	1/40
10	1/160	20	1/20	30	1/20	40	1/80	50	1/80
Control (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de TAM en 50 sueros de ratón infectados experimentalmente con *T. cruzi*, (que resultaron positivos para IFI-IgG). Considerando como título diagnóstico arbitrario 1/4 (4% de los casos), la positividad de estos sueros alcanza el 64%. Los títulos obtenidos fluctúan entre 1/4 y 1/16 (los cuales con mucho más bajos que los obtenidos con técnicas de aglutinación en sueros humanos Alvarez *et al*, 2014; Vattuone y Yanovski.,1971; Añez *et al*; 2001). Se destaca la cantidad de sueros que, siendo positivos por IFI, resultaron negativos con esta técnica, representando al 36% de los casos. En el 34% de los sueros se determinó un título de 1/16. Al establecer el título diagnóstico en 1/4, el 100% de los casos de sueros controles negativos fueron detectados como tal, ya que a pesar de que dos de ellos tienen título 1/2, no se consideran positivos porque no alcanzan el título diagnóstico establecido para la técnica.

Cuadro 2. Resultados de la Técnica de Aglutinación Directa Modificada (concentración de antígeno 6×10^8 parásitos/ μ l), en sueros de roedores infectados experimentalmente con *T. cruzi*.

Suero	Título								
1	(-)	11	1/16	21	1/16	31	(-)	41	1/8
2	(-)	12	1/4	22	1/16	32	(-)	42	1/16
3	(-)	13	1/8	23	(-)	33	1/32	43	1/4
4	(-)	14	(-)	24	(-)	34	1/16	44	1/16
5	1/32	15	1/16	25	1/16	35	1/8	45	1/16
6	1/16	16	(-)	26	(-)	36	1/8	46	(-)
7	1/8	17	1/16	27	(-)	37	1/8	47	1/16
8	1/8	18	1/16	28	(-)	38	1/32	48	1/16
9	(-)	19	(-)	29	1/8	39	(-)	49	1/8
10	1/32	20	(-)	30	1/16	40	1/16	50	1/16

En cuanto a los resultados de IFI y TAM que se obtuvieron al evaluar 5 sueros de ratones de vivero negativos a *T. cruzi* pero positivos a *T. gondii* (inoculados previamente con el parásito), se puede observar que la prueba es 100% específica para *T. cruzi*, ya que no hubo reacción frente a sueros infectados con esta parasitosis, que según lo descrito puede ocurrir en ciertos casos, por ejemplo con *Leishmania spp* (Alvarez *et al.*, 2014).

Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos para ambas técnicas diagnósticas se crearon tablas de contingencia de 2x2 enfrentando los resultados obtenidos mediante TAM con aquellos obtenidos con IFI para los sueros de ratones infectados y aquellos libre de infección.

Tabla 1: Tabla de contingencia para resultados de la Técnica de Aglutinación Directa Modificada y la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en sueros de ratón

		IFI		
		Positivos	Negativos	Total
TAM	Positivos	32 (VP)	0 (FN)	32
	Negativos	18 (FP)	55 (VN)	73
	Total	50	55	105
	Sensibilidad: 64% Especificidad: 100% Valor predictivo positivo: 100% Valor predictivo negativo: 52%			

Sensibilidad: $VP/(VP + FN) \times 100\%$
Especificidad: $VN/(FN+VN) \times 100\%$
Valor Predictivo Positivo: $VP/(VP + FN)$
Valor Predictivo Negativo: $VN/(FP + VN)$

La Tabla 1 relaciona los resultados de TAM con los resultados de IFI. Se puede observar que un 100% de los verdaderos negativos (detectados por IFI) son detectados como negativos con TAM, mientras que en el caso de los verdaderos positivos sólo un 64% fue detectado como tal con esta última técnica. Se puede estimar entonces que la sensibilidad de este ensayo alcanza un 64%, esto quiere decir que la técnica puesta a prueba sólo detecta un 64% del total de muestras positivas por IFI (la técnica de referencia). Es decir un 36% de sueros positivos a infección por *T. cruzi* resultaron negativos por TAM. Por otro lado, la especificidad es de un 100%, lo que quiere decir que el 100% de las muestras seronegativas (detectados previamente como tal por IFI) resultaron negativas con TAM. El Valor Predictivo Positivo es de un 100% lo que significa que hay un 100% de probabilidad de que un resultado positivo por TAM sea positivos por IFI, es decir 100% de probabilidad de que individuos con resultados positivos por TAM estén realmente afectados por la

infección. El Valor Predictivo Negativo es 52%, lo que quiere decir que hay un 52% de probabilidad de que un resultado negativo por TAM sea negativo por IFI, es decir un 52% de probabilidad de que muestras que resulten seronegativas sean realmente seronegativas.

En este caso se puede plantear la siguiente hipótesis:

H1: Existen diferencias significativas en los resultados obtenidos entre las técnicas de TAM e IFI al evaluar muestras de sueros de ratón.

