

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Desarrollo de un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta
(IFA) local para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

Trabajo de investigación presentado
por Gabriella María Möller Molina
para optar al grado de Licenciada en Biología

Guatemala,

2016

Desarrollo de un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta
(IFA) local para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

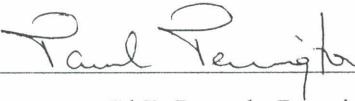
Facultad de Ciencias y Humanidades

Desarrollo de un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta
(IFA) local para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

Trabajo de investigación presentado
por Gabriella María Möller Molina
para optar al grado de Licenciada en Biología

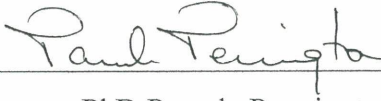
Guatemala,

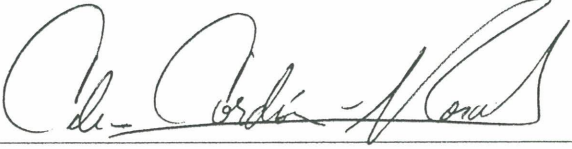
2016

Vo. Bo. : (f) 
PhD Pamela Pennington

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc José Guillermo Juárez

(f) 
PhD Pamela Pennington

(f) 
Lic. Celia Cordón

Fecha de aprobación: Guatemala, 25 de abril de 2016

AGRADECIMIENTOS

A:

La Universidad del Valle de Guatemala, especialmente a todos los catedráticos que ayudaron a mi formación profesional y permitieron que enriqueciera mi conocimiento.

Laboratorio de Entomología Médica del Centro de Estudios en Salud CES-UVG por la oportunidad de llevar a cabo mi tesis en las instalaciones y al proyecto **“Prevalencia de infecciones con *Trypanosoma cruzi* en una región de Guatemala con infestación persistente de triatomíneos (Comapa, Jutiapa, año 2015),”** investigadora principal (IP): Lic. Celia Cordón por el apoyo y financiamiento de la investigación.

Pamela Pennington, Ph.D. y José Guillermo Juárez, MSc. por la asesoría, orientación y apoyo incondicional a lo largo del proyecto.

Al personal del laboratorio, especialmente al Lic. Juan Carlos Lol por el recibimiento y apoyo que me brindaron durante la realización de esta investigación.

Licda. Beatriz López y al Laboratorio de Enfermedades Emergentes por permitir uso del microscopio de fluorescencia sin el cual esta tesis no habría sido posible.

Mi familia, por darme la oportunidad de estudiar en la universidad y por creer en mí siempre.

Mi hermana Daniella Möller, a quien le dedico esta tesis, por ayudarme, acompañarme y ser mi apoyo principal desde el inicio de este camino que emprendimos juntas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODOS	14
III. RESULTADOS.....	29
IV. DISCUSIÓN.....	37
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. LITERATURA CITADA.....	44
VII. ANEXOS	53

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Operacionalización de variables	16
CUADRO 2. Componentes por cada 100ml de medio LIT modificado	18
CUADRO 3. Componentes para la preparación de 1L de PBS	20
CUADRO 4. Disposición de soluciones en placa IFA	24
CUADRO 5. Comparación de intensidad de fluorescencia de las pruebas IFA comercial e IFA UVG	31
CUADRO 6. Sensibilidad, especificidad y cocientes de predicción positivo y negativo para el ensayo IFA comercial e IFA UVG.	34
CUADRO 7. Prueba McNemar para la diferencia en sensibilidades y Prueba Kappa para la concordancia entre los ensayos IFA	35
CUADRO 8. Costo estimado por cada placa del ensayo IFA comercial	35
CUADRO 9. Costo estimado por cada placa del ensayo IFA UVG	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución de la Enfermedad de Chagas alrededor del mundo	4
FIGURA 2. <i>Trypanosoma cruzi</i> en frote sanguíneo	8
FIGURA 3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
FIGURA 4. Densidad de parásitos de placas piloto y optimizadas	21
FIGURA 5. Optimización del ensayo IFA local	22
FIGURA 6. Metodología de los ensayos IFA	25
FIGURA 7. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> aislada de muestra de sangre de caso agudo de la Enfermedad de Chagas detectado en Comapa, Jutiapa, 2015 (magnificación: 200X).	29
FIGURA 8. Controles positivos y negativos de los ensayos IFA comercial (Vircell) e IFA UVG	32
FIGURA 9. Microscopía fluorescente de dos muestras comparando IFA comercial (Vircell) e IFA UVG, dos diluciones cada muestra (1:40, 1:80)	33

