



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
INFECCIÓN POR Trypanosoma cruzi
(Modalidad: Tesis de Grado)

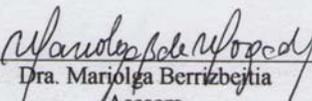
NAIROBIS JOHANA SEIJAS RODRÍGUEZ

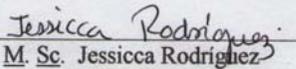
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

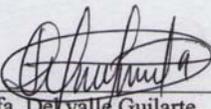
CUMANÁ, 2012

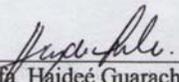
DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR Trypanosoma cruzi

APROBADO POR:


Dra. Mariólgua Berrizbeitia
Asesora


M. Sc. Jessica Rodríguez
Co- asesora


Profª. Del valle Guilarte
Jurado principal


Profª. Haidee Guarache
Jurado principal

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Obtención de la cepa de T. cruzi.....	8
Muestras	8
Producción de los cultivos axénicos de la forma epimastigote de T. cruzi, cepa AU.....	9
Fijación de las formas epimastigotes de T. cruzi	9
Estandarización de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	9
Láminas portadoras de antígeno T. cruzi	10
Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	11
Selección de los mejores parámetros de estandarización y validación para la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	11
Lectura	12
Determinación de la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	12
Validación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	13
Muestras utilizadas en la validación	13
Elución de los anticuerpos de los confetis de sangre seca	14
Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	15
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	34

BIBLIOGRAFÍA	35
HOJA DE METADATOS	56

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Mariolga Berrizbeitia, por transmitir sus conocimientos y compartir sus experiencias y parte de su tiempo conmigo, lo que contribuyó al enriquecimiento, elaboración y culminación de este trabajo de investigación.

A la Profa. Jessica Rodríguez, por su apoyo, conocimiento, asesoría en la parte experimental de mi tesis, además de su amistad y cariño.

A todos los investigadores y profesores del Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre: Antonio Maldonado, Luz Bettina Villalobos, Jesús Bastardo, Mayelis González y a la Sra. Luz Coronado, por su amistad y apoyo.

A los investigadores del Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, de la Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Profa. Alicia Jorquera, Profa. Arleth Pozo y a Leomerys Romero por su apoyo y colaboración en la parte experimental de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi Padre celestial, por darme la guía en todo momento de mi vida, por todo el amor y las bendiciones que recibo de él.

A mis padres, Blas Seijas y Juana Rodríguez de Seijas, por su amor, su apoyo y colaboración incondicional en cada momento de mi vida.

A todos mis hermanos y sobrinos, en especial Abigail Seijas, Gregory Seijas, Karina Seijas y Wendys Millán por su paciencia, comprensión y apoyo.

A todos mis hermanos en Cristo, en especial a la Sra. Eneida Rivas y María Figuera, quienes me guiaron a la luz de la Palabra e impulsaron al logro de esta meta.

A mi hermana Katuska Seijas, quien en vida siempre supo darme su amor y un consejo a tiempo.

A todas mis amigas, especialmente Yolimar Gámez, Karla Marín, Lianesa Marcano, Juneidy Aguilera, Aurines Molero y Yuli Rodríguez, con quienes compartí momentos especiales, por su gran apoyo durante todos los años de mi formación profesional.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi, utilizando sueros de referencia	24
Tabla 2. Detección de individuos seropositivos a la infección por T. cruzi en Río Brito, estado Sucre, utilizando epimastigotes fijados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta y ELISA.....	26
Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la infección por T. cruzi en la población de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos confirmados con serología positiva para la infección por T. cruzi (muestra 51 a 56).....	19
Figura 2. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos confirmados con serología negativa para la infección por T. cruzi (muestras 7-12).....	20
Figura 3. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología positiva para la infección por Leishmania sp. (muestras 107-112)	22

RESUMEN

Se desarrolló y validó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando epimastigotes fijados para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi. La producción de la forma epimastigote de T. cruzi (aislado AU) se realizó en el medio de cultivo de infusión de hígado y triptosa, la colecta de los parásitos se efectuó durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial y se procedió a fijar los parásitos con formaldehído al 2%. Para la estandarización de esta prueba se usaron 49 muestras de sueros confirmados como positivos y 50 negativos para la infección por T. cruzi por tres técnicas serológicas diferentes (ELISA, hemaglutinación indirecta, e IFI). Adicionalmente, para evaluar reacciones cruzadas de la prueba IFI se analizaron 14 sueros provenientes de pacientes confirmados clínica y serológicamente con leishmaniasis cutánea. Se tituló la dilución del antígeno (1:8, 1:16, 1:32), del suero de los pacientes (1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) y del conjugado (1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Asimismo, para la validación de esta técnica, se usaron 50 muestras de sangre en papel filtro, provenientes de la comunidad de Rio Brito, estado Sucre. Igualmente, se evaluaron las muestras de esta comunidad rural por un ELISA casero utilizando epimastigotes fijados. La IFI estandarizada mostró valores de sensibilidad 100% y especificidad superior al 92%, lo que demuestra su utilidad como herramienta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi. La seroprevalencia de la infección por T. cruzi por ambas técnicas IFI/ELISA fue alta (16%). Igualmente, se encontró asociación estadística significativa entre la infección por T. cruzi y el reconocimiento del vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas. La utilización de una prueba de IFI estandarizada no ha sido descrita previamente en los laboratorios del estado Sucre, que sólo cuentan con pruebas comerciales tipo ELISA para diagnosticar la infección por T. cruzi, lo cual proporciona una nueva herramienta para el diagnóstico de esta parasitosis.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria causada por el hemoflagelado Trypanosoma cruzi, el cual es transmitido al hombre y a otros mamíferos, principalmente por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (OPS, 1982; Herrera, 2010). Este parásito, pertenece al orden kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae, fue descrito por primera vez en Brasil en 1909 por el Dr. Carlos Chagas, y posteriormente fue señalado en Venezuela por el Dr. Enrique Tejera Guevara en 1919 (Chacín y cols., 2007; Feliciangeli, 2009).

La enfermedad de Chagas es exclusiva del continente americano; se estima que entre 18 a 20 millones de personas están infectadas, 100 millones están en riesgo y 50 000 mueren cada año por la infección. Existe transmisión local de esta enfermedad en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú y Venezuela. Asimismo, debido a la migración de latinoamericanos, el número de casos de esta enfermedad ha aumentado en Europa y los Estados Unidos de América, lo cual plantea riesgos adicionales de transmisión a través de las transfusiones de sangre y de trasplantes de órganos (Behrend y cols., 2002; Salvatella y Schofield, 2006; Lorca y cols., 2008).

En Venezuela, la enfermedad de Chagas se considera como un problema de riesgo para aproximadamente 6 millones de personas, que viven en 198 municipios de 14 entidades federales. Incluye, entre los estados más afectados, Trujillo, Lara y Portuguesa y en menor número a los estados Anzoátegui, Monagas, Sucre y Zulia, siendo Rhodnius prolixus el principal vector intradomiciliario (Ramírez y cols., 2004; Peña y cols., 2009).

T. cruzi se caracteriza por presentar un flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual está situada el kinetoplasto, con ADN especializado. Los seres humanos se

infectan cuando las heces del insecto que contienen tripomastigotes metacíclicos penetran en la piel a través de la herida causada por la picadura del triatomino o cuando la conjuntiva, membranas mucosas o abrasiones se contaminan con el parásito (Rea y cols, 2006). Las formas tripomastigotes invaden una diversidad de células y se diferencian en amastigotes, que se multiplican en los macrófagos y, posteriormente, se transforman en tripomastigotes, que circulan en la sangre periférica (López-Antuñano y cols., 2000; Da Rocha y cols., 2009).

El período de incubación de la infección por T. cruzi es de 5 a 10 días y generalmente avanza hasta las fases aguda y crónica de la enfermedad. La fase aguda ocurre más a menudo en los primeros años de vida, dura de 1 a 3 meses y se presentan síntomas como fiebre moderada, síndrome oftalmoglandular (signo de Romaña), hepatoesplenomegalia y leucocitosis moderada (OPS, 1982; Chacín y cols., 2007). La fase crónica se manifiesta de 10 a 15 años después de la infección, y se caracteriza por lesiones cardíacas que se desarrollan lentamente. Hay un periodo indeterminado o asintomático que se detecta por reactividad serológica, pero no hay alteraciones en el electrocardiograma, ecocardiograma y radiografía de tórax (Botero y Restrepo, 2003).

La transmisión natural de T. cruzi en la que interviene el vector se puede presentar en tres ciclos: doméstico, donde el vector infesta exclusivamente la vivienda humana; peridoméstico, donde la transmisión se mantienen alrededor de las mismas y enzoonótico que se da alejado de asentamientos humanos y sólo participan reservorios silvestres y ecotopos naturales (Molina-Garza y cols., 2007).

Otro mecanismo de transmisión, el transfusional, es posible debido al hecho de que los tripomastigotes pueden vivir en la sangre citratada y a temperatura ambiente por 200 días o más; entre 14,00 a 20,00 % de la sangre contaminada transfundida es capaz de infectar al receptor (Chacín y cols., 2007).

Tiempo después de su descubrimiento, se sugirió que la transmisión del parásito de la madre al feto podía estar ocurriendo congénitamente o a través de la leche materna. En 1949 Dao observó, por primera vez en Venezuela, T. cruzi en sangre periférica de un niño recién nacido de una madre chagásica, y desde entonces, se han publicado numerosos casos en diferentes países de América Latina, donde la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas oscila entre 2,00 y 51,00 % en centros urbanos y de 23,00 a 81,00 % en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas (Muñoz y Gascón, 2005).

Se ha determinado la participación de los seres humanos en el transporte y movilización de los vectores hacia nuevas condiciones ambientales, dada por la interacción que existe entre zonas rurales y urbanas, lo cual ha favorecido la transmisión de esta enfermedad por vía oral (Briceño-León, 2009).

En Venezuela, Alarcón y cols. (2009) reportaron casos de transmisión oral de T. cruzi, a través de la ingesta de bebidas contaminadas con deyecciones o por licuar triatomíneos infectados durante el proceso de preparación de jugos; ésto, aunado al hecho de la domiciliación del vector, está facilitando la adaptación del ciclo biológico de este parásito al medio urbano, por lo que se requiere implementar nuevas estrategias de control.

La epidemiología de esta enfermedad está determinada por muchos factores sociales y sus diferentes formas de transmisión, es por ello que se han establecido estrategias del uso de la serología en las acciones del control de la transmisión para investigar personas relacionadas con casos agudos, lo que contribuye a la detección precoz del paciente infectado y la aplicación oportuna del tratamiento (Sosa-Estani, 2001).

En países latinoamericanos, ya para el año 1960, se habían reportado casos de esta enfermedad, y la primera reunión del comité de expertos de la organización mundial

de la salud (OMS), estimó que la prevalencia global era de 7 millones con un aproximado de 35 millones de personas en riesgo. Posteriormente, estas estimaciones presentaron un alza a un ritmo constante de 10 millones para 1976, 20 millones para 1981, hasta alcanzar un pico de 24 millones de personas consideradas infectadas a mediados de 1980. A partir de ese año y con la implementación de la serología, se llegó a la cifra que se maneja actualmente de 16-18 millones de personas infectadas y de 90-100 millones a riesgo de adquirir la infección (Imbert y cols., 2003; Salvatella y Schofield, 2006).

En Venezuela, la campaña de control de la enfermedad de Chagas iniciada hace 50 años, modificó significativamente su expresión epidemiológica y clínica en el país. Elementos como: presencia del parásito, vectores, reservorios domésticos y medio ambiente, constituyen factores importantes en la transmisión y mantenimiento de esta enfermedad (Acquatella, 2003).

Con la aplicación de insecticidas y el mejoramiento de las viviendas, se logró disminuir su prevalencia de alrededor de 45,00% en 1950 a menos del 10,00% en 1990. Los estados con mayores tasas de prevalencia para el período 1992-2000 eran Carabobo (35,70%), Lara (15,80%), Anzoátegui (9,90%), Portuguesa (9,70%), Táchira (9,50%) y Cojedes (8,90%) (Sandoval y cols., 2003; Urbina, 2005; Aché y cols., 2008).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la etapa de la enfermedad; aunque la infección por T. cruzi estimula la producción de anticuerpos en la persona, su concentración es baja durante la fase aguda, y el diagnóstico se basa en la confirmación de los parásitos presentes en la sangre al microscopio (López-Antuñano y cols., 2000).

Durante la fase aguda, se emplean métodos parasitológicos directos (examen al

fresco) e indirectos, como el hemocultivo y el xenodiagnóstico, este último introducido por Torrealba en el año 1930, valorándose por primera vez su utilidad como herramienta diagnóstica para estudios epidemiológicos; sin embargo estos métodos son poco usados por ser laboriosos (Añez y cols., 2003). En la fase indeterminada y crónica, debido a que la parasitemia disminuye, el diagnóstico se basa en el uso de la serología, mediante el empleo de pruebas estandarizadas que permitan demostrar la presencia de anticuerpos anti-T. cruzi, técnicas tales como hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Chandler y Watts, 1988; Palacios y cols., 2000; De Lima y cols., 2007).

El uso de estas técnicas se remonta a 1913, cuando Guerreiro y Machado describieron la prueba de fijación de complemento, la cual fue sustituida posteriormente por la IFI (Fife y Muschel, 1959; Da Rocha y cols., 2009). Romaña en 1961 introduce la prueba de HAI. Tiempo después, se inició el uso del ensayo ELISA, el cual es actualmente la prueba serológica más utilizada, debido a que tiene la ventaja que numerosas muestras pueden ser analizadas al mismo tiempo (Romaña, 1961; Voller y cols., 1975).

Las aplicaciones actuales en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas están dirigidas principalmente a controlar y evitar su transmisión, apoyando el diagnóstico clínico para la identificación de paciente con infección reciente, para ello se deben seleccionar las pruebas más idóneas considerando su sensibilidad, especificidad y facilidad operativa (Losada y cols., 2000; Ponce, 2003; Salazar y cols., 2007).

Leiby y cols. (2000) compararon el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) con pruebas comerciales de IFI, HAI y diferentes ELISA. En este estudio se demostró que la positividad varió considerablemente entre las pruebas evaluadas. A títulos bajos (1:20) en la IFI, sólo el RIPA y un ELISA comercial (Organon) identificaron

muestras positivas. Asimismo, a títulos mayores para la IFI, la mayoría de las pruebas identificaron las muestras positivas; sin embargo, algunas pruebas de ELISA comercial (Abbott y Embrabio) fueron menos sensibles que IFI y RIPA.

Enciso y cols. (2004) compararon las pruebas de IFI y ELISA, las cuales utilizan como antígenos cepas colombianas, con la prueba comercial Chagatek® (Organon, Teknica), la cual utiliza como antígeno preparaciones obtenidas a partir de cepas extranjeras del parásito y llegaron a la conclusión que existía muchas discrepancias en cuanto a los resultados obtenidos; en este estudio se demostró que la procedencia geográfica, el origen de las cepas, el estadio del parásito que se usa como antígeno, así como la preparación del mismo, son de vital importancia para lograr una elevada concordancia y disminuir en lo posible los falsos positivos de las pruebas utilizadas.