Tabla 2: Tabla de contingencia para cálculo de χ^2

		IFI	
		+	-
TAM	+	32 (n_{11})	0 (n_{12})
	-	18 (n_{21})	55 (n_{22})
		50 ($n_{.1}$)	55 ($n_{.2}$)
		32 ($n_{1.}$)	73 ($n_{2.}$)
		105 (n)	

$$\chi^2: \frac{n(n_{11}n_{22} - n_{12}n_{21})^2}{n_{1.}n_{2.}n_{.1}n_{.2}}$$

Con los datos de la Tabla 2 se calcula χ^2 que en este caso sería 50.63. Considerando GL (grados de libertad) 1 y asumiendo un nivel de significancia de 0.05, la probabilidad (p) de que exista un cambio entre los resultados obtenidos con ambas técnicas sería significativo, ya que el valor del χ^2 cuadrado calculado (50.63), es mayor al valor de chi cuadrado crítico (3.84). Esto quiere decir que existe una mayor probabilidad de que una muestra que en un principio es positiva pueda eventualmente pasar a ser diagnosticada como negativa, que, al contrario, una muestra que en un principio es negativa después sea identificada como positiva.

DISCUSIÓN

Gracias a los esfuerzos realizados en las últimas décadas para erradicar la enfermedad de Chagas, el vector domiciliario que la transmite en Chile, *T. infestans*, ha sido controlado de acuerdo a la iniciativa del Cono Sur (Rozas *et al.*, 2005). Sin embargo, existen muchos reservorios mamíferos, entre ellos pequeños roedores silvestres, que contribuyen en la dispersión y mantención de *T. cruzi* en el medio ambiente (Campos *et al.*, 2007). Por ello sería útil contar en el área de medicina veterinaria con una técnica de diagnóstico serológico que sea fácil, rápida, sensible y capaz de ser montada en condiciones de campo, para pesquisar de manera rápida y sencilla la infección en estas especies. En cuanto a métodos serológicos para detectar Chagas en pequeños roedores, existen escasos trabajos al respecto. En el trabajo de Schmuñis *et al* (1972) se realizó la técnica de aglutinación directa para evaluar muestras de ratones mostrando alentadores resultados. En otros trabajos relacionados en ratas o ratones se ha inoculado *T. cruzi* y posteriormente realizado PCR en sus muestras o técnicas histopatológicas en sus tejidos (Nogueira-Parva *et al.*, 2015). Es por esto que se ha considerado evaluar la utilidad del Test de Aglutinación Directa Modificada (TAM), ya que ha demostrado ser una técnica de elección para el diagnóstico de infección por *T. gondii* en diversas especies animales, debido a sus altos niveles de sensibilidad y especificidad (Desmonts y Remington, 1980; López *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998), así como también para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en diferentes especies (Yaeger, 1988; Lauricella *et al.*, 1993), e incluso para detectar anticuerpos contra *Leishmania donovani*, demostrando la confiabilidad y utilidad de esta técnica en el diagnóstico serológico (Bimal *et al.*, 2005).

A la luz de los resultados obtenidos con TAM en la detección de *T. cruzi* en sueros de ratón (*M. musculus*), se puede deducir que la baja sensibilidad que la prueba evidencia (>70%) podría estar explicada por los siguientes factores: 1) Bajos niveles de anticuerpos que podrían circular en el torrente sanguíneo de pequeños roedores. Está comprobado que mientras mayor es la carga parasitaria en el individuo vía inoculación experimental, mayor es la cantidad de anticuerpos que se pueden evidenciar (López *et al.*, 2001). En este estudio no contamos con esa información previa, ya que se utilizaron sueros de ratones previamente infectados con *T. cruzi* y además no contamos con el dato de la vía de inoculación ni de la concentración exacta de carga parasitaria. 2) El volumen de suero de ratón utilizado para la microtitulación fue mucho menor en comparación con lo que usualmente se utiliza en este tipo de técnicas (de aglutinación), esto fue simplemente

porque no se disponía de más cantidad de muestra. 3) Se podría considerar el tiempo de conservación de las muestras de ratones positivos a *T. cruzi*, las cuales fueron mantenidas durante años a -20°C lo cual pudo haber afectado en cierta manera a las inmunoglobulinas presentes en el suero (Rosa-Jiménez *et al*, 2003). 4) Se podría pensar que las diferencias en los resultados obtenidos podrían estar relacionadas con la preparación y conservación del antígeno, que según Vattuone y Yanovsky, (1971) tiene varios requisitos, los cuales fueron controlados en este estudio: se realizó tratamiento con tripsina, se calculó la concentración de formalina (1%); la concentración de solución parasitaria se calculó usando la cámara de Neubauer, se utilizó incubadora para mantener controlada la temperatura y la solución antigénica fue conservada a -4°C (durante un plazo no mayor a tres meses). Existe la posibilidad (aunque es muy poco probable) de que algo haya fallado durante la preparación del antígeno, lo que pudo generar la disminución de la sensibilidad de la técnica. En la estandarización existieron muchos casos de sueros dudosos o resultados intermedios, lamentablemente muchos de ellos no se pudieron repetir debido a falta de muestra. 5) Se debe considerar que al ser una reacción de aglutinación la lectura puede ser muy subjetiva, normalmente se recomienda que en reacciones de aglutinación directa las placas sean interpretadas al menos por dos personas para que se llegue a un consenso de parte de ambas, ya que es fácil caer en el error de la lectura de las mismas, debido a las variaciones personales en la interpretación de resultados (Adams *et al.*, 2012).