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida principalmente por las chinches triatominas. Actualmente afecta a aproximadamente ocho millones de personas en 21 países. El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse mediante la detección directa del parásito en la sangre. Sin embargo, este está limitado a la fase aguda de la enfermedad, la cual ocurre después de la exposición al parásito y dura de cuatro a ocho semanas. Después de esta fase el parásito ya no es detectable en la sangre, por lo que el diagnóstico debe ser inmunológico.

El diagnóstico inmunológico es complejo, ya que aún no se tiene un método estándar para la detección de la enfermedad. Por esta razón se realiza mediante la combinación de dos o más métodos serológicos. La sensibilidad de los distintos métodos es variable según la cepa que se utiliza para producir las pruebas y la región donde se aplican para el diagnóstico.

En este trabajo se desarrolló una prueba IFA local (IFA UVG) utilizando una cepa aislada de Comapa, Jutiapa para luego compararla con una prueba IFA comercial (Vircell, España) en términos de costo y eficacia. Los dos ensayos presentaron una sensibilidad mayor al 94%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de la fluorescencia y sensibilidad de las pruebas, por lo que el IFA UVG es tan eficiente como el comercial para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, es 58% más costoso que el comercial, por lo que su producción a baja escala no es competitiva.

Palabras clave: Chagas, *Trypanosoma cruzi*, diagnóstico, inmunofluorescencia indirecta, IFA, sensibilidad

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is transmitted primarily by triatomine bugs. Presently the disease affects approximately eight million people in 21 countries. The diagnosis of Chagas disease can be performed by the direct detection of the parasite in the bloodstream. However, this is limited to the acute phase of the disease, which occurs shortly after the exposition to the parasite and last from four to eight weeks. After this phase, the parasite is no longer detectable in the blood, therefore the diagnosis must be immunological.

The immunological diagnosis of the disease is complex since there is no standard method for the detection of the disease. Thus, the diagnosis is conducted by a combination of two or more serologic methods. The sensibility of different methods varies depending on the strain used to produce the tests and the region in which said tests are used for diagnosis.

In this work a local IFA was developed (IFA UVG) using a strain isolated from Comapa, Jutiapa in 2015 in order to compare its efficiency and cost to a commercial IFA kit (Vircell, Spain). The two tests showed a sensibility grater than 94%. There were no statistically significant differences in the fluorescence intensity and sensibility of the tests. Thus, the IFA UVG is as efficient as the commercial test for the diagnosis of the disease. However, it is 58% more expensive than commercial test and therefore its small-scale production is not competitive.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Tripanosoma cruzi* y transmitida principalmente por los insectos vectores de la subfamilia Triatominae, comúnmente llamadas chinches triatominas o triatominos (OPS 2009). La transmisión también puede ocurrir por medio de transfusiones sanguíneas, congénita (de madre a hijo), por accidentes de laboratorio o por consumo de alimentos contaminados con el parásito (JICA 2014). Esta enfermedad se conoce como endémica en por lo menos 21 países de América incluyendo Guatemala (OPS 2010b) y se considera una enfermedad desatendida en Latinoamérica debido a la alta morbilidad y mortalidad que ocasiona, especialmente en áreas rurales donde las personas viven en situaciones precarias que propician el contacto con los vectores. (JICA 2014). El diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante la detección del parásito circulando en la sangre o mediante pruebas inmunológicas que detectan los anticuerpos contra el parásito (OMS 2002). En este trabajo se desarrolló una prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* utilizando muestras de sangre de personas de dos grupos etarios del municipio de Comapa, Jutiapa, en Guatemala.