Berrizbeitia y cols. (2006) utilizaron la IFI y HAI como pruebas confirmatorias, para evaluar la sensibilidad y especificidad de una prueba de ELISA utilizando diferentes antígenos de T. cruzi (formas fijadas de tripomastigotes, epimastigotes y antígenos de excreción-secreción de las formas tripomastigotes), en este estudio se demostró que no existe una concordancia del 100,00% entre los métodos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Más recientemente, se inició el uso de métodos moleculares de diagnóstico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Moreno-Medina y cols., 2007). Técnicas como la lisis mediada por complemento son menos empleadas, porque requieren el uso de parásitos vivos, lo cual es riesgoso para el trabajo de rutina, y sus resultados han tenido problemas similares a las técnicas convencionales (Beltrán y cols., 2003).

Para confirmar el diagnóstico de la infección por T. cruzi, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda el uso de dos pruebas serológicas diferentes, la positividad de una sola de estas pruebas no constituye un criterio de

diagnóstico suficiente; así mismo, establece que se debe tomar en consideración los antígenos usados y el tipo de anticuerpo que se quiere demostrar (Cura y cols., 1994; Salazar y Marín, 2006; Hoyos y cols., 2007).

En el estado Sucre, son pocos los laboratorios que utilizan una segunda prueba confirmatoria para el diagnóstico de la infección por T. cruzi como lo recomienda la OPS, y no se cuenta con un laboratorio que realice la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Actualmente, en el Laboratorio de Diagnóstico Serológico de Enfermedades Infecciosas (UDO-Sucre) se utiliza la técnica de ELISA empleando distintos antígenos: epimastigotes fijados y antígenos de excreción/secreción de las formas tripomastigotes de T. cruzi. Por todo lo anteriormente expuesto, se hizo prioritario desarrollar y validar una prueba de inmunofluorescencia indirecta utilizando estos antígenos autóctonos (epimastigotes fijados) para lograr un diagnóstico eficaz de la infección producida por este microorganismo.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LA CEPA DE T. CRUZI

Como material biológico para este estudio, se utilizaron formas epimastigotes de T. cruzi de la cepa AU, esta cepa es perpetuada en el Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS, UDO), mediante pasajes mensuales en cuñas de agar sangre, y luego adaptadas al medio de cultivo axénico. El aislado parasitario fue obtenido de un paciente chagásico agudo, en el Centro de Medicina Tropical (UDO, Núcleo de Anzoátegui), por xenodiagnóstico artificial y pasajes a ratones hembras de la cepa NMRI, y fue compatible con los referentes moleculares por PCR para T. cruzi del linaje TcI (Morocoima y cols., 2008).

MUESTRAS

Para la estandarización de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, se utilizaron controles positivos y negativos de una mezcla de sueros de individuos confirmados con infección por T. cruzi por tres técnicas serológicas diferentes (inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA) donados por el Laboratorio de Inmunodiagnóstico de Chagas (LIDCH) (Maracay, Venezuela), y los mismos se encuentran almacenados en el Laboratorio de Diagnóstico Serológico en Enfermedades Infecciosas, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente. Para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la prueba de IFI, se usaron sueros confirmados como positivos (n=49) y negativos (n=50) para la infección por T. cruzi, éstos fueron analizados igualmente por tres técnicas serológicas diferentes (inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta, ELISA). De igual manera, se analizaron sueros provenientes de pacientes confirmados clínica y serológicamente con leishmaniasis cutánea (n=10), debido a que Leishmania sp. productora de esta enfermedad comparte antígenos de superficies con T. cruzi, lo que puede originar reacciones cruzadas en las pruebas serológicas.

PRODUCCIÓN DE LOS CULTIVOS AXÉNICOS DE LA FORMA EPIMASTIGOTE DE T. CRUZI, CEPA AU

Las formas epimastigotes de T. cruzi de la cepa AU, se cultivaron in vitro, a 27°C, en frascos para cultivo celular, empleando para ello medio de cultivo de infusión de hígado y triptosa (del inglés: Liver Infusion Tryptose, LIT) (Difco ®) (20 g), triptosa (5 g), NaCl (4 g), KCl (0,4 g), Na₂HPO₄ (8 g) y dextrosa (2 g) en un litro de agua destilada a pH 7,4 esterilizado sólo por filtración, utilizando membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm (Millipore®) y suplementado con 10,00% de suero fetal bovino, 1,00% de penicilina/estreptomicina y 25,00 mg de hemina disuelta en una mezcla v/v de agua destilada y trietanolamina. La colecta se realizó durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial (aproximadamente al séptimo día de cultivo) (Berrizbeitia y cols., 2004).

FIJACIÓN DE LAS FORMAS EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

Los cultivos se trasvasaron a tubos Falcon (15,00 ml) y se lavaron tres veces por centrifugación a 850,00 g por 15 min, con 4 volúmenes de 1,00 mol.l⁻¹ de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2. Después de los lavados, los parásitos se fijaron con 2,00% de formaldehído por 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, los parásitos nuevamente se lavaron tres veces por centrifugación a 850,00 g por 15 min, con 4 volúmenes 1,00 mol.l⁻¹ de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 (Guhl y Nicholls, 2001).

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Para la estandarización de la prueba de inmunofluorescencia, se siguió el procedimiento descrito por Camargo (1966) con algunas modificaciones. Para ello, se tituló la dilución del antígeno, controles positivos y negativos, el conjugado y número de lavados. Esto con la finalidad de obtener la mejor discriminación entre la emisión de fluorescencia de una mezcla de sueros confirmados como positivos para infección

por T. cruzi con respecto a la mezcla de sueros confirmados como negativos (Guhl y Nicholls, 2001).

LÁMINAS PORTADORAS DE ANTÍGENO T. CRUZI

Las láminas portaobjeto que se utilizaron, se lavaron previamente en forma meticulosa con suficiente solución jabonosa, se enjuagaron con agua corriente, luego con abundante agua destilada. Posteriormente, se colocaron en una mezcla de alcohol-acetona por dos días y se pulieron con un paño para eliminar cualquier resto de grasa que pudiera existir. Se realizaron diluciones del antígeno 1/16, 1/32, 1/64 en PBS (pH 7,6) para la estandarización y diluciones del antígeno 1/4, 1/8, 1/16 para la validación con la finalidad de obtener la mejor dilución que permitiera observar aproximadamente de 30-40 parásitos por campo al microscopio óptico (Guhl y Nicholls, 2001).

Una vez desgrasadas las láminas, se procedió a marcarlas, haciendo una cuadrícula para colocar el antígeno de T. cruzi y éste, se repartió a la dilución determinada en el paso anterior en forma alterna, es decir, dejando una cuadrícula sin antígeno, con la finalidad de evitar en lo posible la mezcla de diluciones (Apéndice 1).

La suspensión antigénica se agitó constantemente para evitar la sedimentación de los parásitos y se distribuyó la cantidad de 10-15 µl por cuadrícula con pipetas automáticas. Posteriormente, las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente por 12 horas, y se procedió a fijar el antígeno con acetona fría, colocando las láminas en un envase de couplin, con acetona, hasta cubrirlas. El envase de couplin se colocó en la nevera por 10 min. Luego, las láminas se dejaron secar para proceder a cuadricularlas con esmalte de uña Lay Pro N° 13 ó 15, según el esquema que se adjunta (Apéndice 1) y con pipeta Pasteur. Cada cuadrado mide 0,7 mm x 0,7 mm y se hicieron paquetes de 6 láminas en papel toallín, envueltas a su vez en papel de

aluminio. Las láminas con los antígenos, se guardaron en congelación a -70°C hasta el momento de su uso.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

En tubos de microtitulación se realizaron diferentes diluciones seriadas del suero, tanto de los controles como las muestras, desde 1/16 hasta 1/512. Posteriormente, 50 μl de cada una de estas diluciones se transvasaron sobre el área de la cuadrícula correspondiente en las láminas portaobjeto previamente sensibilizada con el antígeno. Se colocaron las láminas en una cámara húmeda, y se llevó a incubar a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las láminas se lavaron dos o tres veces consecutivas con PBS pH 7,6. Seguidamente, se colocaron las láminas sobre papel secante y se secaron con la ayuda de un secador. Luego, se agregaron 50 μl de anti-IgG conjugada con fluoresceína (Sigma), a la dilución óptima en PBS (pH 7,6) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Luego, se retiraron las láminas de la estufa y se lavaron por dos o tres veces consecutivas con PBS pH 7,6. Posteriormente, se agregaron 50 μl de la solución diluida de azul de Evans (1:1000) en cada pocillo, y se dejó durante cinco minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron las láminas con agua destilada, empleando una piseta y se secaron con un secador. Se colocó una gota de glicerina tamponada y sobre ella una laminilla cubreobjetos y se conservaron en oscuridad, hasta la lectura (Guhl y Nicholls, 2001).

SELECCIÓN DE LOS MEJORES PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN PARA LA PRUEBA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Se realizó evaluación de la mezcla de los controles positivos y negativos, suero de los pacientes y de cada uno de los parámetros establecidos para la estandarización: dilución del antígeno (1/16), anticuerpo primario (1/32), anticuerpo secundario (1/32), número de lavados (2 lavados rápidos), dilución del azul de Evans (1/10). Se escogieron los parámetros que ofrecieron una mejor discriminación entre el control positivo y el negativo. Para estandarizar la prueba de IFI, se consideró como punto de

corte un título igual o mayor a 1/32 para definir la muestra como positiva (Guhl y Nicholls, 2001).

LECTURA

La lectura se realizó en un microscopio para fluorescencia marca Zeizz, utilizando un filtro banda azul de 470-490 nm y los parásitos fueron visualizados con objetivo de 20X. Primero, se revisaron los controles; en el control positivo se debería observar la superficie y el flagelo de los parásitos de un color verde manzana fluorescente y en el control negativo, se debería observar el parásito de color rojizo opaco, sin fluorescencia o completamente oscuro. Si los controles responden como tales, la corrida es válida y se continuará con la lectura de las muestras examinadas. De acuerdo con la intensidad o ausencia de fluorescencia que mostraban los tripanosomas se registraron las lecturas como:

Reactivo (+). Cuando la superficie o los bordes de los parásitos emiten fluorescencia de un color verde manzana.

No reactivo (-). Si los parásitos se observan opacos entre rojizos y marrones oscuros o sin ningún tipo de coloración.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se siguieron los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la cual recomienda el uso de dos pruebas serológicas diferentes para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*; la positividad de una sola de estas pruebas no constituye un criterio de diagnóstico suficiente (Salazar y Marín, 2006). Para ello, se estudiaron un total de 113 muestras de sueros, de las cuales: 49 correspondieron a individuos con infección chagásica

confirmada, 50 a individuos no infectados, estos sueros fueron procesados por tres técnicas serológicas diferentes: inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y un ELISA comercial y 10 sueros provenientes de pacientes clínicamente y /o serológicamente confirmados con leishmaniasis cutánea, donadas para este estudio por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela) para evaluar la reactividad cruzada. Asimismo, se utilizaron sueros de individuos con infección por Ascaris lumbricoides (n=1), Strongyloides stercoralis (n=1), Trichuris trichiura (n=1), e infección mixta por Ascaris lumbricoides y Trichuris trichiura (n=1).

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Muestras utilizadas en la validación

Para la validación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta se usaron 50 muestras de sangre recolectadas en papel filtro, provenientes de la comunidad rural de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre, las cuales han permanecido almacenadas en el Laboratorio de Diagnóstico Serológico en Enfermedades Infecciosas, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, durante un período de 4 años, y éstas pertenecen al banco de muestras del LDSEI. En su momento, estas muestras fueron tomadas siguiendo los lineamientos establecidos por la declaración de Helsinki y las normas internacionales para las investigaciones biomédicas en poblaciones humanas promulgadas por el Consejo de Organización Internacional de Ciencias Médicas (CIOMS), en el que se establece que, previo a la realización de la investigación, al paciente en cuestión se le debe informar, de los objetivos, métodos y procedimientos a utilizarse, la finalidad de la investigación y beneficio que puede traer, tanto individual como colectivo. De estar de acuerdo con lo propuesto, se procedía a formalizar su autorización por escrito para su participación en la investigación (Anexo 1) (CIOMS., 1993).

Además, se usaron las encuestas aplicadas los a 50 habitantes de la comunidad de Río Brito, estado Sucre, en el año 2008. Las variables tomadas en cuenta fueron reconocimiento del vector, presencia del vector (dentro y alrededor de las viviendas), condiciones de las viviendas (tipo de piso, paredes y techo), conocimiento de la enfermedad de Chagas, así como también se evaluó el ingreso familiar, grado de instrucción, ocupación actual y si los encuestados habían vivido durante los últimos 10 años en la misma comunidad.

Estas muestras de sangre fueron tomadas por medio de punción capilar, previa antisepsia con alcohol isopropílico, siguiendo el método descrito por Magnus y cols. (1989). Una gota de sangre proveniente del dedo se depositó sobre papel filtro Whatman N° 1 (cuadrículas de 4 x 4 cm). La parte inferior del papel filtro se puso en contacto con la gota de sangre, el papel se retiró después de algunos segundos, de manera de obtener una mancha de 1,0 a 1,5 cm de diámetro (confetis de sangre). Las muestras se dejaron secar a la sombra durante una hora. La exposición al sol provoca la desnaturalización y ulteriormente una elución incompleta de los anticuerpos. Las muestras se conservaron en recipientes conteniendo silica gel para prevenir la humedad y se cerraron herméticamente en bolsas plásticas. Se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

Elución de los anticuerpos de los confetis de sangre seca

Se recortaron los confetis de sangre seca (cuadrículas 4 x 4 cm de papel filtro) con la ayuda de un perforador, para obtener círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro. Los confetis recortados se depositaron en tubos para microcentrífuga conteniendo 0,1 ml del un tampón de fosfato salino (PBS pH 7,2) durante 60 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron en una centrifuga marca Labofugue I por 5 min a 3000 r.p.m. y el sobrenadante, el cual contenía los anticuerpos eluidos, se utilizaron para la realización de la prueba de inmunofluorescencia (Magnus y cols., 1989).

Prueba IFI de los anticuerpos eluidos de papel filtro de muestras de sangre provenientes de la comunidad rural de Río Brito

Una vez eluidos los anticuerpos de los confetis de papel filtro, se realizaron diluciones seriadas de la muestra, tanto de los controles como los pacientes, desde 1/5 hasta 1/160. Se agregaron 50 µl de cada dilución en las láminas sobre el área de la cuadrícula correspondiente en las láminas portaobjeto, previamente sensibilizada con el antígeno (epimastigotes de T. cruzi fijados con formaldehído 2%). Se colocaron las láminas en una cámara húmeda, y se incubaron a 37°C, durante 1 hora. Posteriormente, las láminas se lavaron dos veces consecutivas con PBS pH 7,4. Seguidamente, se colocaron las láminas sobre papel secante y se secaron con la ayuda de un secador. Luego, se agregaron 50 µl de anti-IgG conjugada con fluoresceína (Sigma), a la dilución óptima de 1/32 en PBS (pH 7,4) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Luego, se retiraron las láminas de la estufa y se lavaron dos veces consecutivas con PBS pH 7,4. Posteriormente, se agregaron 50 µl de la solución diluída de azul de Evans (1:10) en cada pocillo, y se dejó durante cinco minutos a temperatura ambiente, se enjuagaron las láminas con agua destilada, empleando una piseta y se secaron con un secador. Se colocó una gota de glicerina tamponada y sobre ella una laminilla cubreobjetos y se conservaron en oscuridad hasta la lectura (Guhl y Nicholls, 2001).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Para confirmar los resultados de los individuos evaluados por la prueba de IFI en la comunidad de Río Brito, se utilizó la prueba de ELISA siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia y cols. (2004), utilizando epimastigotes fijados de una mezcla de cepas de T. cruzi (cepa Tulahuen y Brasil).