TAM es una técnica rápida de realizar, que consiste en realizar microtitulaciones en microplacas de fondo redondo, y luego llevarlas a una incubadora durante un mínimo 16 horas para posteriormente leer los resultados. Es fácil de ejecutar, ya que no requiere demasiada experiencia (aunque idealmente se solicita un entrenamiento previo), se pueden analizar varias muestras de una sola vez, es económica ya que no requiere de costosos reactivos o aparatos y es además aplicable para hacer un screening rápido en condiciones de campo, donde no siempre se tiene el equipamiento mínimo a mano (sólo se necesita una incubadora o una habitación con temperatura controlada y un espejo oblicuo de fondo oscuro para leer las placas). En cuanto a sus desventajas, la principal es la preparación y preservación del antígeno, que es crítica, y depende de muchos factores previamente mencionados, los cuales si no son bien controlados, pueden generar resultados erróneos y por otro lado está la interpretación de los resultados que puede ser, en cierta medida, subjetiva. Además existe, como en la mayoría de las técnicas de aglutinación, el riesgo de aglutinación espontánea, debido a la inestabilidad del antígeno,

que tiende a autoaglutinar en muestras negativas, aunque esto se evita con el uso de 2BME (Dubey y Desmonts, 1987; Vattuone y Yanovsky, 1971).

Al comparar los resultados diagnósticos obtenidos con ambas técnicas, podemos afirmar que la técnica IFI anti-IgG es una excelente alternativa serológica para detectar infección por *T. cruzi* en pequeños roedores, puesto que es rápida de ejecutar, se puede practicar en cualquier laboratorio que cuente con mínimo equipamiento (al menos con un microscopio de fluorescencia), cumple con altos niveles de sensibilidad y especificidad y en este estudio mostró muy buenos resultados. En cuanto a sus desventajas, de debe mencionar la necesidad de un microscopio de inmunofluorescencia y el costo del conjugado anti-IgG (a pesar de ello su costo por reacción es bajo, ya que se usan sólo unos cuantos microlitros para analizar un gran grupo de muestras). Otra desventaja es que no es una técnica portable que se pueda implementar en condiciones de campo, a diferencia de TAM y en el caso de utilizar esta última es recomendable complementarla con el uso de otras técnicas serológicas (por ejemplo IFI e IHA) y así tener mayor seguridad en los resultados (Alvarez *et al.*, 2014).

Actualmente se está aplicando en el estudio de infección por *T. cruzi* en reservorios animales la técnica de PCR (Campos *et al.*, 2007, Botto-Mahan *et al.*, 2015, Rojo *et al.*, 2017) debido a su alta sensibilidad y especificidad. No obstante se han demostrado casos de PCR positivo y serología negativa (Salomone *et al.*, 2003). De allí la importancia en el uso de técnicas de diagnóstico serológico fáciles y rápidas de ejecutar, aplicables en condiciones de campo, con altos niveles de sensibilidad y especificidad y con la capacidad de analizar un gran número de muestras a la vez.

CONCLUSIONES

El Test de Aglutinación Directa Modificada (TAM) aplicado al diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en ratones, evidenció baja sensibilidad y alta especificidad, en comparación con la Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), considerada como Gold Standard en el presente estudio, la que evidenció alta sensibilidad y especificidad.

La estandarización de TAM permite concluir que la técnica, a pesar de las limitaciones en la preparación y estabilización de la suspensión antigénica de *T. cruzi*, podría ser de utilidad en estudios de campo para estudiar la infección en pequeños roedores. Pero para ello habría que ejercer un estricto control en todos los posibles factores que puedan perjudicar de una u otra manera la ejecución de la misma (por ejemplo: la cantidad de suero a usar por ratón, la conservación de las muestras, la preparación del antígeno y la lectura de resultados de parte de al menos dos personas). Sería prudente en futuros estudios tomar en consideración los factores mencionados en esta memoria.

A pesar de ser una herramienta de diagnóstico útil y fácil de ejecutar, para obtener mejores resultados de especificidad y sensibilidad, es necesario complementar los resultados de TAM con los de otras pruebas diagnósticas (como IFI e IHA por ejemplo).

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, ER; JACQUET, D; SCHOONE, G; GIDWANI, K; BOELAERT, M; CUNNINGHAM, J. 2012 Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. *PLoS Neglected Tropical Disease*. Vol. 6(12) e 1946. doi:10.1371/journal.pntd.0001946.

ALTMAN, DG; BLAND, M. 1994 Statistic Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *B. M. J.* 308:1552

ALVIAREZ, Y; LARES, M; VIETTRI, M; AGUILAR, CRUZ M; HERRERA, L; FERRER, E. 2014 Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*. Vol. 34, Núm. 2.