A. Antecedentes

1. Enfermedad de Chagas. La Enfermedad de Chagas, conocida también como Tripanosomiasis Americana, es ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi*,

un protozooario endémico de América que puede infectar humanos y mamíferos salvajes y domésticos (Kirchhoff 2011, JICA 2014). La forma de transmisión principal es la vectorial, la cual representa un 80% de todos los casos de infección. Esta ocurre cuando un vector (chinche triatomina) pica a una persona para alimentarse y sus heces contaminadas con el parásito entran en contacto con la picadura. (OMS 2002, JICA 2014). Esta enfermedad ha sido estudiada desde su descubrimiento en 1909 hasta la fecha (OPS 2009), sin embargo, sigue siendo una enfermedad tropical desatendida, afectando a millones de personas en Latinoamérica y miles de migrantes en Europa, Asia y Norte América (Araujo-Jorge 2010, JICA 2014).

a. Síntomas y signos. Esta enfermedad se presenta en tres fases. La fase aguda es la condición clínica que ocurre de una a dos semanas después de la exposición al parásito y tiene una duración de cuatro a ocho semanas. Se caracteriza por una alta parasitemia, es decir que hay numerosos parásitos circulando en el torrente sanguíneo los cuales son detectables mediante métodos microscópicos (Bern *et al.* 2011, CDC 2014). Los síntomas característicos de la fase aguda incluyen un chagoma (en caso la infección haya sido vectorial), el cual consiste en inflamación en el sitio de la picadura que generalmente ocurre en la cara o extremidades. Si la infección ocurre por los ojos el paciente presenta una inflamación en el párpado superior e inferior conocida como el signo de Romaña (Bern *et al.* 2011). Además, las personas pueden presentar fiebre, pérdida de apetito y malestar generalizado (JICA 2014). La mayoría de los casos son asintomáticos o con síntomas leves. Sin embargo, menos del 1% de personas presentan una fase aguda severa, la cual conlleva un alto riesgo de mortalidad, principalmente en pacientes de menos de dos años (OMS 2002, Bern *et al.* 2011, CDC 2014).

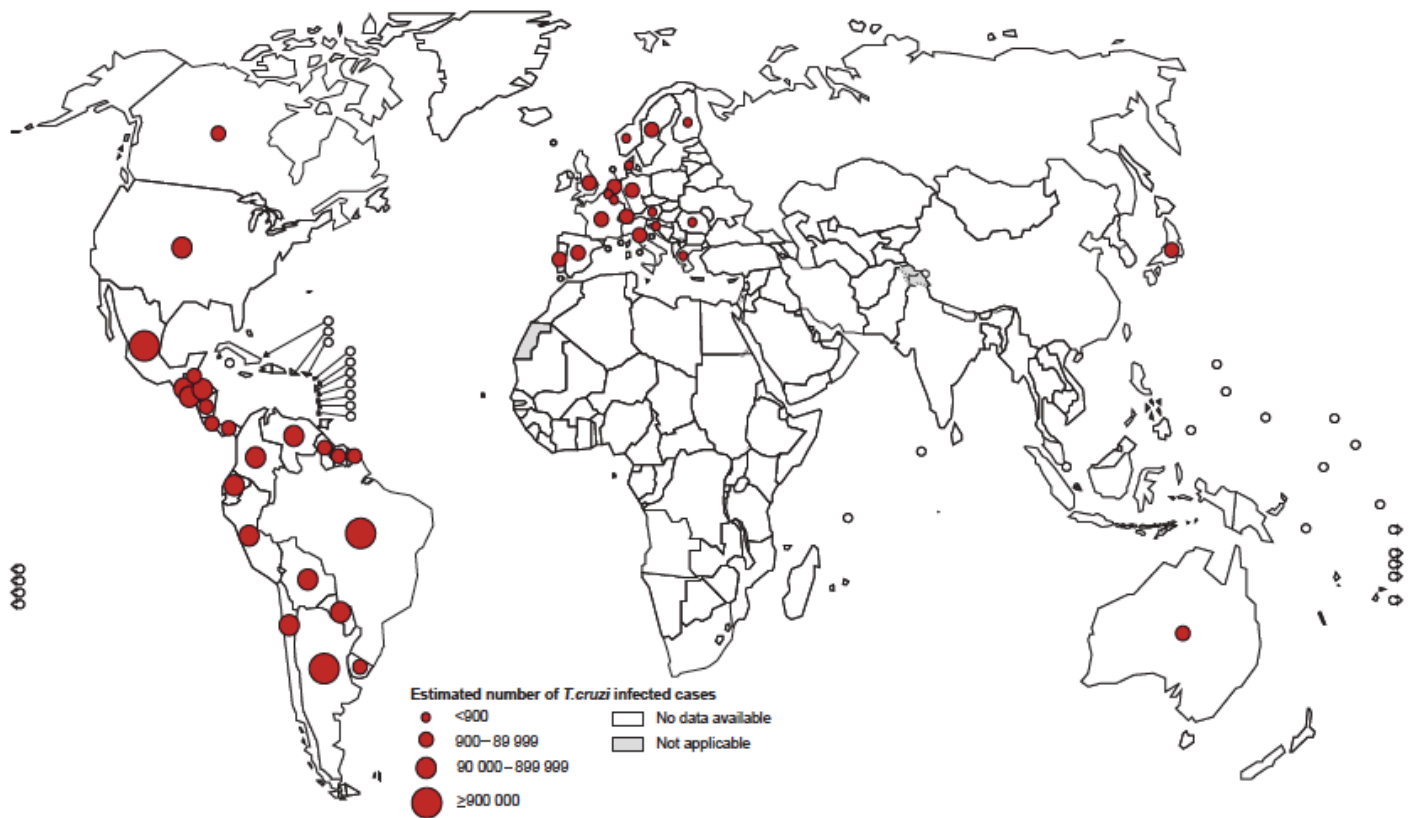
Luego de cuatro a ocho semanas de la infección inicial comienza la fase indeterminada, un estado prolongado y asintomático de la enfermedad que se caracteriza por la disminución de parásitos circulantes en la sangre a niveles