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos, la cual se recubrió con 1×10^6 epimastigotes/ml (fijados con formaldehído al 2%) a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda en 1 mol.l^{-1} de carbonato de sodio a pH 9,6. Una vez pasado el

tiempo de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de fosfato salino (PBS) (pH 7,4) mezclado con 0,05% de Tween 20 (solución de lavado). Posteriormente, las placas se bloquearon por 1 hora a 37°C en PBS mezclado con 5% de leche descremada y 0,1% de Tween 20 (solución bloqueadora). Seguidamente, se adicionó el suero del paciente, el cual fue diluido (1:400) en la solución bloqueadora y se incubó por 1 hora a 37°C. Al cabo de este tiempo, se realizaron cuatro nuevos lavados con la solución de lavado y se incubó con una dilución óptima, en la solución de bloqueo, de anti-IgG humana conjugada a peroxidasa de rábano picante a 37°C por 30 minutos, después de 4 nuevos lavados, se reveló la reacción con 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), por 10 minutos, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1 mol.l⁻¹). Los experimentos se realizaron por duplicado en cada placa. Un pool de controles positivos y negativos, confirmados por tres pruebas serológicas diferentes en el Laboratorio de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela), fueron incluidos en cada placa. Los resultados fueron aceptados sólo si el coeficiente de variación (CV) para cada placa y entre placas fue menor o igual a 15%; de otro modo las muestras fueron analizadas nuevamente.

El punto de corte para esta prueba fue determinado utilizando la curva: característica operativa del receptor (del inglés: “Receiver-operating characteristic curves”: curva ROC). Esta curva definió el valor de 0,400 de densidad óptica (DO) como el valor más óptimo, el cual permitió la mejor discriminación entre valores positivos y negativos (Berrizbeitia y cols., 2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Gordis, 2004).

La asociación entre la infección por T. cruzi y las diferentes variables epidemiológicas evaluadas como sexo, reconocimiento del vector, conocimiento de la enfermedad de Chagas, picadura del vector, presencia de los vectores dentro o alrededor de las viviendas fue determinado mediante la prueba de Fisher a un nivel de confiabilidad de 95%. Igualmente se determinaron la razón de probabilidades (del inglés: Odds ratio: OR), para la evaluación de la probabilidad de la ocurrencia de un evento en presencia o ausencia de un factor de riesgo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se utilizó el aislado AU de T. cruzi para la estandarización de una prueba de inmunofluorescencia indirecta. Para tal fin, se realizaron diferentes diluciones del antígeno (1/4, 1/8, 1/16 y 1/32), de tal forma que se contaran aproximadamente 40 parásitos por campo, antes de proceder a fijar los antígenos a las láminas portaobjeto. Igualmente, para el anticuerpo primario, se realizaron diluciones 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, y 1/512 y para el anticuerpo secundario o conjugado se tituló 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128.

El antígeno previamente fijado en una lámina portaobjeto fue incubado con una mezcla de sueros previamente confirmados como positivos (control positivo) y negativos (control negativo) por tres métodos serológicos diferentes para la infección por T. cruzi (IFI, HAI y ELISA). Las condiciones que permitieron obtener una mejor discriminación entre el control positivo y negativo, durante el proceso de estandarización, para cada uno de los pasos de la prueba fueron: dilución del antígeno 1/16, anticuerpo primario 1/32, anticuerpo secundario 1/32 y número de lavados: dos. El punto de corte de la prueba de IFI estandarizada fue de 1/32. Valores similares en la ejecución de la prueba IFI fueron reportados por Rodríguez-Bofante y cols. (2007) en un estudio seroepidemiológico realizado en el municipio Andrés Eloy Blanco del estado Lara, donde se utilizó la prueba de IFI para detectar anticuerpos anti- T. cruzi. El punto de corte establecido por los autores fue la dilución de suero 1/32. Los autores mencionan en su trabajo el uso amplio de la técnica para el diagnóstico de esta parasitosis, presentando una sensibilidad y especificidad mayor al 98%.

Una vez estandarizada las condiciones de la prueba IFI, se procedió a determinar la sensibilidad y especificidad, así como también los valores predictivos positivos y negativos de la misma; para ello se utilizaron 49 sueros de referencia de individuos

confirmados con infección por *T. cruzi* y 50 sueros de referencia confirmados como negativos por tres pruebas serológicas distintas (ELISA, IFI y HAI). Asimismo, se contó con 10 sueros provenientes de individuos infectados con *Leishmania* sp. (leishmaniasis cutánea). Estos sueros fueron donados por el Laboratorio de Referencia Nacional de Diagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela).

Los resultados de algunos de los sueros positivos evaluados en el presente trabajo se muestran en la figura 1; en ésta se puede visualizar la superficie y el flagelo de los parásitos de un color verde manzana fluorescente, considerándose como muestras reactivas aquellas cuyo título fuese igual o mayor de 1:32. Los resultados de algunos de los sueros negativos se muestran en las figura 2; en ella, se pueden observar el parásito rojo o en algunos casos el fondo de la lámina oscura (Apéndices 6-8).

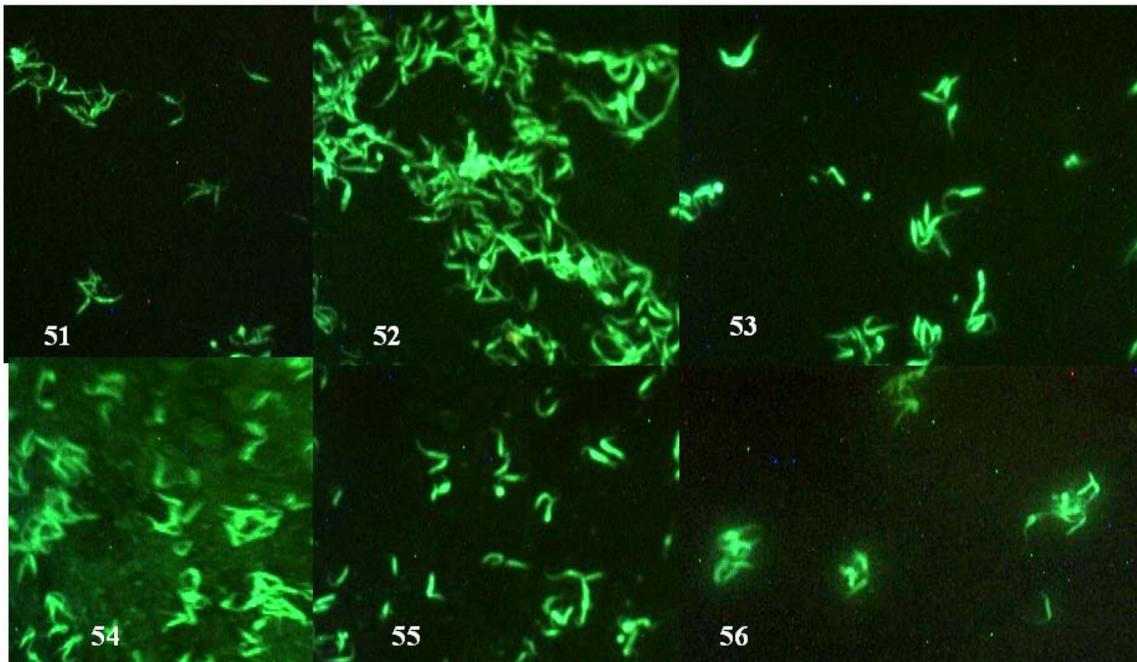


Figura 1. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos confirmados con serología positiva para la infección por *T. cruzi* (muestra 51 a 56)

Las pruebas serológicas constituyen una importante herramienta para el diagnóstico

de la infección por T. cruzi, por ello, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Organización Panamericana de la Salud (OPS), recomiendan el uso de por lo menos dos pruebas serológicas con principios distintos para la clasificación de los individuos infectados por T. cruzi, siendo una de ellas la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Zicker y cols., 1990; Rosa y cols., 2001).

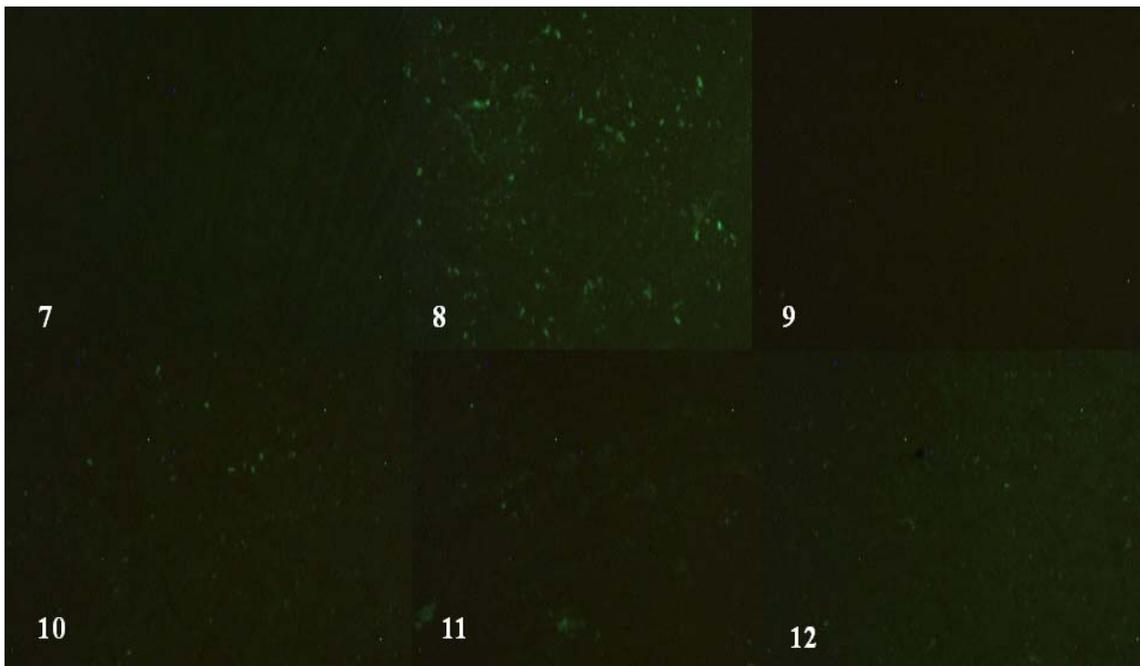


Figura 2. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos confirmados con serología negativa para la infección por T. cruzi (muestras 7-12)

La técnica de inmunofluorescencia indirecta ha permitido ampliar el estudio serológico de numerosas enfermedades infecciosas, dentro de las cuales se encuentra la enfermedad de Chagas; esta técnica es de ejecución relativamente simple, rápida y por su alta sensibilidad es usualmente usada como técnica de confirmación (Taibi, 1995). Es importante señalar que algunos autores afirman que esta técnica, si es estandarizada usando antígenos propios de cada región favorece la sensibilidad de la misma (Cárdenas y cols., 2003). En este estudio se utilizó un aislado autóctono de la región oriental, éste fue obtenido de la sangre de un niño con infección aguda por T.

cruzi en el Hospital "Luis Razetti" de Barcelona estado Anzoátegui (Morocoima y cols., 2008).

Otra de las ventajas del uso de la técnica de inmunofluorescencia es que utiliza el parásito completo, lo que la hace específica para reconocer anticuerpos propios, debido a que los antígenos de superficie del parásito, interactúan directamente con los anticuerpos producidos por el hospedero (Cárdenas y cols., 2003; Flores-Chávez y cols., 2006; Lorca y cols., 2008). Además, esta técnica es capaz de detectar anticuerpos que aparecen precozmente en la fase aguda de la infección (Lorca y cols., 1983; Botero y Restrepo, 2003).

Sin embargo, la IFI presenta algunas limitaciones como son la aparición de reacciones cruzadas con sueros provenientes de individuos infectados por especies de Leishmania sp. (Figura 3), debido a que este parásito posee múltiples epítopes de superficie semejantes a T. cruzi localizados en moléculas de glicoproteínas que contienen residuos de galactosa, y proteínas del citoesqueleto, como la tubulina, la cual es semejante en muchos tripanosomátidos. Tomando ésto en cuenta, es de suma importancia hacer una valoración clínica-epidemiológica del paciente, así como estudios parasitológicos a largo plazo, a manera de evitar en lo posible un diagnóstico errado (Palacios y cols., 2000). De igual manera, su utilización como prueba de rutina depende de la experiencia del operador al momento de la realizarla (Flores-Chávez y cols., 2009).

Otra de las desventajas observadas en esta técnica durante el desarrollo de la presente investigación es que el parásito puede ser barrido al momento de los lavados, por lo que se hace necesario fijar las láminas con acetona fría para conservarlo adherido a las mismas; además, la presencia en algunos casos de fondo sucio, lo cual dificulta la visualización al microscopio de fluorescencia (Figura 2, muestra 8).

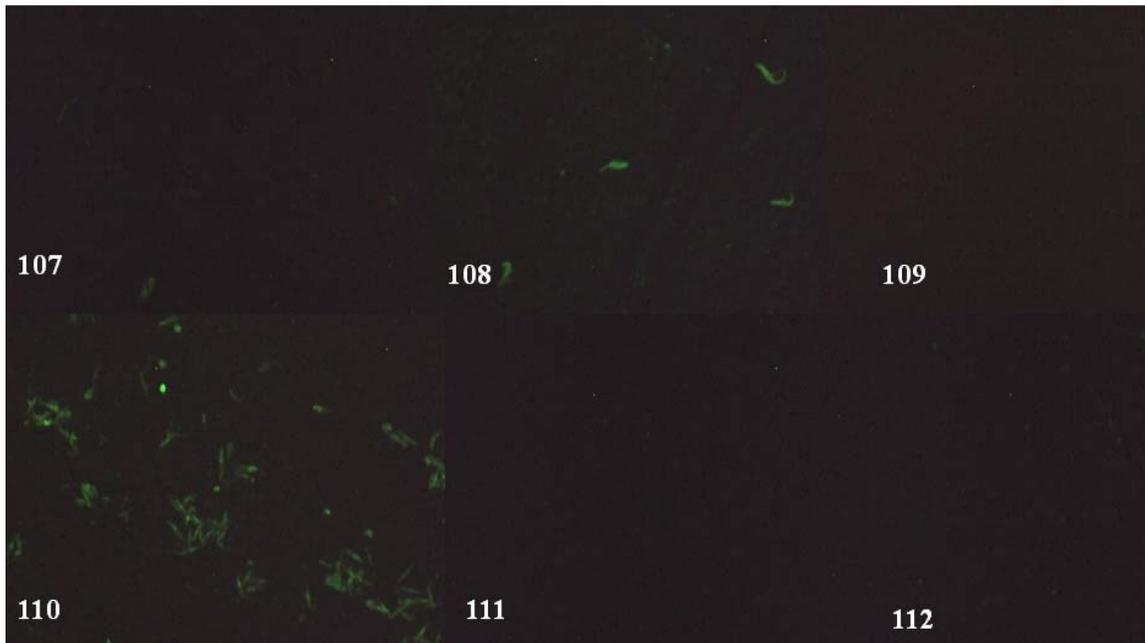


Figura 3. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología positiva para la infección por *Leishmania* sp. (muestras 107-112)

Como se puede observar en la Tabla 1, la sensibilidad de la IFI fue del 100,00% y la especificidad de 92,19%. Igualmente, la prueba mostró un excelente valor predictivo negativo (100,00%) y un elevado valor predictivo positivo (90,74%). Estos resultados demuestran que la prueba de inmunofluorescencia estandarizada fue altamente sensible, ya que todos los sueros positivos de referencia fueron identificados como positivos por IFI (Apéndices 2-5). Por la elevada sensibilidad de la prueba se observaron también algunos sueros falsos positivos (n=3).