ARREDONDO, B; VOLTOLINA, D. 2007 Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Cap. 2, p. 21-29.

AÑEZ, N; CARRASCO, H; PARADA, H; CRISANTE, G; ROJAS, A; GONZALEZ, N; RAMIREZ, J; GUEVARA, P; RIVERO, C; BORGES, R; SCORZA, J. 1999 Acute Chagas' Disease in Western Venezuela: A Clinical, Seroparasitologic and Epidemiologic Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 60, p. 215-222.

APT B, W; HEITMANN G, I; JERCIC L, M I; JOFRÉ M, L; MUÑOZ C. DEL V, P; NOEMÍ H, I; SAN MARTÍN V, A M; SAPUNAR P, J; TORRES H, M; ZULANTAY A, I. 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infectol* 25 (3): 189-193; 285-288.

ASTORGA, B; LORCA, M; THEIRMANN, E. 1988. Determinación del título diagnóstico de la reacción de Inmunofluorescencia Indirecta para la Enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol al Día* 12: 132-135.

BACIGALUPO B, A; SEGURA M, J A; GARCÍA C, A; HIDALGO C, J; GALUPPO G, S; CATTAN, P E. 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Med Chile* 134: 1230-1236.

BERN, C; MONTGOMERY, S; HERWALDT, B; RASSI, A; MARIN-NETO, J; DANTAS, R; MAGUIRE, J; ACQUATELLA, H; MORILLO, C; KIRCHHOFF, L; GILMAN, R; REYES, P; SALVATELLA, R; MOORE, A. 2007. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. *JAMA*. 298 (18):2171-2181.

BIMAL, S; DAS, VNR; SINHA, PK; GUPTA, AK; VERMA, N; RANJAN, A; SINGH, SK; SEN, A; BHATTACHARYA, SK; DAS, P. 2005. Usefulness of the direct agglutination test in the early detection of subclinical *Leishmania donovani* infection: a community-based study. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. Vol. 99, No. 8, p: 743-749.

BOTTO-MAHAN, C; SEPÚLVEDA M; VIDAL M; ACUÑA-RETAMAR M; ORTIZ S; SOLARI A. 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Tropica*.105:166-9.

BOTTO-MAHAN, C; ROJO, G; SANDOVAL-RODRÍGUEZ, A; PEÑA, F; ORTIZ, S; SOLARI, A. 2015. Temporal variation in *Trypanosoma cruzii* lineages from the native rodent *Octodon degus* in semiarid Chile. *Acta Tropica*. 151:178-181.

BRENER, Z; ANDRADE, Z; BARRAL-NETO, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Guanabara Koogan Ed. Río de Janeiro. Brasil. 201 pp.

CAMPOS, R; BOTTO-MAHAN, C; ORTIZ, S; ACUÑA, M; CATTAN, P; SOLARI, A. 2007. *Trypanosoma cruzi* Detection in blood by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction in the wild rodent *Octodon degus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 324-326.

DESMONTS, G; REMINGTON, J.S. 1980. Direct agglutination Test for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*, 11 (6): 562-568.

DUBEY, P; DESMONTS, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Eq Vet J* 19: 337-330.

FULTON, JD; TURK, JL. 1959. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *The Lancet*. 2: 1068-1069.

GÓMEZ, M; APT B, W; SANDOVAL, J. 1987. Evaluación de la reacción de hemaglutinación indirecta para Enfermedad de Chagas en muestras de sangre humana total recolectadas mediante papel filtro. *Rev Med Chile* 115: 329-333.

HILL, R. Jr; ZIMMERMAN, J; WILLS, R; PATTON, S; CLARK, W. 1998. Seroprevalence of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Free-ranging Mammals in Iowa. *J Wild Dis.* Vol. 34, p. 811-815.

LAURICELLA, M; WISNIVESKY-COLLI, C; GURTLER, R; PETERSEN, R; BUJAS, M; SEGURA, E. 1993. Standardization of Serological tests for Detecting Anti *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* Vol 88, p. 413-417.

LOPEZ, M; CORREDOR, A; REYES, P; GIRALDO, A; FONSECA, D; GOMEZ, G. 2001. Estandarización de una prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para IgG anti-toxoplasma en ratón. *Biomédica.* Vol. 21, No 001, p. 83-85.

MINISTERIO DE SALUD CHILE (MINSAL). 2011. Departamento de Epidemiología. Circular B 51/17 de Vigilancia de Enfermedad De Chagas.

NOGUEIRA-PARVA, NC; VIEIRA, PMdA; OLIVER, LMR; FONSECA, KDS; PUND-LANA, G; DE OLIVEIRA, MT ET AL. 2015. Host Parasite Interactions in Chagas Disease: Genetically Unidentical Isolates of a single *Trypanosoma cruzi* Strain Identified in vitro via LSSP-PCR. *Plos one.* 10(9): e0137788. Doi:10.1371/journal.pone.013778.