indetectables y un estado de aparente buena salud en la persona infectada. Debido a esto, es posible que las personas nunca sepan que están enfermas. Las personas que presentan esta forma de la enfermedad generalmente tienen entre 20 y 50 años de edad y su mortalidad es la misma que el resto de la población a pesar de que sí presentan ciertas anomalías circulatorias y digestivas (OMS 2002).

Sin embargo, del 20 al 40% de personas desarrollan complicaciones derivadas de la fase indeterminada. Estas pueden ocasionar la muerte, especialmente en personas con sistema inmunológico comprometido (CDC 2014). En estos casos se dice que la persona está en la fase crónica de la enfermedad, la cual se clasifica según las complicaciones que se presenten. La forma cardíaca se caracteriza por cardiomiopatía chagásica, la cual puede ser leve o fatal. En esta pueden presentarse arritmias, tromboembolismo, lesiones miocárdicas, entre otras complicaciones cardíacas y pueden ser acompañadas por daño en el sistema nervioso, por ejemplo anormalidades sensoriales. La forma digestiva de la enfermedad se caracteriza por anormalidades en el esófago y colon llamadas megaesófago y megacolon, así como alteraciones en el funcionamiento estomacal (OMS 2002, CDC 2014).

b. Distribución. La Enfermedad de Chagas ocurre de forma endémica en 21 países de América, desde el sur de Norteamérica hasta Argentina y Chile (OPS 2010b). Sin embargo, como se muestra en la Figura 1, la enfermedad no está limitada a los países endémicos de ocurrencia. Las migraciones desde las áreas rurales hacia las zonas urbanas y desde Latinoamérica hacia otros países han cambiado el patrón epidemiológico de la enfermedad, por lo que su distribución actualmente abarca otros continentes donde la enfermedad no es endémica (OMS 2013, Pinto *et al.* 2010).

FIGURA 1. Distribución de la Enfermedad de Chagas alrededor del mundo.



(Fuente: OMS 2013)

Actualmente existen aproximadamente ocho millones de personas con la Enfermedad de Chagas, con una incidencia anual de 41,000 casos de origen vectorial y 15,000 de origen congénito en el continente. Además, se estima que aproximadamente 12,000 personas mueren al año a raíz de esta enfermedad y que 100 millones de personas están en riesgo de contraerla (OPS 2010b, OMS 2012). Debido a esto, la enfermedad de Chagas se considera una enfermedad desatendida en Latinoamérica (JICA 2014). Además, se considera la enfermedad tropical transmisible más prevalente en Latinoamérica, presentando una mayor carga que malaria y leishmaniasis (OPS 2010b).