Añez y cols. (2010) realizaron un estudio para evaluar el desempeño de ocho técnicas distintas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Estos autores reportaron en su trabajo una sensibilidad para la técnica de IFI de 100,00%; similar a la encontrada en la presente investigación y una especificidad menor de 77,00% y llegaron a la conclusión que la técnica de IFI se recomienda sólo como prueba de rutina en centros especializados, para los casos en los que se requiera determinar la

fase de la infección chagásica en individuos en los que se deba tomar la decisión de aplicar algún tratamiento tripanocida.

De igual manera, Vieira y cols. (2006) reportaron resultados similares a los encontrados en la presente investigación. Estos autores describen una sensibilidad de 100,00% y una especificidad del 98,00% en la prueba de IFI. Cabe destacar que los valores de especificidad reportados por estos investigadores pueden encontrarse falsamente elevados, debido a que ellos no utilizaron sueros confirmados con otras enfermedades parasitarias para determinar reacciones cruzadas como se realizó en el presente trabajo. En ese estudio se utilizaron un total de 414 sueros para determinar infección por T. cruzi y se comparó la técnica de IFI con otras técnicas convencionales como HAI, cuya sensibilidad fue de 95,70% y especificidad fue de 98%, el ELISA con una sensibilidad de 98,20% y especificidad de 96,40% y una técnica molecular (PCR) que presentó una sensibilidad de 1,20% y una especificidad de 100,00%. Estos resultados demuestran que las técnicas convencionales siguen siendo adecuadas para el diagnóstico de esta parasitosis debido a su elevada sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad y especificidad de toda prueba serológica va a depender del tipo de antígeno que se usa, en general los antígenos de epimastigotes fijados resultan ser muy estables, cuando son mantenidos a bajas temperaturas, fáciles de producir y relativamente económicos, por ello son los más comúnmente usados (De lima y cols., 2007; Berrizbeitia y cols., 2010).

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi, utilizando sueros de referencia

Sueros	Prueba IFI			Sensibilidad	Especificidad	VP +	VP-
	Positivos	Negativo	n				
Individuos infectados por <u>T. cruzi</u>	49	0	49	100,00%	92,19%	90,74%	100,00%
Individuos no infectados por <u>T. cruzi</u>	3	47	50				
Individuos infectados con <u>Leishmania sp.</u>	2	8	10				
Individuos infectados con otras parasitosis	0	4	4				
Total	54	59	113				

IFI: inmunofluorescencia indirecta; VP+: valor predictivo positivo, VP-: valor predictivo negativo

Una vez que se estandarizó la prueba de IFI, ésta se validó en un trabajo de campo. Para ello se utilizaron 50 muestras eluidas a partir de papel filtro provenientes de la comunidad rural de Rio Brito, estado Sucre, los cuales habían permanecido almacenados a -70°C por un período de cuatro años. Se utilizó un control positivo y uno negativo en cada procesamiento (Apéndice 10). De las 50 muestras, 8 fueron positivas y 42 fueron negativas por IFI. Igualmente las 50 muestras fueron procesadas

por un ELISA casero, el cual utilizó epimastigotes fijados como antígeno; por esta última 12 resultaron positivas y 38 resultaron negativa (Tabla 2). De acuerdo a estos resultados, se puede observar que la técnica de ELISA fue más sensible que la IFI, arrojando un mayor número de seropositivos; valores de sensibilidad similares fueron los reportados por Flores- Chávez y cols. (2009), en un estudio realizado en España, donde se utilizó un total de 223 sueros para comparar 10 técnicas serológicas y evaluar su reactividad cruzada frente a otras enfermedades parasitarias. Estos autores llegaron a la conclusión que la técnica de ELISA es más sensible que otras técnicas convencionales. Caso contrario fue lo reportado por Leiby y cols. (2000), en un trabajo realizado para comparar la técnica de Radioinmunoprecipitación (RIPA) con pruebas como IFI, HAI y diferentes tipos de ELISA comerciales, concluyeron que algunas pruebas de ELISA (Abbott y Embrabio) fueron menos sensibles que la IFI.

De los 50 individuos estudiados, 31 eran del sexo femenino, de los cuales 7 (22,58%) resultaron positivos por IFI y 9 (27,42%) por ELISA y 19 eran del sexo masculino, de los cuales 1 (5,26%) resultó positivo por IFI y 3 (6,00%) resultaron positivos por ELISA, para un total de 8 (16,00%) positivos por IFI y 12 (24,00%) positivos por ELISA. Asimismo, la edad promedio de los pacientes fue $31,90 \pm 16,98$ años (rango 13-73). Los pacientes seropositivos presentaron edades mayores a los 22 años. Este resultado indica que en esta región del estado Sucre no ha ocurrido transmisión vectorial en los últimos 22 años. Se reportó, además, una elevada seroprevalencia (16,00%) por ambas técnicas en esta región. Berrizbeitia y cols. (2010), en un estudio previo realizado en la misma región y mediante la aplicación de las técnicas de ELISA y MABA, encontraron una seroprevalencia menor (9,00%) a la reportada en este trabajo; esto pudo deberse al tipo de muestreo, en la presente investigación se realizó una búsqueda activa de los individuos y se cubrieron regiones poco exploradas, y el promedio de edad de los individuos evaluados fue mayor al reportado por Berrizbeitia y cols. (2010), lo cual revela que en este estudio se detectó un mayor número de casos antiguos de la infección por T. cruzi. Cabe destacar que en ambos

trabajos la técnica de ELISA resultó ser más sensible que las otras técnicas serológicas usadas (IFI- MABA).

Tabla 2. Detección de individuos seropositivos a la infección por *T. cruzi* en Río Brito, estado Sucre, utilizando epimastigotes fijados en la prueba de inmunofluorescencia indirecta y ELISA.

Prueba de inmunofluorescencia indirecta				
Individuos positivos	Individuos negativos	Seroprevalencia por IFI %		
8	42	16,00%		
Prueba de ELISA (epimastigotes fijados)				
Individuos	Media (DO)	Desviación estándar	Rango DO (min-máx)	Seroprevalencia por ELISA
Positivos 12	1,59	0,41	0,49-2,02	24,00%
Negativos 38	0,16	0,06	0,06-0,31	
Concordancia IFI y ELISA				
IFI/ELISA positivos	IFI/ELISA negativos	IFI/ELISA muestras inconclusas		
8/12	42/38	4		

DO: densidad óptica; IFI: inmunofluorescencia indirecta; min: mínimo; máx: máximo; ELISA: ensayo inmunoenzimático.

Traviezo y Bofante (2004) usaron IFI en un estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, estado Lara, reportando una seroprevalencia total de 24,20% mayor a la encontrada en esta investigación. Por el contrario; Rodríguez-Bofante y cols. (2007) encontraron una prevalencia menor de 6,90% en un estudio realizado en el municipio Andrés Eloy Blanco, con transmisión activa de *T. cruzi* y una prevalencia de 8,33% en niños menores de 10 años. Por su

parte, Rojas y cols. (2008), hallaron una prevalencia de 1,57% en estudio realizado en la Parroquia Xaguas del Municipio Urdaneta, ambos estudios en el estado Lara. Asimismo, Serrano y cols. (2008), reportaron una seroprevalencia de 1,02% en niños menores de 16 años en dos localidades del municipio Costa de Oro, estado Aragua.

En el estado Trujillo, donde se evaluaron ocho comunidades no endémicas, no colonizadas por el vector conocido (R. prolixus), se registraron valores de seroprevalencia de infección por T. cruzi de 19,20% en los individuos adultos, mientras que en niños menores de 10 años el valor fue de 2,80% (Sandoval y cols., 2003). Un 12,50% de seropositivos fueron encontrados en la población rural de Cocollar, municipio Montes del estado Sucre (Flores, 2003).

El programa de control de la enfermedad de Chagas llevado a cabo en Venezuela, que incluyó la aplicación de insecticidas y el mejoramiento de las viviendas, cambió significativamente los indicadores epidemiológicos de esta enfermedad en la última década, aún así lográndose una disminución significativa de la prevalencia de dicha enfermedad de 45% a 10% en los años 1990-1999, aunque ésta sufrió variaciones con el paso de los años desde valores relativamente bajos (8,90%) hasta cifras realmente elevadas y alarmantes (35,70%) (Urbina, 2005; MPPS, 2008).

Para determinar la asociación entre la seropositividad a T. cruzi y los factores de riesgo evaluados se aplicó una encuesta epidemiológica a 50 individuos que habitaban en la comunidad de Río Brito para el momento de la recolección de las muestras, las variables consideradas fueron: sexo, reconocimiento del vector, conocimiento de la enfermedad de Chagas, picadura del vector, vectores dentro y alrededor de las viviendas y tipo de piso. De todas las variables evaluadas, se encontraron asociadas a la infección por T. cruzi, haber reconocido el vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la infección por T. cruzi en la población de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre.

Factor de riesgo	Nº	Positivos para el factor de riesgo n (%)	OR	IC 95%	P
Sexo					
Femenino	31	7 (22,58)	5,25	0,59-46,57	0,10
Masculino	19	1 (5,26)			
Reconocimiento del vector					
Si	25	7 (28,00)	9,30	1,05-82,78	0,02*
No	25	1 (4,00)			
Conocimiento de la enfermedad de Chagas					
Si	5	3 (60,00)	5,55	0,95- 32,4	0,07
No	45	5 (11,11)			
Picadura del vector					
Si	5	2 (40,00)	4,33	0,59-31,54	0,17
No	45	6 (13,33)			
Vectores dentro de las casas					
Si	9	3 (33,33)	3,60	0,67 -9,16	0,14
No	41	5 (12,20)			
Vectores alrededor de las casas					
Si	10	4 (40,00)	6,00	1,17-86,78	0,04*
No	40	4 (10,00)			
Tipo de piso					
Cemento	34	3 (8,82)	4,70	0,96-22,99	0,06
Tierra	16	5 (31,25)			

OR= razón de proporciones (del inglés: odds ratio); IC= intervalo de confianza, Valor de probabilidad prueba de Fisher P= probabilidad, * significativo P <0,05

En la Tabla 3 se puede observar la asociación de la infección por T. cruzi y el reconocimiento del vector por los individuos estudiados en la comunidad de Río Brito del estado Sucre, aquí se evidencia que reconocer al vector aumenta 9 veces la probabilidad de infectarse por T. cruzi, constituyendo éste un importante factor de

riesgo ($P < 0,05$). De los 25 individuos que reconocieron al vector, 7 (28,00%) resultaron seropositivos para la infección por T. cruzi, mientras que los individuos que no reconocieron al vector, 1 (4,00%) resultó positivo (OR: 5,55).

En Venezuela, durante los últimos años, la lucha para proteger a la comunidad contra la transmisión de la enfermedad de Chagas se ha basado principalmente en el uso de insecticidas, así como en el mejoramiento de las viviendas para hacerlas no aptas a colonización por triatominos (Añez y cols., 2003). Además, anteriormente se consideraba que esta enfermedad estaba asociada a niveles socioeconómicos relativamente bajos, donde las casas de bahareque y pisos de tierra eran las principales infestadas con los vectores; actualmente se ha observado la aparición de brotes en áreas urbanas y la presencia de otro vector como Panstrongylus geniculatus (como vector contaminante de los alimentos) asociados a casos positivos con dicha enfermedad, lo que plantea una nueva realidad epidemiológica (Alarcón de Noya y cols., 2008).

Otro factor que resultó asociado a la seropositividad a T. cruzi fue la presencia del vector alrededor de las casas de los individuos que habitaban en la comunidad de Rio Brito, del estado Sucre. La prueba de Fisher demostró que haber visto los vectores alrededor de las casas representa un factor de riesgo para adquirir la infección por T. cruzi. Resultados similares son reportados por Serrano y cols. (2008), en una comunidad del estado Aragua, donde se menciona que los habitantes afirmaron haber visto al vector en los alrededores de sus viviendas, cabe destacar que estos autores no encontraron R. prolixus (principal vector de la infección por T. cruzi) en las viviendas, sino más bien vectores secundarios (P. geniculatus) lo que lleva a pensar que por la campaña de lucha llevada a cabo en Venezuela contra la enfermedad y subsecuente eliminación del vector primario, los secundarios han comenzado a ganar terreno.

Por otra parte, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los pacientes seropositivos a la infección por T. cruzi y los otros factores de riesgo estudiados como fueron: conocimiento de la enfermedad de Chagas, picadura del vector, vectores dentro de las viviendas y tipo de piso, lo cual coincide con otros trabajos de investigación, como por ejemplo, el trabajo realizado por Cannova (2003), donde no se encontró asociación estadística significativa entre el tipo de vivienda, la presencia de los triatominos dentro de las casas con positividad a la infección por T. cruzi, caso contrario a lo encontrado por Sanmartino y Crocco (2000), en Argentina, donde se relacionan las características de las viviendas como factor de riesgo y condiciones favorables para el alojar triatominos, donde por lo menos 30,00% de sus domicilios estaban construidos con paredes de adobe agrietadas y techos de riesgo (paja o barro).

Aún cuando se han reportado casos de la enfermedad de Chagas en áreas urbanas, es importante señalar que ésta sigue relacionándose con el desarrollo socio-económico de la población, mientras existan triatominos que transmitan la enfermedad, viviendas inadecuadas, migraciones, nivel educativo bajo y urbanización de áreas selváticas, el riesgo de adquirir la infección por T. cruzi se mantiene. Por lo tanto, se debe, además de mantener, aumentar la lucha y vigilancia contra la propagación de la misma; diversos autores explican que existe mayor probabilidad de adquirir esta enfermedad en zonas rurales con características similares a las anteriormente mencionadas que en las zonas urbanas. Velazco y cols. (1992), en un estudio seroepidemiológico realizado en México, reportan haber encontrado dos veces más casos positivos en las personas que provenían de un área rural con relación a los de la zona urbana.