PRATS, G. 2006 Microbiología Clínica. *Ed. Méd. Panamericana.* p.154

ROJO, G; SANDOVAL-RODRÍGUEZ, A; LÓPEZ, A; ORTIS, S; CORREA, JP; SAAVEDRA, M; BOTTO-MAHAN, C; CATTAN, PE; SOLARI, A. 2017. Within-host temporal fluctuations of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units: the case of the wild reservoir rodent *Octodon degus*. *Parasites & vectors.* 7;10(1):380. Doi:10.1186/s13071-017-2314-2.

ROSA-JIMÉNEZ, F.; GASSÓ, M.; OMAR, M.; CAMACHO, M.°V.; DURO, G.; GÓMEZ, J.; HERNÁNDEZ-BURRUEZO, J.J. 2003. *Efectos de la congelación sobre las proteínas totales.* *An. Clin.* 28(2): 53-60.

ROZAS, M; BOTTO-MAHAN, C; CORONADO, X; ORTIZ, S; CATTÁN, P; SOLARI, A. 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 73: 517-519.

SALOMONE, O; BASQUIERA, A; SEMBAJ, A; AGUIRRE, A; REYES, M; OMELIANUK, M; FERNANDEZ, R; ENDERS, J; PALMA, A; BARRAL, J; MADOERY, R. 2003. *Trypanosoma cruzi* in persons without Serologic Evidence of Disease, Argentina. *Emerg Infect Dis.* Vol. 9, No 12: 1558-1562.

SANTOS, FC; AMATO N, V; GAKIYA, E; ET AL.2003. Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*45:41-42.

SCHMUÑIS, GABRIEL A; SZARFMAN, A; VATTUONE, N. 1972. Direct Agglutination Test in the Detection of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies in Mice. *J Parasitol.* Vol. 58, No. 5, p. 1006-1007.

TANOWITZ, H; KIRCHHOFF, L; SIMON, S; MORRIS, S; WEISS, L; WITFNER; M. 1992. Chagas` Disease. *Clin Microbiol Rev.* Vol 5, No 4, p. 400-419.

VATTUONE, N.H.; YANOVSKY J.F.1971. *Trypanosoma cruzi*: Agglutination Activity of Enzyme-Treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.* Vol. 30, p. 349-355.

VATTUONE, N.H; PESCE, U.J. 1971. Evaluación de un antígeno de aglutinación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chileno de Parasitología.* Vol 26, p. 7-10

VILLALOBOS, R. 2007. Reaparición de Enfermedades Tropicales. *Kasmera*, vol.35,no.2,p. 89-90.

YAEGER, R G. 1988. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in armadillos collected at a site near New Orleans, Louisiana. *Am. J. Med. Hyg.*Vol 38(2), p. 323-326.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2000. Chagas Disease Interrupted in Chile. *TDR. News* 61:10.

Anexo 1

Preparación Medio de cultivo Diamond para epimastigotes de *T. cruzi* (Prat., 2006)

	Para 4 litros	Para 1 litro
Triptosa (6.25)	25 grs	6.25 grs
Triptona (trypticase, tryptic soy)	25 grs	6.25 grs
Extracto de levadura (yeast extract)	25 grs	6.25 grs
NaCl (6.25 gr/lit)	25 grs	6.25 grs
K ₂ HP ₄	16.25grs	4.0625 grs
KH ₂ PO ₄	16 .25 grs	4.0625 grs
Glucosa	10 grs	2.5 grs

Los reactivos se disuelven en 4lt (1lt) de agua destilada. La solución se debe ajustar a pH 7,2 y posteriormente ser guardada y mantenida a -20°C en botella de vidrio. Al momento de su uso, se descongela y el medio es distribuido en botellas individuales (80 ml en cada una). Se coloca una pitilla en la boca de la botella y luego se cierra parcialmente con un tapón de goma (para aliviar la presión) y se llevan a autoclave a 121°C por 20 minutos para su esterilización. La botella con el medio original (medio de cultivo stock) se vuelve a congelar a -20°C. Después de retirar las botellas del autoclave se recomienda dejarlas a temperatura ambiente unos 3 o 4 días para evidenciar alguna posible contaminación. Si esto no ocurre, se suplementa cada botella con suero fetal bovino estéril en una proporción del 10% de su contenido (8 ml). Se agrega hemina a una concentración final de 4µM (Hemina 3ml = 4µM (micro)) y también antibióticos, en este caso penicilina (10.000 U.I.por ml) y estreptomycin (10µg por ml).