1) La enfermedad de Chagas en Guatemala. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que en Guatemala cerca de 250,000 personas se encuentran infectadas con *T. cruzi*, y 2 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad. Anualmente ocurren 2,200 nuevos casos por transmisión vectorial y 400 por transmisión congénita (OPS 2006). Estos casos ocurren principalmente en áreas rurales y pobres del país donde los domicilios están contruidos de forma precaria (e.g. suelos de tierra, paredes de adobe o lodo, etc.) lo cual aumenta el riesgo de infestación vectorial (King *et al.* 2011).

c. Diagnóstico. Durante la fase aguda, cuando el paciente presenta una alta parasitemia, el diagnóstico se realiza mediante la detección del parásito en la sangre. Para esto se realizan exámenes parasitológicos directos como la microscopía de frotos sanguíneos de gota gruesa o fina (OMS 2002, CDC 2014). Adicionalmente existen los métodos Strout, Microstrout y microhematocrito que permiten concentrar los parásitos encontrados en la sangre, así como el hemocultivo que detecta el parásito de forma indirecta (OMS 2002, OMS 2012). Recientemente se ha introducido el diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual amplifica secciones de ADN específicas para *T. cruzi* que permiten determinar la infección en los pacientes (OMS 2002, Bern *et al.* 2011).

El diagnóstico inmonológico se realiza por métodos serológicos y es ampliamente utilizado para la detección de la enfermedad en fase indeterminada o crónica, ya que casi todas las personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan anticuerpos contra el parásito. Entre los distintos métodos serológicos se incluyen la hemaglutinación indirecta (IHA por sus siglas en inglés), inmunofluorescencia indirecta (IFA, IFF o IFI por sus siglas en inglés) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés). En muchos casos se utiliza una combinación de dos pruebas para el diagnóstico definitivo de la infección con *T. cruzi* (OMS 2002). En Guatemala la enfermedad en fase aguda se diagnostica mediante análisis

parasitológicos (frotos sanguíneos, observación en fresco, strout o microstrout) y la fase crónica mediante análisis serológicos (ELISA, hemaglutinación indirecta o pruebas rápidas disponibles comercialmente) (MSPAS 2007).

1) Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA). Las pruebas IFA se basan en la detección de anticuerpos específicos contra un antígeno (en este caso el parásito *T. cruzi*). Para estas pruebas, se fija el antígeno a una placa y se expone al primer anticuerpo no marcado. Posteriormente se expone un anticuerpo secundario marcado con una molécula fluorescente. La unión de éstos produce fluorescencia observable mediante microscopía de fluorescencia, indicando la presencia de anticuerpos contra el antígeno (Litwin y Virella 2007).

d. Tratamiento. La eliminación de *T. cruzi* de las personas infectadas es necesaria para evitar que la enfermedad evolucione y que ocurran complicaciones que amenacen la vida de los pacientes (Urbina 2010). Los medicamentos disponibles actualmente para la enfermedad de Chagas, Nifurtimox® y Benznidazol®, se enfocan en la eliminación de *Trypanosoma cruzi* del organismo de modo que se disminuya la severidad de los síntomas y parasitemia detectable (Bern *et al.* 2011).

2. Control y Prevención. La enfermedad de Chagas es difícil de eliminar en áreas endémicas ya que es una zoonosis, y la transmisión de animales a humanos ocurre de forma natural. Además, el gran número de especies que actúan como reservorio y la ecología de los vectores dificultan el control de la transmisión (OMS 2002, Patterson y Guhl 2010). Tradicionalmente los programas de control llevados a cabo en Latinoamérica se enfocan en el control vectorial mediante el rociamiento residual de insecticidas dentro de los domicilios y áreas cercanas a los mismos. Algunos programas han involucrado también el control de reservorios, tamizaje de bancos de sangre, educación en salud y la modificación estructural de los hogares de

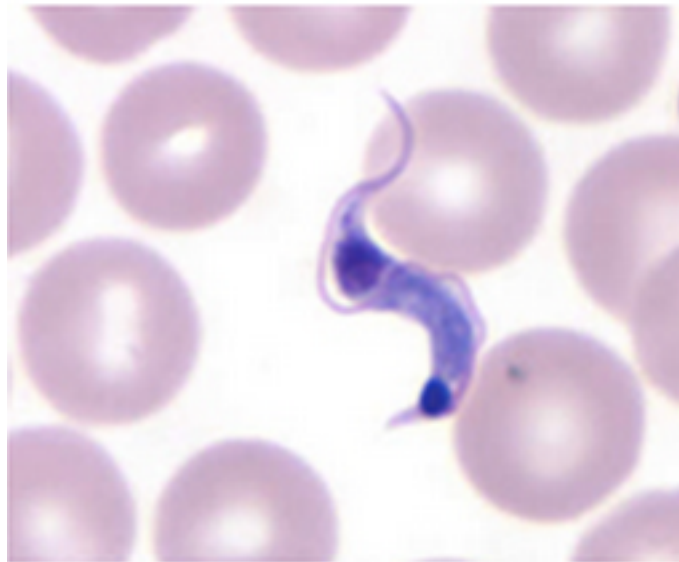
tal modo que no presenten condiciones que promuevan la infestación intradomiciliar de chinches (OMS 2002, Pinto *et al.* 2010, De Urioste-Stone *et al.* 2015).