Otro factor no asociado a la infección por T. cruzi en esta investigación, pero de suma importancia es el desconocimiento de la enfermedad de Chagas por parte de la población estudiada. De los 50 individuos encuestados, 45 respondieron no conocer esta enfermedad, de los cuales 5 (11,11%) resultaron positivos a la infección causada

por el T. cruzi; igualmente, de los 5 individuos que aseguraron conocerla 3 (60,00%) resultaron positivos, lo cual hace notar que tener conocimiento sobre esta enfermedad y sus consecuencias es un factor protector para evitar la infección por este parásito. Con respecto a la presencia del vector dentro de las casas, cabe destacar que de los 50 individuos encuestados, 41 manifestaron no haberlos visto dentro de las viviendas, aún cuando 5 (12,20%) de estos resultaron positivos, al igual que 3 de los 9 que manifestaron ver al vector dentro de las viviendas (33,33%).

Serrano y cols. (2008) reportaron resultados similares, donde el 60,00% de la comunidad encuestada, a pesar de conocer y haber visto el vector, no conocía la enfermedad transmitida por éste ni sus consecuencias en la salud. Por otra parte, Bar y cols. (2005), en un estudio realizado en la comunidad de Palmas en Argentina, encontraron un grado de desconocimiento total tanto de la enfermedad de Chagas como del principal vector doméstico que la transmite (R. prolixus). Por lo tanto, se considera el bajo conocimiento sobre la enfermedad de Chagas como un factor de riesgo, ya que estas personas de manera consciente no tienen la posibilidad de reconocer al vector, así como también sus manifestaciones tempranas o tardías, imposibilitando la toma de medidas preventivas.

El tipo de piso y paredes de las viviendas también constituye un importante albergue para los triatominos, favoreciendo su presencia y mantenimiento dentro de las casas; aun cuando éstos no fueron factores asociados a la infección por T. cruzi en el presente trabajo; en Venezuela se ha reportado un mayor número de triatominos infectados en casas cuyos techos son de palmas y pisos de tierras, de igual forma en países como Colombia, Panamá, Brasil y México se observa una situación similar (Carcavallo, 1978).

En la presente investigación se determinó que el sexo no es un factor asociado a la infección por T. cruzi, aunque, según el valor de OR, las mujeres tienen 5 veces más

probabilidad de contraer esta infección que los hombres. De las 31 mujeres que participaron en este estudio, 7 (22,58%) resultaron positivas a la infección por este protozooario, mientras que de los 19 hombres, sólo 1 (5,26%) resultó positivo; estos resultados fueron similares a los reportados por Palacios y cols. (2000), donde la mayoría de los sueros seropositivos correspondieron a personas del sexo femenino; sin embargo, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el número de seropositivos y el sexo, es decir ambos sexos tienen la misma probabilidad de presentar infección por T. cruzi, lo que concuerda igualmente con hallazgos encontrados por Mogoll y Principal (2004). Teniendo en cuenta que, en muchas ocasiones la recolección y transporte de muestras de sangre puede constituir una verdadera limitación para la realización de estudios poblacionales, se validó la IFI empleando eluidos de sangre a partir de papel filtro, constituyendo esto una herramienta ideal para este fin en zonas rurales de difícil acceso; a pesar de ello, algunos autores afirman que estas muestras deben procesarse rápidamente una vez obtenidas para evitar la disminución significativa de los títulos de anticuerpos (Guimarães y cols.,1986). En estudios realizados por Marinkelle y cols. (1978), se muestra la disminución significativa de títulos de las muestras eluidas a partir de papel filtro en relación al tiempo y condiciones de almacenamiento.

Igualmente, algunos autores señalan que la sensibilidad de la prueba IFI puede verse afectada cuando se utilizan muestras eluidas en comparación con las muestras de suero. En este orden de ideas, Zicker y cols. (1990), reportaron una marcada diferencia entre los valores de sensibilidad en muestras de suero y eluidos de sangre en las prueba de IFI y HIA resultando ambas muy sensibles cuando se usa suero y muy poco sensibles cuando se usan eluidos almacenados por largos período de tiempo. Sin embargo, en la presente investigación a pesar de que las muestras estuvieron almacenadas por un lapso de 4 años mostraron una buena reactividad en las dos pruebas serológicas empleadas (ELISA e IFI), ésto queda evidenciado por la alta prevalencia de la infección por T. cruzi encontradas en ambas técnicas (16,00%)

y la elevada reactividad de los sueros que resultaron positivos en la prueba de ELISA, ya que estas muestras presentaron un valor promedio de DO de 1,59.

La prueba de IFI estandarizada en la presente investigación mostró valores de sensibilidad (100,00%), especificidad (92,99%), valor predictivo positivo (90,74%) y valor predictivo negativo (100,00%) aceptables y una vez validada permitió determinar una alta seroprevalencia en una comunidad rural del estado Sucre, permitiendo así demostrando su utilidad como prueba de diagnóstico. Además, es importante destacar que en el estado Sucre la utilización de la IFI no ha sido previamente descrita para el diagnóstico de la infección para T. cruzi. Por lo tanto, este trabajo proporcionará una herramienta complementaria para mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, junto a otra prueba serológica convencional como lo recomienda la OPS.

CONCLUSIONES

La prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando los antígenos de epimastigotes fijados mostró una excelente sensibilidad, aceptable especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada puede ser utilizada como método diagnóstico, en estudios epidemiológicos y como prueba complementaria junto a otra técnica serológica convencional.

La seropositividad de la infección por T. cruzi en la comunidad de Río Brito fue elevada.

De las variables epidemiológicas evaluadas en la población rural de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre, sólo se encontraron asociadas a la infección por T. cruzi, haber reconocido el vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas.

No se detectó transmisión activa de la infección por T. cruzi, en los últimos 22 años en la población rural de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre.

BIBLIOGRAFÍA

Aché, A.; Medina, M. y Matos, A. 2008. Contribución de Dieldrín en el control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Salus, 12(3): 17-20.

Acquatella, H. 2003. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Venezuela y de su manejo terapéutico. Gaceta Médica Caracas, 111(2): 136-156.

Alarcón de Noya B. 2008. Enfermedad de Chagas en Caracas. Salus, 12: 4-5.

Alarcón de Noya, B.; Díaz- Bello, Z.; Colmenares, C.; Zavala-Jaspe, R.; Mauriello, L.; Díaz, M.; Soto, M.; Aponte, M.; Ruiz-Guevara, R.; Losada, S.; Noya-Alarcón, O. y Noya-González, O. 2009. Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Revista Biomédica, 20(3): 158-164.

Añez, N.; Crisante, G.; Rojas, A.; Díaz, N.; Añez-Rojas, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Aguilera, M.; Moreno, G.; Galíndez-Girón, I.; Sandoval, R.; Sandoval, I.; Vásquez, L.; Nava-Rulo, O.; Guerra, F.; Uzcátegui, G.; Yépez, J.; Rodríguez, C. y Bonfante-Cabarcas, R. 2003. La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, XLIII (2): 45-57.

Añez, N.; Romero, M.; Crisante, G.; Bianchi, G. y Parada, H. 2010. Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, L(1): 17-27.

Bar, M.; Damborsky, M.; Oscherov, E. y Wisnivesky, C. 2005. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en San Roque, corrientes infestación por triatominos y seroprevalencia humana. Medicina, 65(2): 97-102.

Behrend, M.; Beltrán, M.; Restrepo, M.; Kroeger, M. 2002. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre en Colombia. Biomédica, 22(1): 34- 45.

Beltrán, M.; Bermúdez, M.; Forero, M.; Ayala, M.; Rodríguez, M. 2003. Control de Trypanosoma cruzi en donantes de sangre de Colombia. Biomédica, 25: 527- 532.

Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Vásquez, F.; Lacouture, S.; Medina, M y Ward, B. 2004. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of Trypanosoma cruzi (epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. Journal of Clinical Microbiology, 42(4): 1766– 1769.

Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M y Ward, B. 2006. Purified excreted-secreted antigens from Trypanosoma cruzi trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. Journal of Clinical Microbiology, 44: 291– 296.

Berrizbeitia, M.; Aguilera, G.; Ward, B.; Rodríguez, J.; Jorquera, A. y Ndao, M. 2010. Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 30: 55-60.

Botero, D. y Restrepo, M. 2003. Parasitosis humana. Cuarta edición. Medellín-Colombia.

Briceño-León, R. 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25(1):71-82.

Camargo, M. 1966. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in slide test. Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 8: 227–234.

Cannova D. 2003. Seroepidemiología de tripanosomiasis americana, sector Las Cuevas Estado Carabobo. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, 7: 28-33.

Carcavallo, R. 1978. Ecología humana y enfermedad de Chagas. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, 28(4): 248-258.

Cárdenas, J.; Mazariego, M.; Utrilla, F.; Monteón, V. y González M. 2003. Anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en pacientes con cardiomiopatía dilatada. Revista Medigraphi Artemisa en Línea, 41(2): 111-114.

Chacín, J.; Soto, R.; Tarazón, S.; Méndez, H. y Mármol, P. 2007. Parasitología. Undécima edición. Editorial de la Universidad del Zulia (Ediluz). Venezuela.

Chandler, F. y Watts, J. 1988. Immunofluorescence as an adjunct to the histopathologic diagnosis of Chagas' disease. Journal of Clinical Microbiology, 26(3): 567– 569.

Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas. 1993. Pautas y éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos. Ginebra.

Cura, E.; Wendel, S.; Pinheiro, F.; Weissenbacher, M. y Escutia, V, 1994. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. PAHO. Washington (DC).

Da Rocha, J.; Azevedo, N.; de Araújo-Jorge, T.; Lannes-Vieria, J.; Correira, M y Klein, L. 2009. Clásicos em doença de Chagas historia e perspectivas no centenario da descoberta. Fiocruz. Río de Janeiro.

De Lima, A.; Arévalo, P.; Bastidas, V.; Bolívar, M.; Navarro, M. y Contreras, V. 2007. Efecto de las condiciones de mantenimiento de Trypanosoma cruzi sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Salus, 11(1): 21-26.

Enciso, C.; Montilla, M.; Santacruz, M.; Nicholls, S.; Rodríguez, A.; Mercado, M. y Puerta, C. 2004. Comparación de una prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial chagatek® para la detección de anticuerpos anti- T. cruzi. Biomédica, 24(1): 104-108.

Feliciangeli, D. 2009. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. Interciencia, 34(6): 393- 399.

Fife, E.; y Muschel, L. 1959. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of Trypanosoma cruzi infection. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 101: 540-543.

Flores-Chávez, M.; Cruz, I.; Rodríguez, M.; Nieto, J.; Franco, E.; Gárate, T. y Cañavate, C. 2009. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 5: 1-10.

Flores-Chávez, M.; Fuentes, I.; Gárate, T. y Cañavate, C. 2006. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 3: 29-37.

Flores, V. 2003. Evaluación seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en diferentes localidades del municipio Montes, estado Sucre. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná

Gordis, L. 2004. Epidemiology. Third edition. Elsevier sounders. Philadelphia.

Guhl, F y Nicholls, S. 2001. Manual de procedimientos para el diagnostico de la enfermedad de Chagas. Quebecor Impreandes. Primera edición. Bogotá.

Guimarães, M.; Castilho, B.; Nakahara, O. y Amato, V. 1986. Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM en papel filtro para su uso en encuestas seroepidemiológicas de enfermedades parasitarias. Bol of Sanit Panam, 100(2): 129-144.

Herrera, L. 2010. Una revisión sobre reservorios de Trypanosoma (*Schizotrypanum*) cruzi (Chagas, 1909), agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, L (1): 3-15.

Hoyos, R.; Pacheco, L.; Aguledo, L.; Zafra, G.; Blanco, P. y Triana, O. 2007. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas y factores de riesgos asociados en una población de Morroa, Sucre. Biomédica, 27(1): 130-136.

Imbert, J.; Figueroa, A. y Gómez, J. 2003. Tripanosomiasis americana o “mal de Chagas” Otra enfermedad de la pobreza. Elementos, 49: 13-21.

Leiby, D.; Silvano, W.; Deise, T.; Fachini, R.; Oliveira, L. y Tibbals, M. 2000. Serologic testing for Trypanosoma cruzi: Comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay and enzyme linked immunosorbent assay kit. Journal of Clinical Microbiology, 38(2): 639–642.

López-Antuñano, F.; Rangel-Flores, H. y Ramos, C. 2000. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42: 121-129.

Lorca, M.; Atias, A.; Astorga, B.; Muñoz, P. y Carrere, I. 1983. Infección por Trypanosoma cruzi en banco de sangre en doce hospitales de Chile. Bol. of Sanit. Panam., 95(4): 321-326.

Lorca, M.; Contreras, M.; Salinas, P.; Guerra, A y Raychaudhuri, S. 2008. Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi en suero. Parasitología Latinoamericana, 63: 29 -33.

Losada, M.; Burdeinick, I. y Scharifker D. 2000. Miocarditis chagásica aguda fatal en lactante de 9 meses de edad del área urbana. Clínica Médica, 5: 45-50.

Magnus, E.; Vervoort, T. y Meirvenne, V. 1989. Serodiagnostic de la maladie du sommeil. A Trypanosoma brucei gambiense: Antigène lyophilise pour le test d'immunofluorescence, Belgique.

Marinkelle, C.; De Sánchez, N.; Grugl, M.; Gusl, F. 1978. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales,

para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 20(2): 112-114.

Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), 2008. Boletín Epidemiológico, 17: 2-21.

Mogoll, P. y Principal, L. 2004. Seroprevalencia de anticuerpo para T. cruzi y factores de riesgo para la enfermedad de Chagas en comunidades rurales del municipio Torren, estado Lara.

Molina-Garza, Z.; Rosales-Encina, J.; Galaviz-Silva, L. y Molina-Garza, D. 2007. Prevalencia de Trypanosoma cruzi en triatominos silvestres de Nuevo León, México. Salud pública de México, 49(1): 37-44.

Moreno-Medina, E.; Valerio-Campos, I. y Goyenaga-Castro, P. 2007. Miocarditis y miocardiopatía dilatada por Trypanosoma cruzi: Reporte de un caso. Parasitología Latinoamericana, 62 (3-4): 148 -153.

Morocoima, A.; Tineo, E.; Ferrer, E.; Herrera, L. y Núñez, M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológico y molecular del aislado. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 48(2): 121-126.

Muñoz, J y Gascón J. 2005. Enfermedad de Chagas importada. Enfermedad Emergente, 7(3): 134-138.

Organización Panamericana de la Salud (OPS), 1982. Boletín epidemiológico, 3(3): 1-16.

Palacios, X.; Belli, A. y Espino, A. 2000 Detección de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. Revista Panamericana de Salud Pública, 8(6): 411- 417.

Peña, S.; Oletta, J.; Larrea, F; Echezuria, L.; Borges, R.; Avilan, J.y Orihuela, A. 2009. Enfermedad de Chagas, a 100 años de su descripción y descubrimiento del Trypanosoma cruzi. Red de Sociedades Científicas Médicas de Venezuela, 2: 1-8.