Una vez suplementadas, las botellas se dejan bajo observación unos 4 - 5 días a 27°C para verificar que no haya contaminación bacteriana o fúngica. Después de este período se procede a inocular cada botella con 3 ml de solución parasitaria (concentrado de

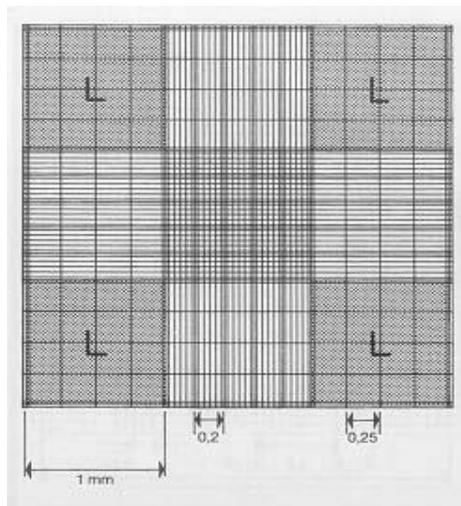
epimastigotes) y se mantienen a 27°C. La temperatura es crítica, sobre todo cuando se trata de temperaturas sobre 30°C ya que los epimastigotes son muy sensibles a temperaturas extremas. Es recomendable cosechar los parásitos al 5 -7 día de cultivo, momento en el que alcanzan su máximo de multiplicación. Si se retrasa este período (10 días o más) se corre el riesgo de que los parásitos mueran. La cosecha se realiza en campana estéril. Para ello se utiliza una jeringa de 20ml y se pasa la aguja a través del tapón de goma. Se toma la precaución de esterilizar con mechero y aplicar unas gotas de alcohol la parte superior del tapón, así como también la aguja cada vez que entra y sale a través de él. Una vez que se extrae todo el medio de cultivo, se dispone en tubos Falcon y se centrifugan por 15 minutos a 10.000 g. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se re suspende en PBS pH 7.2 con tripsina. Para esto se preparó una solución que contiene 4 g de tripsina por litro en PBS pH 7.2. Veinte volúmenes de esta solución fueron mezclados con un volumen de antígeno (sedimentados a 10.000 g por 15 minutos). Esta suspensión fue incubada a 37°C por 45 minutos. El tratamiento con tripsina se hace para aumentar la sensibilidad del test y para disminuir la probabilidad de autoaglutinación. Después del tratamiento con la enzima los parásitos fueron lavados con PBS pH 7,2, cuatro o cinco veces, sedimentados a 10.000 g por 15 minutos, y re suspendidos a razón de 3 grs de peso húmedo por 100 ml de PBS pH 7,2. Esta suspensión fue fijada en una dilución de formaldehído al 1% idealmente por toda la noche (Vattuone y Yanovsky., 1971).

Para determinar la concentración de parásitos se utiliza la cámara de Neubauer. La dilución de la solución stock usada como antígeno debería ser de aproximadamente 6×10^8 parásitos por μl . Este antígeno se guarda a 4°C y se puede mantener en buenas condiciones por hasta 3 meses.

Anexo 2

Protocolo para contar formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* en cámara de Neubauer (Arredondo y Voltolina, 2007)

- Tomar 10 μ l de la suspensión de parásitos (cultivo epimastigotes) y cargar cámara de Neubauer en la cuadrícula superior o inferior para evaluar viabilidad y estimar número aproximado de formas celulares. Observar en objetivo 10x (microscopio óptico)
- Si las células están muy concentradas, realizar dilución estimada (ej: células incontables, diluir al menos 10 veces). Cuidar de homogeneizar adecuadamente la suspensión inicial.
- Cargar nuevamente la cámara de Neubauer en la cuadrícula superior o inferior con la solución diluida. Observar en objetivo 10x (microscopio óptico)
- Contar la cantidad de parásitos en cada una de las 4 esquinas (Como se ve en la figura, se recomienda contar los parásitos que estén en las zonas marcadas con L).



Una vez hecho el conteo y habiendo sumado los parásitos de estas 4 áreas, se aplica la siguiente fórmula para obtener la cantidad de parásitos por ml:

$$\text{Concentración en la suspensión (células / ml)} = 10000 (x/4)$$

$$\text{células/ml} = 10000 \times (\text{células contadas}/4)$$

ANEXO 3

Protocolo de la reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas (Astorga *et al.*, 1988)

Preparación del material

1. Placas: Se disponen los vidrios portaobjetos y se pinta en la superficie de cada uno 8 círculos con pintura y/o esmalte. Una vez pintadas, las placas se incuban en estufa a 100°C por 20 minutos y luego se conservan en freezer a -20°C (las placas se guardan enfrentadas y envueltas en papel de aluminio). Los pocillos superiores e inferiores corresponden a dos pacientes, respectivamente.
2. Antígeno figurado de *T. cruzi*: Se retiran las placas del freezer y se incuban a temperatura ambiente. La solución parasitaria consta de formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, que han sido cultivadas en medio Diamond suplementado con 5% de SFB e incubadas a 28°C. La cosecha se realiza durante la fase exponencial de crecimiento de los parásitos por centrifugación a 500G por 10 min a 4°C. Las formas parasitarias son fijadas con PBS pH 7,2-formalina 1%. Se debe estandarizar la solución antigénica con PBS pH 7,2 para un máximo de 50 formas epimastigotes por campo 40x (microscopio óptico). Con ayuda de una micropipeta colocar en cada pocillo 25µl de solución parasitaria. Dejar decantar por 2 a 4 minutos. Retirar el exceso de cada pocillo (aprox. 15µl). Conservar las placas enfrentadas unas con otras y envueltas en papel aluminio a -20°C.
3. Buffer fosfato salino pH 7.2:

Buffer fosfato de potasio: para un litro de buffer se necesitan 20,41 gr de fosfato de potasio. Llevar a 1000 ml con agua destilada (1M:136,09 gr en 1000 ml de agua destilada)

Buffer fosfato de sodio: para un litro de agua se necesitan 21,3 gr de fosfato de sodio. Llevar a 1000 ml con agua destilada (1M: 124,63 gr en 1000 de agua destilada)

Buffer fosfato salino pH 7,2 (PBS): Se mezclan 8,4 gr de NaCl + 28 ml de K₂PO₄ + 72 ml de NA₂HPO y 900 ml de agua destilada. Mezclar durante 15 minutos en agitador magnético, traspasar a recipiente y etiquetar.