En Guatemala, el MSPAS realiza acciones de control y prevención de la enfermedad de Chagas a través del Programa Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV/Chagas), el cual ha contado con cooperación de instituciones como la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), entre otras (OPS 2010, King *et al.* 2011). Como parte de las acciones de control se inició en el 2000 un plan de rociamiento sistemático de insecticidas en las áreas endémicas cuyo logro principal fue la eliminación de la transmisión por el vector *Rhodnius prolixus* en el 2008 (OPS 2010a, Hashimoto y Schofield 2012, MSPAS 2011).

El control de *Triatoma dimidiata* se ha realizado en 10 departamentos endémicos para la enfermedad, y se enfoca principalmente en el rociamiento intradomiciliar de insecticidas y encuestas serológicas, así como la vigilancia comunitaria de la enfermedad y programas de mejoramiento de viviendas que previenen la infestación de triatomos (JICA 2014, OPS 2010a). Estas acciones han resultado en la reducción significativa de los índices de infestación intradomiciliar en todos los departamentos endémicos exceptuando Jutiapa (MSPAS 2011). Además de las acciones para el control vectorial, se realiza a partir de la década de 1990 un tamizaje de los donantes de sangre para evitar la transmisión de *T. cruzi* por medio de transfusiones (OPS 2010c). Actualmente se mantiene el tamizaje del 100% de los donantes para la enfermedad de Chagas (OPS 2010a).

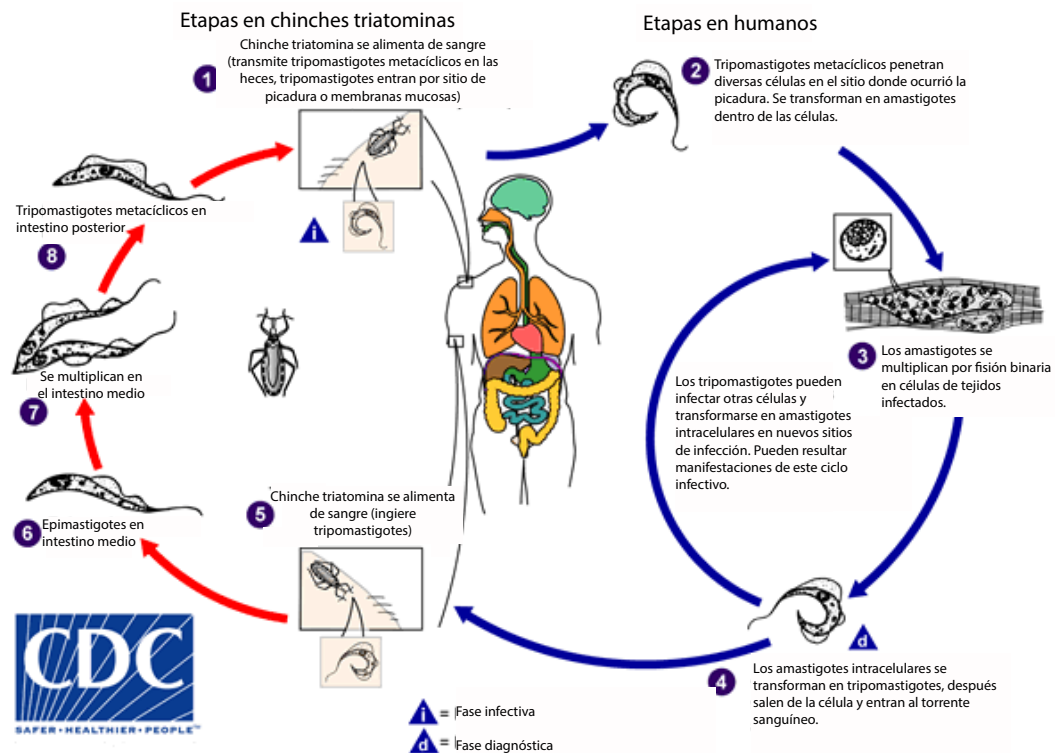
3. *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma cruzi* (Figura 2) es un organismo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida (Filo: Sarcomastigophora, Subfilo: Mastigophora) (OMS 2002). Todas las especies del género *Trypanosoma* son parásitos de vertebrados y comparten una morfología característica dentro de la sangre del huésped. (Hamilton y Stevens 2010).