Ponce, C. 2003. Prioridades y tendencias en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Salud, 1: 1-31

Ramírez, N.; Silva, C.; Kiriakos, D. y Rodríguez, A. 2004. Enfermedad de Chagas en Venezuela: un bosquejo de su impacto sobre la salud pública. Acta Científica Estudiantil, 2(4): 148-156.

Rea, M.; Saiach, S.; Borda, C. y Edgardo-Mosqueda, L. 2006. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas y aislamiento de Trypanosoma del complejo cruzi. Resumen: M-123.

Rodríguez- Bofante, C.; Amaro, A.; García, M.; Mejías, L.; Guillen, P.; García, R.; Álvarez, N.; Díaz, M.; Cárdenas, E.; Castillo, S.; Bonfante-Garrido, R. y Bonfante-Cabarcas, R. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. Cad Saúde Pública, 23(5): 1133-1140.

Rojas, M.; Vásquez, P.; Villarreal, M.; Velandia, C.; Vergara, L.; Morán-Borges, Y.; Otiveros, J.; Calderón, M.; Chiurillo-Siervo, M.; Rodríguez- Bonfante, C.; Aldana, E.; Concepción, J. y Bonfante-Cabarcas, R. 2008. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por Triatoma maculata (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. Cad. Saúde Pública, 24(10): 2323-2333.

Romaña, C. 1961. Aplicación del método de hemaglutinación al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Revista de la Sociedad Argentina de Biología, 37: 73- 76.

Rosa, R.; Basmadján, Y.; González, M.; González, M. y Salvatella, R. 2001. Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. Revista Médica del Uruguay, 17(2): 125-132.

Salazar, P. y Marín, R. 2006. Manual para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi. Salud: 2- 79.

Salazar, P.; Rojas, G.; Bucio, M.; Cabrera, M.; García, G.; Ruiz, A.; Yolanda Guevara, Y. y Tapia, R. 2007. Seroprevalencia de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi y su asociación con factores de riesgo en menores de 18 años de Veracruz, México. Revista Panamericana de Salud Pública, 22(6): 75- 82.

Salvatella, R. y Schofield, C. 2006. Enfermedad de Chagas iniciativa para su control en Latinoamérica. Biomédica, 1(2): 36- 46.

Sandoval, I.; Añez, N.; Villegas, E. y Scorza, J. 2003. Persistencia de la transmisión de la enfermedad de Chagas sin colonización por el vector conocido, en localidades controladas de Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 23(2): 166- 168.

Sanmartino, M. y Crocco, L. 2000. Conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes en Argentina. Revista Panamericana de Salud Publica, 7(3): 173-178.

Serrano, O.; Mendoza, F.; Suárez, B. y Soto, A. 2008. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del municipio Costa de Oro, estado Aragua, Venezuela. Biomédica, 28: 108- 115.

Sosa-Estani, S. 2001. La epidemiología en la investigación de la infección con Trypanosoma cruzi. Montevideo, Uruguay.

Taibi, A.; Guevara, R.; Schoneck, B.; Yahiaoui, A. and Ouaissi, A. 1995. Improved specificity of Trypanosoma cruzi identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. Parasitology, 111: 581-590.

Traviezo, L y Bonfante- Garrido, R. 2004. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, municipio Simón Planas, estado Lara. Venezuela. Parasitol Latinoam, 59: 46- 50.

Urbina, J. 2005. Nuevas iniciativas en el tratamiento del mal de Chagas. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. Caracas- Venezuela.

Velazco, O.; Valdespino J. y Tapia R. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública México, 34: 186-196.

Vieira, A.; Monteiro, H.; Jamil, S.; Peixoto, V. y Pinto, M. 2006. Assesment of chemiluminescence and PCR effectiveness in relation to conventional serological test for the diagnosis of Chagas' disease. Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical, 39: 385-387

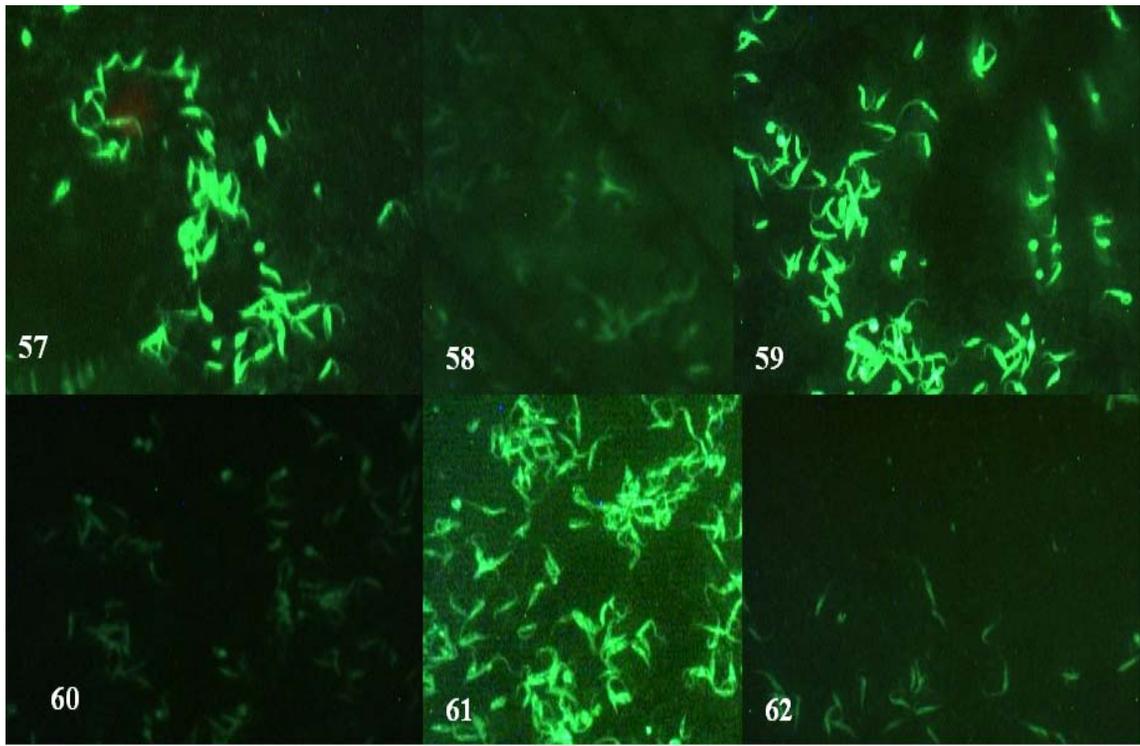
Voller, A.; Draper, C.; Bidwell, D. y Bartlett, A. 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. Lancet, 1: 426- 428.

Zicker, F.; Smith, P.; Luquetti, A. y Oliveira, O. 1990. Mass screening for Trypanosoma cruzi infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter paper. Bulletin of the World Health Organization, 66 (4): 465-471.

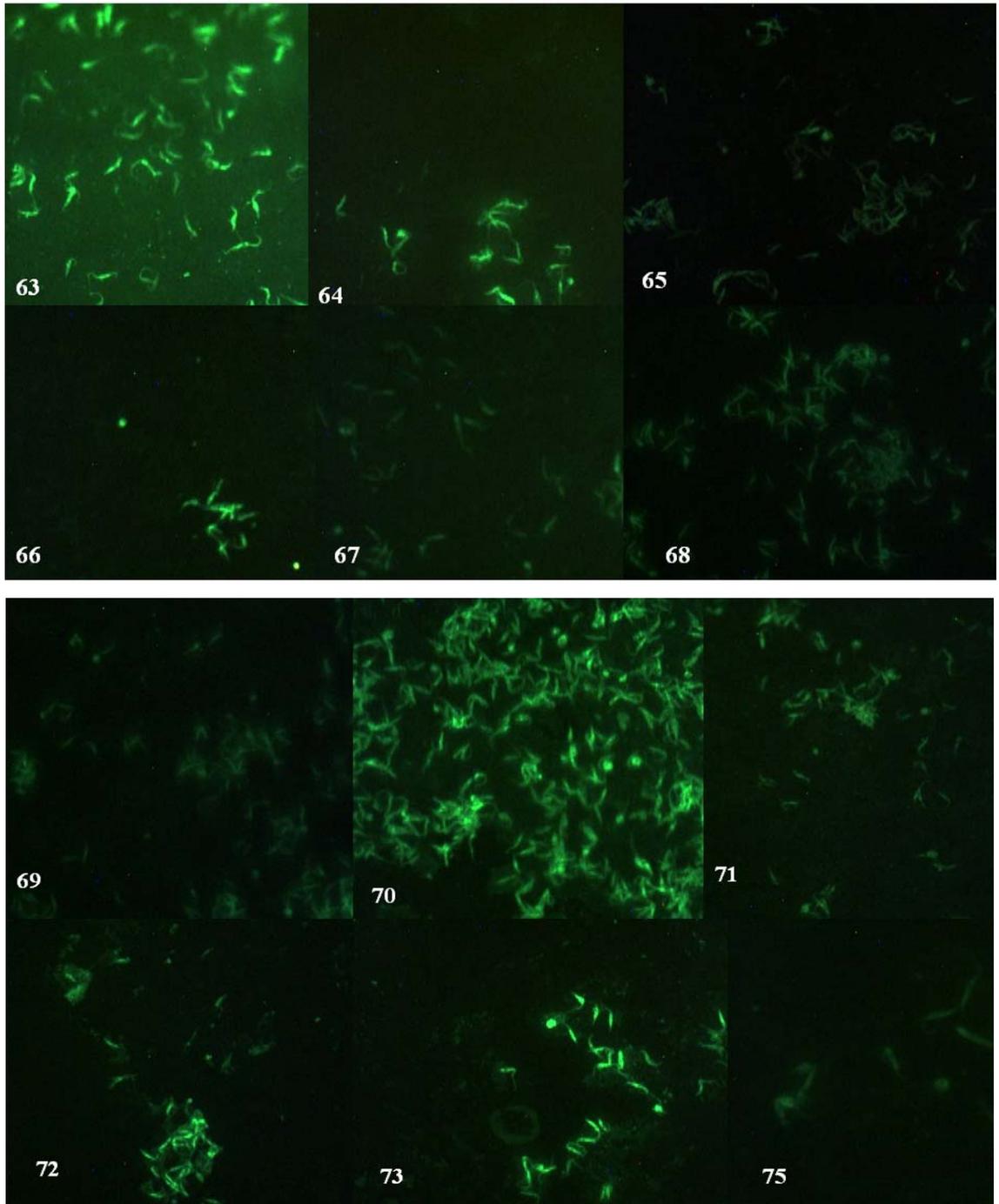
APÉNDICES

1:16		1:32		1:64	
	1:512		1:256		1:128

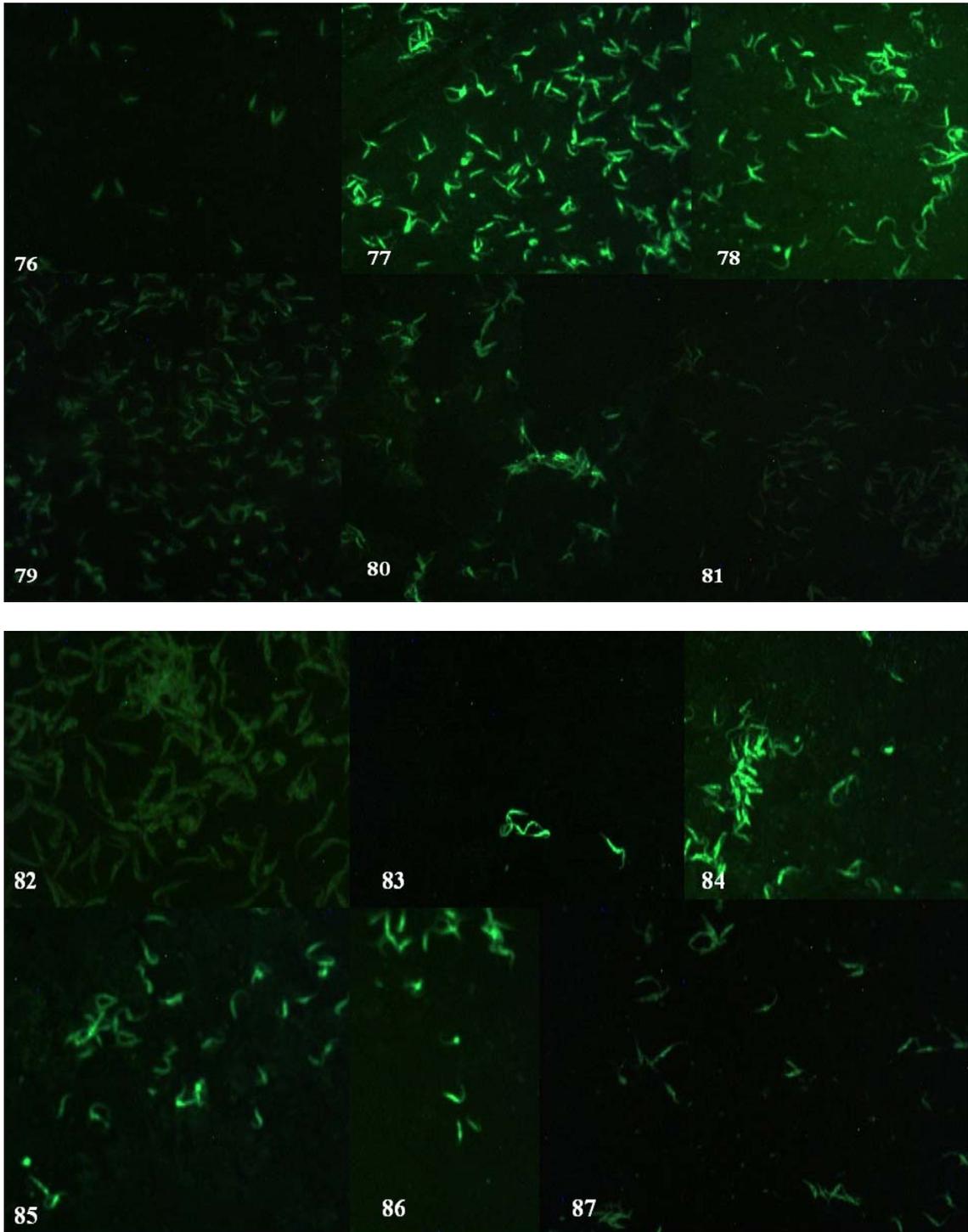
Apéndice 1. Esquema de diluciones donde se colocará el antígeno de T. cruzi en forma alterna dejando una cuadrícula sin antígeno para evitar en lo posible la mezcla de muestras o diluciones