4. Inactivación y dilución de los sueros: Para la inactivación se incuban los tubos que contienen el suero a 57°C durante 30 minutos a baño María para inactivar el sistema del complemento. Para las diluciones, se colocan 450µl de PBS pH 7.2 en el primer tubo (dilución 1/10) y en los cuatro tubos restantes (diluciones 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) 250 µl de PBS pH 7,2. Colocar 50 µl de suero inactivado en el tubo dilución 1/10 y homogeneizar bien con ayuda de una micropipeta; de este tubo tomar 250µl y diluirlo en el tubo con la asignación 1/20 mezclando bien, y repetir el proceso hasta llegar al tubo que corresponde a la dilución 1/160, que quedará con un volumen final de 500µl. Es muy importante en este proceso la homogeneización de las soluciones, con el fin de que los anticuerpos presentes en el suero estén adecuadamente diluidos.

Reacción de IFI

Colocar las placas previamente cargadas con las diluciones de suero (cada dilución de suero se deposita en un círculo) en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos. Se retiran las placas y se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS pH 7.2. Secar a temperatura ambiente hasta que todos los pocillos de las placas estén completamente secos (se puede ayudar con ventilador frío). Una vez secas, colocar 15µl de solución de conjugado para IFI, previamente estandarizado, en cada pocillo (conjugado: 1800µl de PBS pH 7,2; 300µl de azul de evans y 2,5µl de conjugado Fluoline G). Las placas son nuevamente incubadas en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos más. Se retiran y se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS pH 7,2 y luego otro lavado durante 30 minutos con agua destilada. Se dejan a temperatura ambiente hasta que se sequen por completo. Una vez secas, agregar 8µl de glicerina tamponada 1:1 con PBS pH 7,2, previamente homogeneizada, a cada pocillo. Se cubren los pocillos con cubreobjetos y las placas se leen al microscopio de fluorescencia con objetivo 40x. Se considera como una reacción negativa a formas epimastigotes de *T. cruzi* no fluorescentes. Se puede observar un campo verde opaco con leves tintes rojos. Por el contrario, una reacción es positiva cuando se ven epimastigotes fluorescentes (color verde) en su membrana y/o citoplasma.

ANEXO 4

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Este es un resumen de los requisitos basados en el Manual de Normas de bioseguridad Fondecyt-Conecyt. Se incorporan aquellos puntos relacionados con el trabajo que se realizará en la tesis.

Bioseguridad en el manejo de animales de experimentación

Los animales de experimentación se definen como todos aquellos metazoarios (animales multicelulares) que serán albergados en recintos de investigación, temporal o permanentemente y abarca especies tanto de crianza específica para fines de investigación como aquellas obtenidas desde el ambiente natural. Existen normas específicas para distintos tipos de animales y en relación a Bioseguridad, se distinguen respecto a su posible riesgo para la salud humana, para la agricultura y para el medio ambiente.

El uso de animales de experimentación, obliga a las instituciones donde se usan estos recursos a facilitar el establecimiento de prácticas que permitan garantizar razonablemente los niveles de seguridad, calidad y cuidado, así como el bienestar físico y psicológico de los animales cuando se trata de organismos vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Del mismo modo, el laboratorio que alberga a los animales de experimentación deberá poseer una infraestructura y ubicación apropiada en el sistema de laboratorios.

Los niveles de seguridad requeridos son expresados por las facilidades necesarias en las prácticas y operaciones deberán ser comparables, tanto si se trata de agentes infecciosos *in vivo* como *in vitro*.

Idealmente, el laboratorio que utiliza animales de experimentación destinados a estudios de enfermedades infecciosas o no, deberá estar físicamente separado de los que realicen otro tipo de actividades, tales como producción de animales, cuarentena, o uso de ellos sin material infeccioso.

Estos laboratorios se construirán con “áreas limpias” y “áreas sucias” para reducir el peligro de contaminación cruzada y facilitar su limpieza. Existen diferentes niveles para la realización de las prácticas de seguridad en los equipos y facilidad para experimentar con

animales y agentes sobre los cuales se conoce o no, que puedan producir infecciones en el hombre. Estos niveles de seguridad para el manejo de animales de laboratorio proveen las recomendaciones mínimas para el desenvolvimiento de los trabajos.