FIGURA 2. *Trypanosoma cruzi* en frote sanguíneo.



(Fuente: CDC 2014)

El ciclo de vida de *T. cruzi* está estrechamente relacionado con la transmisión vectorial y por ende se relaciona con la biología de las chinches triatominas. Es un ciclo complejo, ya que además de los vectores involucra vertebrados en los cuales puede persistir a largo plazo (Chagas Disease Foundation). El ciclo de vida se divide en dos fases, la primera ocurre dentro del mamífero y la segunda ocurre dentro del vector (CDC 2014).

FIGURA 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

(Traducido de CDC 2014)

Los linajes y diversidad genética de *T. cruzi* se han estudiado desde hace más de 30 años utilizando una amplia variedad de métodos moleculares y marcadores genéticos. Actualmente, la caracterización de la estructura genética de *T. cruzi* se realiza de acuerdo a su agrupación en unidades discretas de tipificación (DTUs por sus siglas en inglés). Los DTUS están formados por cepas del parásito que están más cercanamente relacionados entre ellas que con otras y que pueden identificarse por tener marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos en común (Zingales *et al.* 2009, OMS 2012).

En 1999 se dividieron las cepas en dos grupos, TcI y TcII, teniendo el segundo grupo cinco subgrupos llamados TcIIa-e (Tibayrenc 2003, Pennington *et al.* 2009). En Guatemala se encuentran los dos grupos principales, sin embargo TcI es el

principal causante de la enfermedad crónica en el país (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005), al igual que en México, Colombia, Ecuador y Perú. Por otro lado, los subgrupos TcIIb-e predominan en Paraguay y Chile, mientras que TcIIa se encuentra en Guatemala y Perú (Higo *et al.* 2004). Con el desarrollo de nuevos estudios en la diversidad genética de la especie surgieron cambios en la taxonomía de *T. cruzi*. La nomenclatura actual acordada por expertos divide a las cepas en seis DTUs (TcI- VI). Los nuevos grupos TcI y TcII siguen conteniendo en su mayoría las cepas de los dos DTUs definidos en la taxonomía original. Al igual que con la taxonomía original, cada DTU presenta predominancias geográficas. Por ejemplo, TcII - TcVI son los principales causantes de la enfermedad en el Cono Sur, mientras que en Centroamérica y México predomina el TcI (Higo *et al.* 2004, Zingales *et al.* 2009, OMS 2012).

4. Vías de transmisión de *T. cruzi* .La transmisión vectorial de *T. cruzi* es el mecanismo más importante por medio del cual los humanos son infectados (Kirchhoff 2011), representando cerca del 80% de los casos de infección (JICA 2014). Los vectores del parásito son los insectos de la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae, comúnmente llamados chinches picudas, chinches triatominas o simplemente triatominos. *Triatoma dimidiata* es actualmente el único vector para la enfermedad de Chagas en Guatemala (JICA 2014).

La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por transfusiones de sangre o cualquier producto derivado de ésta, especialmente las plaquetas, así como por trasplantes de órganos provenientes de personas infectadas (Kirchhoff 2011). Además, puede ocurrir de forma congénita cuando una madre infectada da a luz a un neonato infectado. También puede ocurrir transmisión como resultado de accidentes de laboratorio que ponen en contacto el parásito con los ojos, mucosas oral o nasal o heridas en la piel de las personas o cuando un mamífero susceptible (e.g. humanos) ingiere alimentos o bebidas infectados con *T. cruzi*, lo cual resulta en la contaminación de la mucosa oral con los parásitos (OMS 2002).

a. Estudios previos. Algunos departamentos presentan índices altos de infestación intradomiciliar a pesar del éxito de los programas de control y prevención, como es el caso de Jutiapa que tiene un índice de 9.4%, el más alto de todos los departamentos. Existen más de 100 localidades del departamento con índices de infestación de más del 15%, razón por la cual Jutiapa es considerado uno de los departamentos prioritarios para el control de la enfermedad y es uno de los sitios donde se realizan más estudios al respecto en el país. (MSPAS 2011, MSPAS 2012, OPS 2010a).