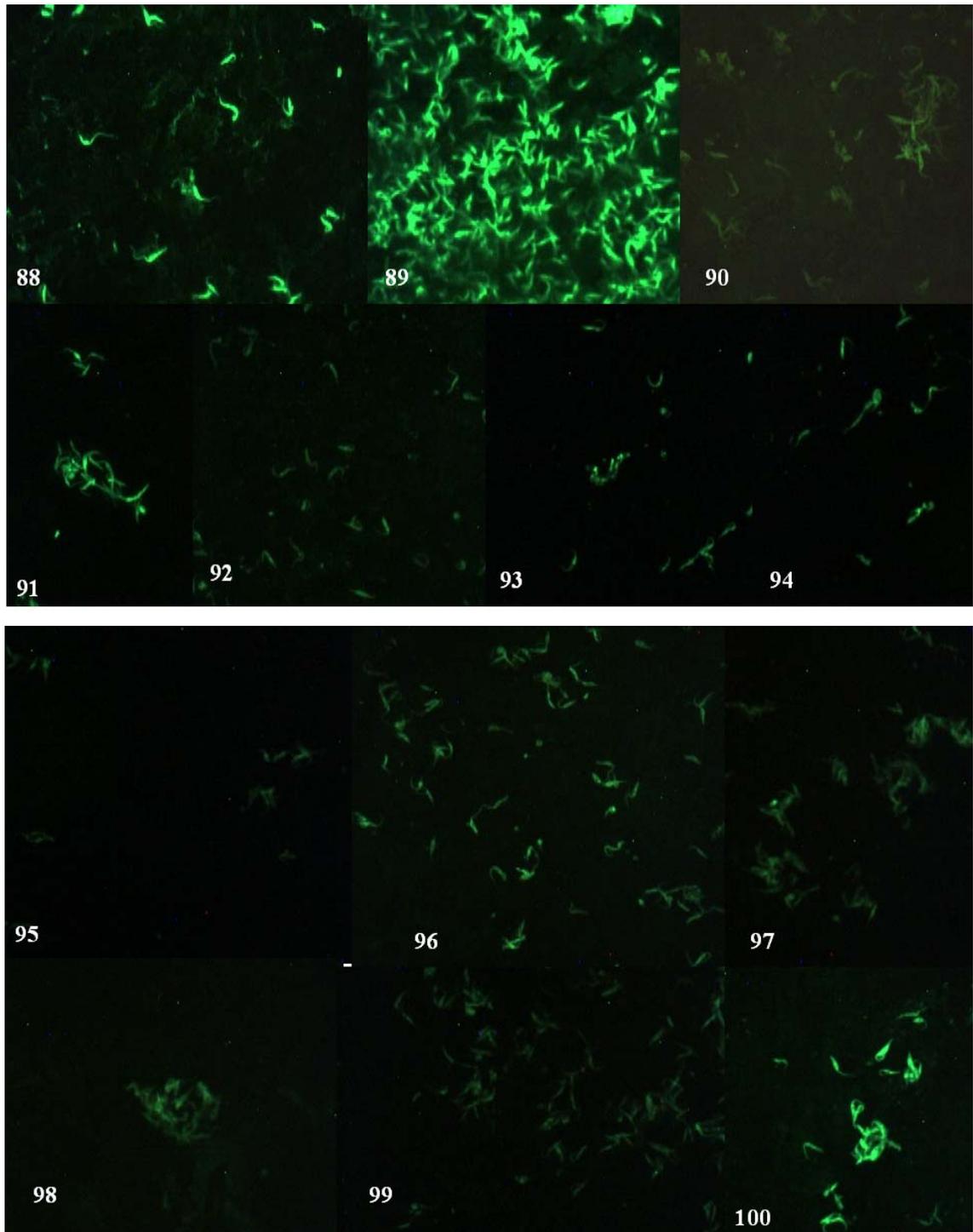
Apéndice 2. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros confirmados de individuos con serología positiva para la infección por *T. cruzi* (muestras 57-62)



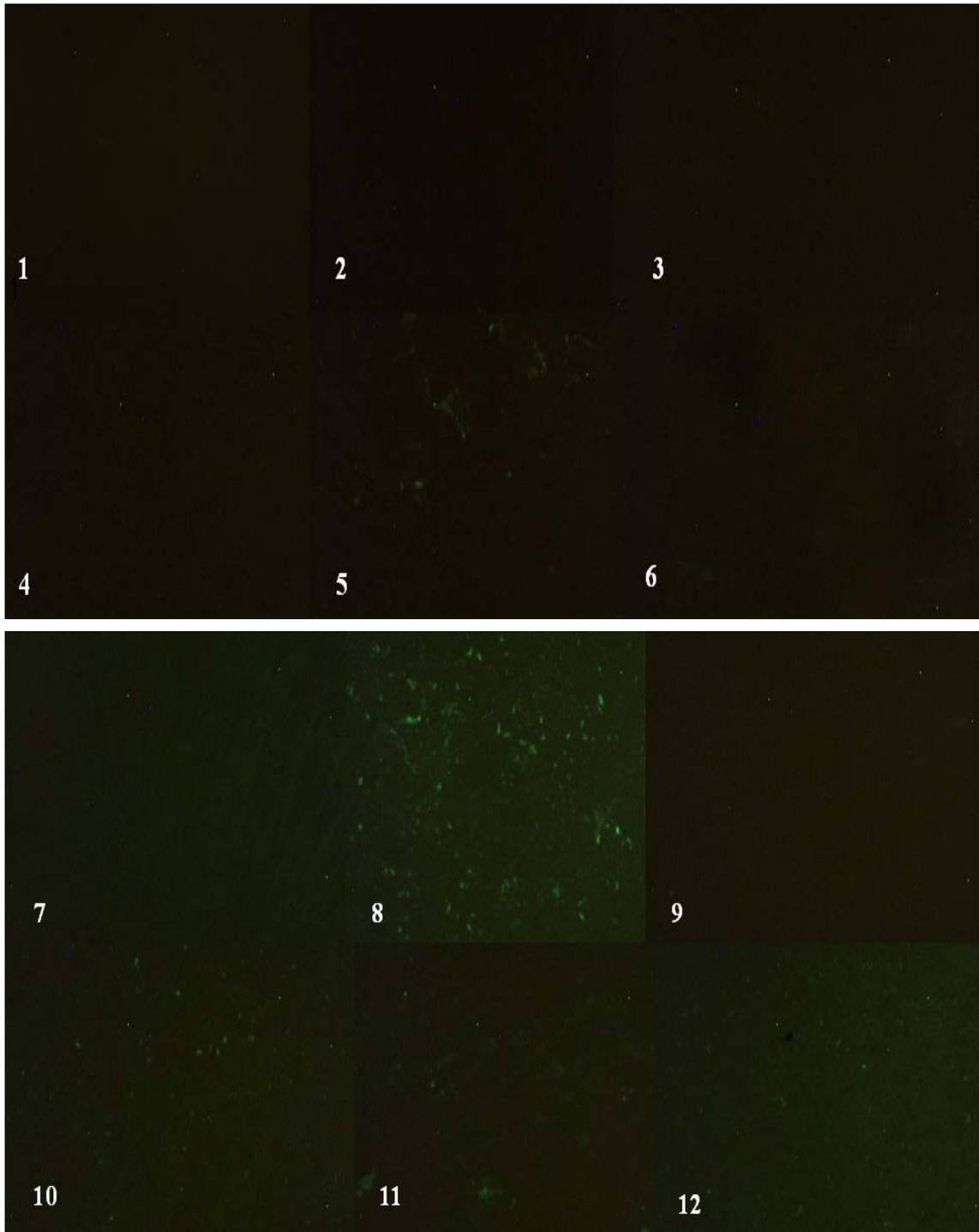
Apéndice 3. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología positiva confirmada para infección por T. cruzi (muestras 63-75)



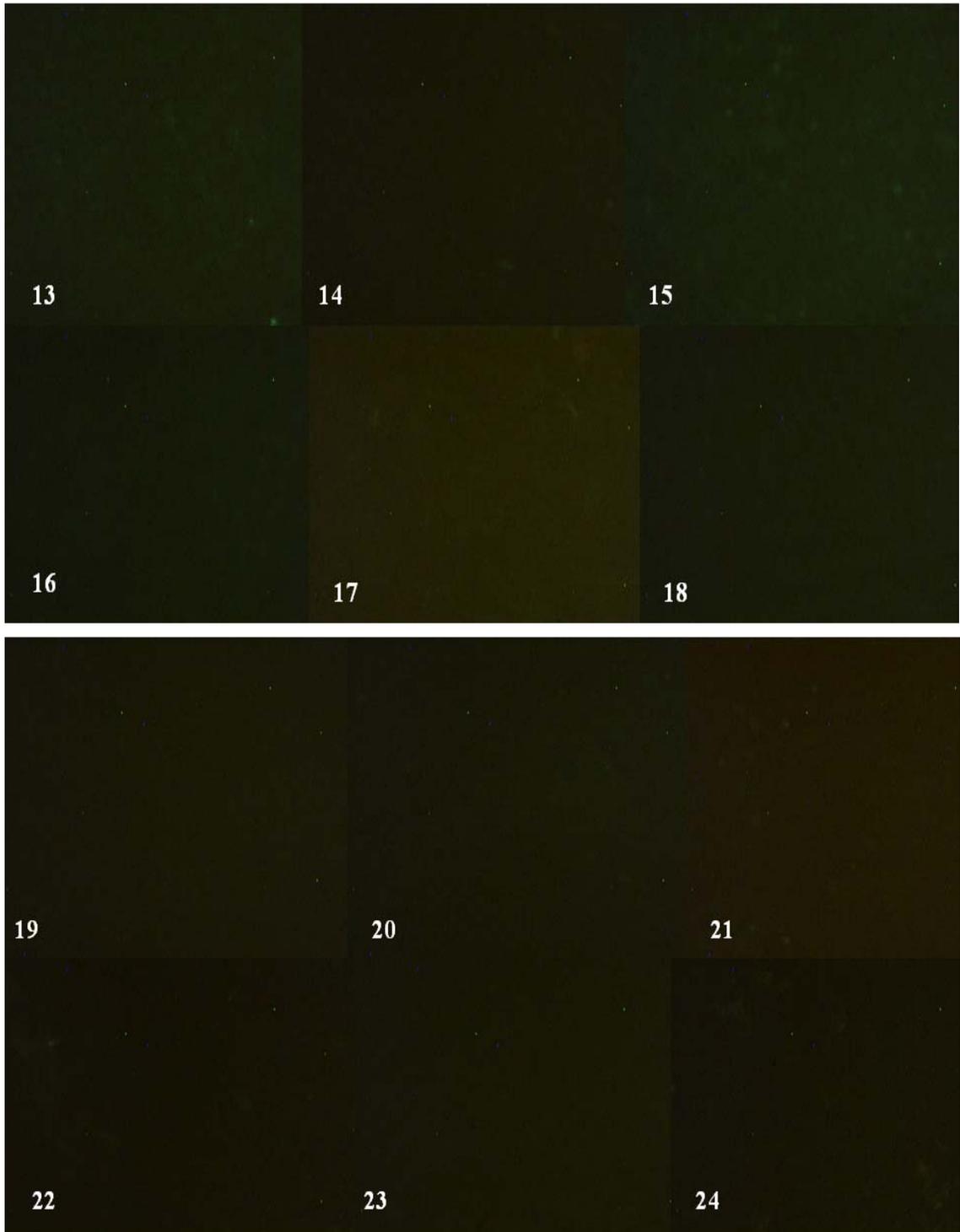
Apéndice 4. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología positiva confirmada para infección por T. cruzi (muestras 76-87)



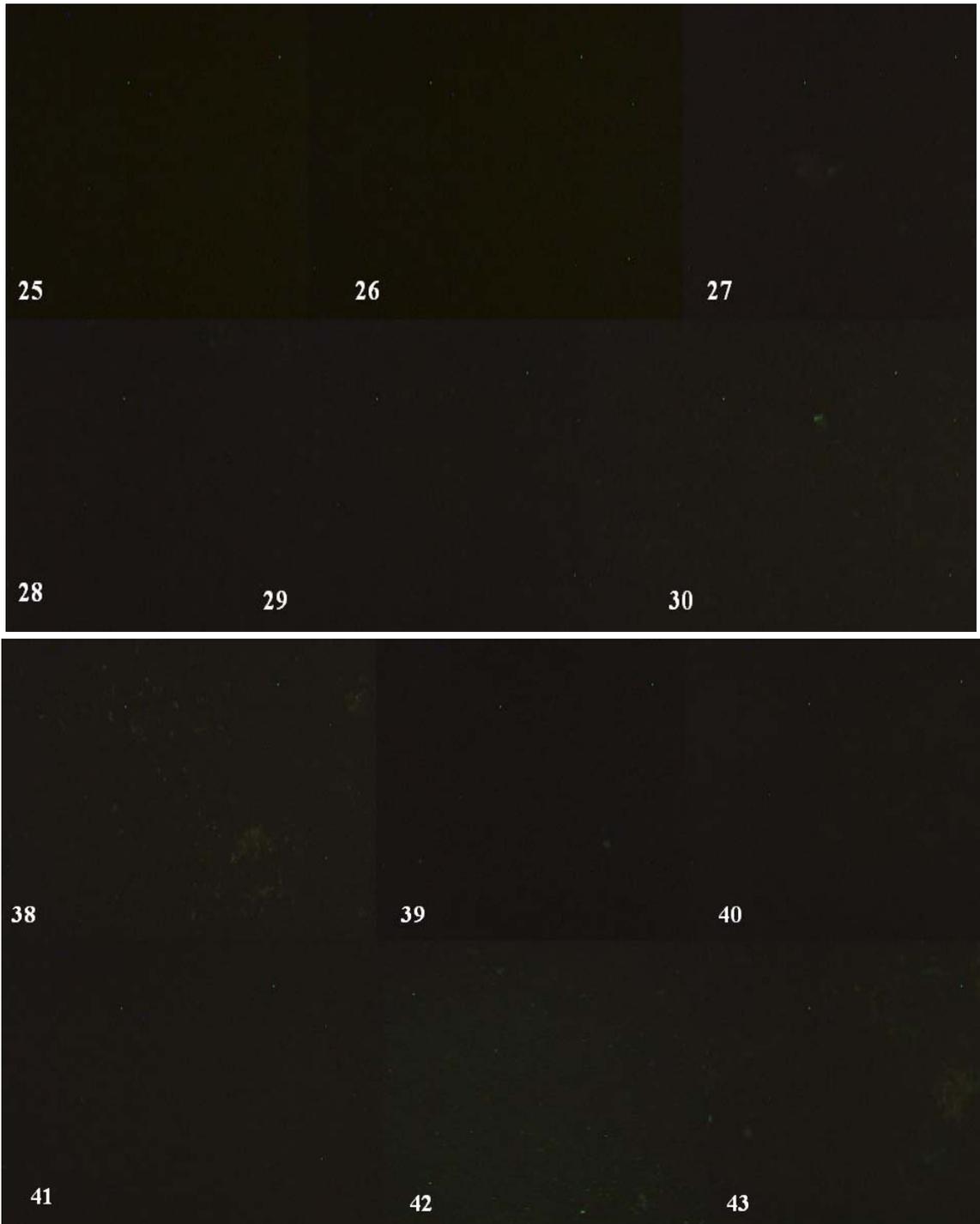
Apéndice 5. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología positiva confirmada para infección por T. cruzi (muestras 88-100)