En general estos niveles se refieren principalmente al trabajo con mamíferos, ya que representan la principal fuente de riesgo biológico para el investigador y la comunidad. Sin embargo, otras especies pueden presentar riesgos similares (como aves) por lo que medidas de contención y resguardo deben implementarse de una manera similar a la aquí descrita.

1. Recomendaciones generales

- Las puertas de acceso a la pieza de los animales, que se abrirán hacia adentro, tendrán cada una un sistema de cierre automático y deberán permanecer cerradas cuando los animales de experimentación estén en ellas.
- La superficie de trabajo deberá descontaminarse antes y después de utilizar material viable.
- No estará permitido comer, beber, fumar o guardar comida para uso humano, en las salas de animales en experimentación.
- El personal deberá lavarse las manos después de trabajar con los cultivos y los animales y antes de abandonar la sala de inoculaciones.
- Todos los pasos deberán realizarse cuidadosamente con el fin de minimizar la producción de aerosoles.

2. Prácticas especiales

- Retirar la cama de las cajas con el máximo cuidado para evitar la formación de aerosoles.
- Las cajas serán lavadas manualmente o con máquina. La temperatura final del agua de enjuague deberá ser de 82,2 °C.
- La ropa de trabajo tal como guardapolvos, batas o gorros, se deberá guardar en una pieza especial. El personal se vestirá con las mismas antes de entrar en las salas de inoculaciones. Es recomendable utilizar estas ropas dentro del área de trabajo y no en otras.
- Las cajas serán descontaminadas especialmente por autoclave antes de su limpieza o lavado.
- Se deberá proveer de máscaras de cirugía a todo el personal.

- Deberá utilizarse dentro de las salas de inoculaciones el vestuario protector, y se deberá retirar únicamente después de haberse completado las tareas.
 - Se deberá tener especial cuidado para evitar la contaminación de la piel con el agente infeccioso, se deberán usar guantes cuando el contacto sea inevitable.
 - Todos los desperdicios de la sala serán apropiadamente descontaminados preferiblemente mediante autoclave, antes de descartarse. Las carcacas de los animales infectados serán incineradas y transportadas las cajas convenientemente cerradas.
 - Se utilizarán unidades de agujas y jeringas desechables, para la inyección o aspiración de fluidos infecciosos. Una vez utilizadas, se descontaminarán por autoclave, antes de eliminarlas.
 - La limpieza de los pisos de la sala deberá realizarse con un trapo embebido en la solución desinfectante apropiada.
 - Las muestras de suero consideradas como de riesgo para el personal, serán apropiadamente recolectadas y convenientemente guardadas.
 - Si es necesario disponer de muestras adicionales, la extracción se realizará en forma periódica, de acuerdo a las facilidades de trabajo.
 - La o las salas para el manejo de animales de este nivel, deben estar dotadas de los equipos que permitan cumplir adecuadamente lo dispuesto en cada uno de los puntos descritos.
3. Contenedores especiales. No se requieren equipos de contenedores especiales, cuando se usan animales de un nivel BS-1.
4. Instalaciones para los animales
- El animal estará en una jaula, diseñada y construida para favorecer su limpieza y alojamiento.
 - Se deberá poseer lavatorios para el lavado de manos.
 - Cuando sea necesario que las ventanas de las salas permanezcan abiertas, éstas deberán estar resguardadas con una tela metálica.

- Es recomendable que la dirección del flujo de aire sea interna, y que el proceso para eliminar el aire se realice sin que haya recirculación dentro de las habitaciones
- Para descontaminar el material infeccioso, se debe instalar una autoclave en el edificio donde se encuentran los animales inoculados.

Cuando se trabaja en experimentos con animales de laboratorio existen dos fuentes de peligro:

- Enfermedades que se transmiten al hombre y que fueron natural o experimentalmente adquiridas.
- El material infeccioso utilizado en el desarrollo de la experiencia.

En el primer caso, la colonia de animales excreta el agente infeccioso por heces, orina, saliva, aire expirado y la transmisión es posible cuando se sostiene el animal, en las inhalaciones, en la limpieza de las cajas, en el contacto con la sangre y tejidos durante la necropsia.

Por ello, deberán seguirse las siguientes prácticas higiénicas y de control en el manejo de los mismos

Cuando se produzcan heridas:

- Se deberá lavar con abundante agua y jabón.
- Se recibirá inmediata asistencia médica, y se aplicará sobre la zona de la lesión, una solución de antiséptico.
- El animal que ha producido la lesión, deberá ser identificado, anestesiado y examinado.

Anexo 5



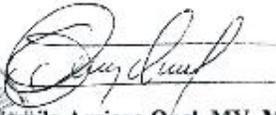
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE
INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación, titulado: "*Evolución molecular conjunta entre tripanosoma y sus distintos hospederos en Chile*" cuyo investigador responsable es el **Dr. Aldo Solari Illescas** no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA # 064 FMUCH).

El Dr. Solari se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure el proyecto presentado al concurso FONDECYT 2004.


Dr. Camilo Arriaza Onel. MV, M.Sc.
Presidente

Santiago, 12 de Agosto de 2003