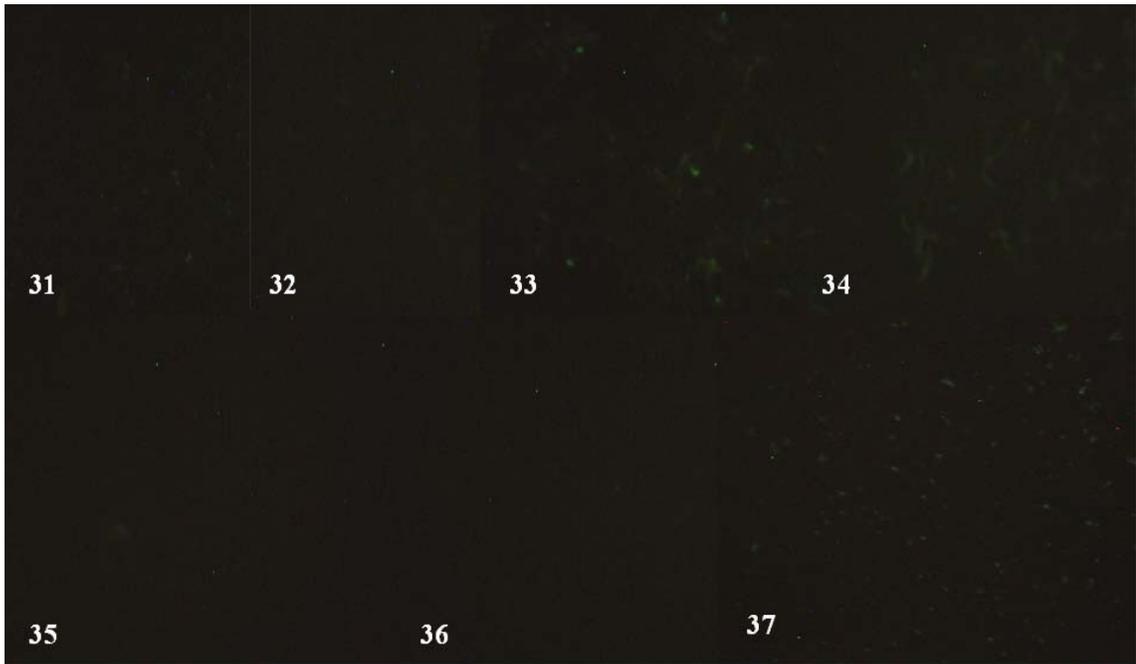
Apéndice 6. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología negativa confirmada para infección por *T. cruzi* (muestras 1-12)



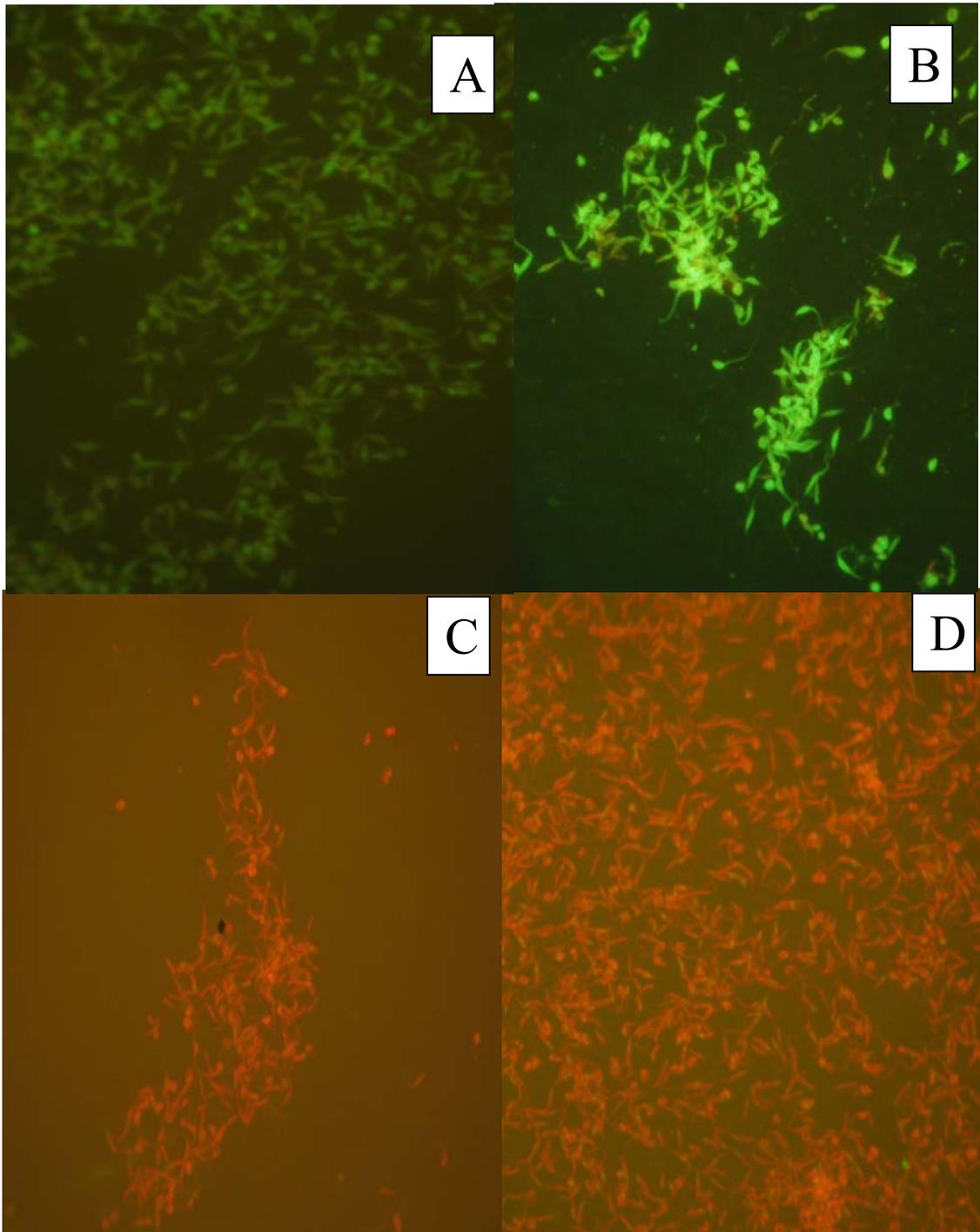
Apéndice 7. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología negativa confirmada para infección por T. cruzi (muestras 13-24)



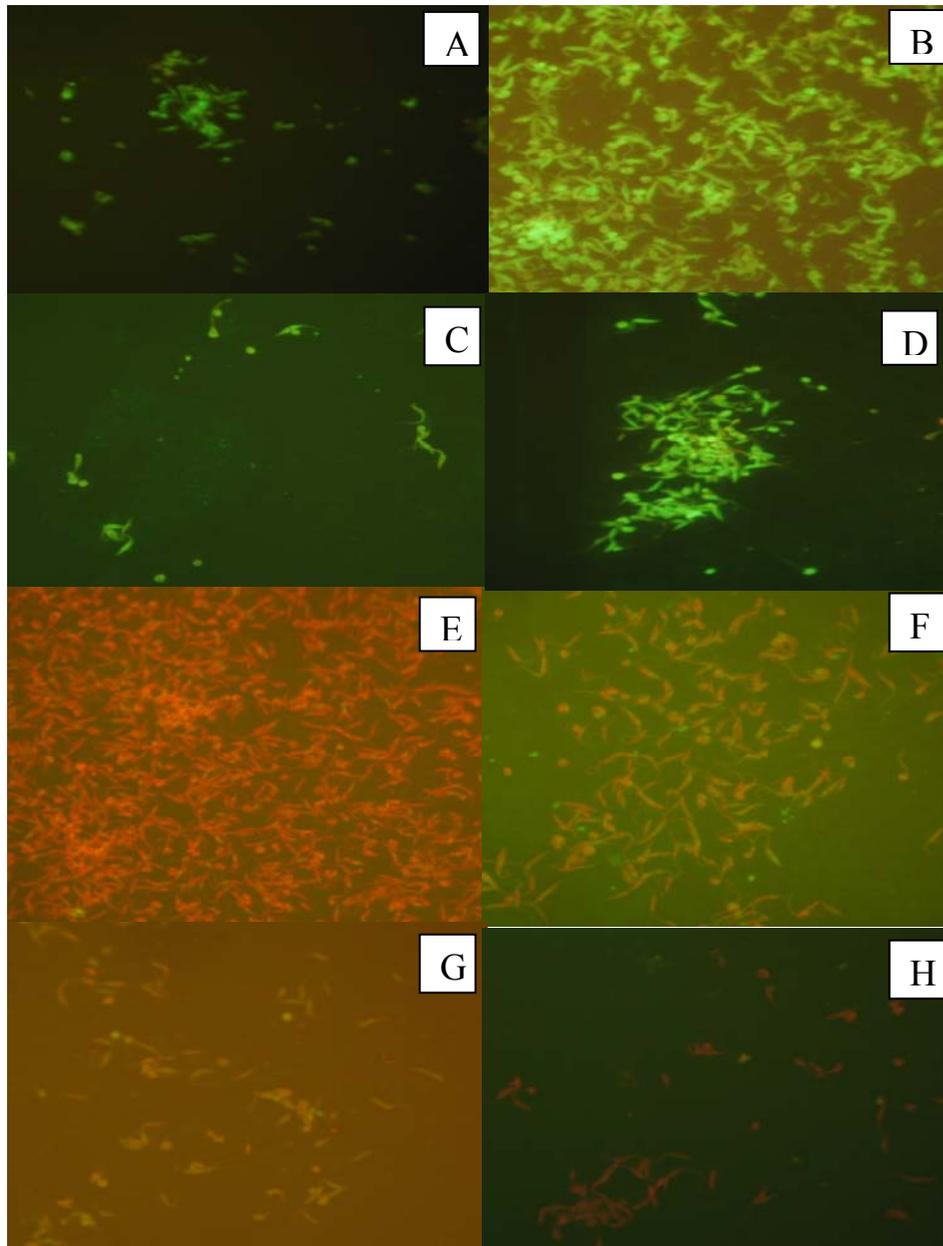
Apéndice 8. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia indirecta estandarizada utilizando sueros de individuos con serología negativa confirmada para infección por T. cruzi (muestras 25-30; 38-43)



Apéndice 9. Resultados falsos positivos de la prueba de inmunofluorescencia indirecta utilizando sueros confirmados con serología negativa para la infección por T. cruzi (muestras 33, 34)



Apéndice 10. Resultados de los controles positivos (A y B) y negativos (C y D) de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi en muestras de sangre eluidas de papel filtro



Apéndice 11. Resultados de los individuos positivos (A-D) y negativos (E- H) evaluados en la comunidad de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre, utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi en muestras de sangre eluidas de papel filtro

Anexo 1
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Participante:

Edad: _____ **Sexo:** _____

Dirección:

Fecha: _____ **Hora:** _____

Yo, _____ **portador (a) de la C.I:**

Por medio de la presente otorgo mi libre consentimiento en participar en el proyecto de investigación titulado: “DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR Trypanosoma cruzi”.

El objetivo de este proyecto es EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR Trypanosoma cruzi.

Declaro que se me ha informado ampliamente, que de acuerdo a los derechos constitucionales que me asisten, mi participación en el estudio es totalmente voluntaria, comprometiéndose los investigadores en preservar la confidencialidad de los datos otorgados, cuyo uso será exclusivo a los fines que persigue esta investigación.

Doy fe, que se hizo de mi conocimiento, que no se ocasionará ningún daño ni molestia a mi persona por la participación en este estudio, por el contrario como beneficios derivados se me efectuará de manera gratuita el análisis serológico para diagnostico de la enfermedad de Chagas, se me informara oportunamente de los resultados obtenidos, se me orientara y se canalizara mi inclusión en los programas de control que adelante el Ministerio del Poder Popular para la Salud en caso de haber seroreactividad.

Hago constar que el presente documento es de mi entero conocimiento, de manera libre y espontánea participo en el proyecto,

Investigador Responsable

Nombre: _____

C.I: _____

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <u>Trypanosoma cruzi</u>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Seijas R, Nairobis Johana	CVLAC	18.400.946
	e-mail	Nairy_169@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Inmunofluorescencia indirecta
<u>Trypanosoma cruzi</u>
Prueba

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se desarrolló y validó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando epimastigotes fijados para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi. La producción de la forma epimastigote de T. cruzi (aislado AU) se realizó en el medio de cultivo de infusión de hígado y triptosa, la colecta de los parásitos se efectuó durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial y se procedió a fijar los parásitos con formaldehído al 2%. Para la estandarización de esta prueba se usaron 49 muestras de sueros confirmados como positivos y 50 negativos para la infección por T. cruzi por tres técnicas serológicas diferentes (ELISA, hemaglutinación indirecta, e IFI). Adicionalmente, para evaluar reacciones cruzadas de la prueba IFI se analizaron 14 sueros provenientes de pacientes confirmados clínica y serológicamente con leishmaniasis cutánea. Se tituló la dilución del antígeno (1:8, 1:16, 1:32), del suero de los pacientes (1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) y del conjugado (1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Asimismo, para la validación de esta técnica, se usaron 50 muestras de sangre en papel filtro, provenientes de la comunidad de Rio Brito, estado Sucre. Igualmente, se evaluaron las muestras de esta comunidad rural por un ELISA casero utilizando epimastigotes fijados. La IFI estandarizada mostró valores de sensibilidad 100% y especificidad superior al 92%, lo que demuestra su utilidad como herramienta para el diagnóstico de la infección por T. cruzi. La seroprevalencia de la infección por T. cruzi por ambas técnicas IFI/ELISA fue alta (16%). Igualmente, se encontró asociación estadística significativa entre la infección por T. cruzi y el reconocimiento del vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas. La utilización de una prueba de IFI estandarizada no ha sido descrita previamente en los laboratorios del estado Sucre, que sólo cuentan con pruebas comerciales tipo ELISA para diagnosticar la infección por T. cruzi, lo cual proporciona una nueva herramienta para el diagnóstico de esta parasitosis.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Berrizbeitia, Mariolga	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6 119 292
	e-mail	mberriz@yahoo.com
	e-mail	
	e-mail	
Guilarte, Del valle	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9306352
	e-mail	Delguifa67@gmail.com
	e-mail	
Guarache, Haideé	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8646555
	e-mail	Haidee_guarache@cantv.bet
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	06	08
------	----	----

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-SEIJAS.DOC	Application/word

Alcance:

Espacial: **NACIONAL** **(Opcional)**
Temporal: **TEMPORAL** **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis.

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIADA

Área de Estudio: Bioanálisis.

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

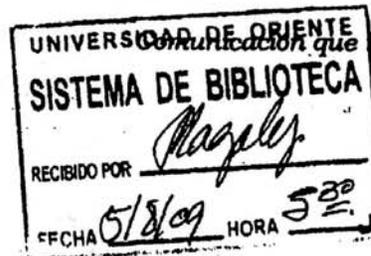
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Cordialmente,

[Signature]
JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO
Secretario

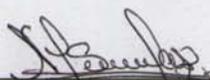


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

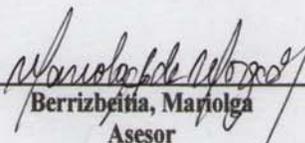
JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

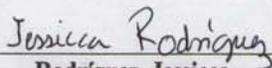
Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Seijas R, Nairobis J
Autor



Berrizbeitia, Mariolga
Asesor



Rodríguez, Jessica
Co- Asesor