En el 2012 se llevó a cabo una intervención integral para la reducción del riesgo de transmisión asociado con la infestación persistente de *T. dimidiata* en el municipio de Comapa, Jutiapa. Esta intervención incluyó programas de educación, rociamiento de insecticidas y capacitaciones en el control de roedores, entre otros y fue exitosa en la reducción del riesgo de transmisión dentro del hogar (De Urioste-Stone *et al.* 2015). En el 2015 se inició el proyecto “Prevalencia de infecciones con *Trypanosoma cruzi* en una región de Guatemala con infestación persistente de triatominos (Comapa, Jutiapa, año 2015),” investigadora principal (IP): Licda. Celia Cordón, el cual se basa en la realización de una encuesta transversal a personas del municipio de Comapa, Jutiapa pertenecientes a dos grupos etarios para determinar la prevalencia de la enfermedad en la región.

B. Justificación

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas es complejo ya que a pesar de que existan pruebas efectivas y con alta sensibilidad, aún no se tiene un método estándar acordado por expertos para la detección de la misma, especialmente en la fase indeterminada de la enfermedad. Estudios han reportado que la sensibilidad y especificidad de distintos métodos, como ELISA, IHA e IFA, son muy variables según el estándar de referencia seleccionado para la evaluación de las pruebas

(Alfonso *et al.* 2012) e incluso hay casos donde se consideran inadecuados para su uso como diagnóstico de la enfermedad (Verani *et al.* 2009). Por lo tanto, cada laboratorio de salud debe determinar de forma independiente cuáles serán los métodos que utilizarán para el diagnóstico de los casos agudos y crónicos de la enfermedad. Adicionalmente los centros de diagnóstico modifican y estandarizan las metodologías según sea necesario, lo cual podría implicar pérdida de sensibilidad o especificidad en las pruebas.

Además de predominancia geográfica, las cepas de *T. cruzi* presentan características heterogéneas en términos de morfología, parasitemia, virulencia y patogenicidad que afectan la respuesta del parásito ante medicamentos y la manifestación clínica de la enfermedad (Monteiro *et al.* 2012). Esto implica que las cepas regionales generan una producción de anticuerpos que podrían mostrar una respuesta variable ante pruebas serológicas preparadas con cepas de distintas localidades. Por esta razón, los kits de diagnóstico disponibles comercialmente pueden dar resultados discrepantes si son preparadas con cepas de diferentes regiones (Bergmann y Aires 2013).

Muchas de las pruebas comerciales disponibles son producidas en países como España o Argentina son preparadas con cepas de origen desconocido y por ende su desempeño en regiones donde las cepas son distintas puede ser subóptimo (Sánchez *et al.* 2001). De hecho, en Guatemala se utiliza la prueba ELISA Chagatest (WeinerLab, Argentina), la cual es preparada con una mezcla de antígenos recombinantes que pueden provenir de distintas cepas. Además se ha utilizado, la prueba IFA (Vircell, España) la cual utiliza cepas de *T. cruzi* de origen desconocido.

Tomando lo anterior en cuenta, con este trabajo se pretende evaluar si existe una diferencia entre la prueba IFA comercial (Vircell, España) y una prueba desarrollada con una cepa local de tal modo que se determine si la prueba IFA local es una opción

más apropiada para el diagnóstico de la enfermedad en el país y que a su vez permita optimizar el control de la enfermedad en Guatemala al obtener resultados más confiables de diagnóstico.

C. Objetivos

1. Objetivo general

Desarrollar un ensayo de inmunofluorescencia indirecto (IFA) local para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

2. Objetivos específicos

- Cultivar una cepa local de *Trypanosoma cruzi* a partir de sangre completa de humano mediante hemocultivo
- Establecer la metodología IFA local (IFA UVG) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando cepas locales
- Comparar el costo y eficacia de la prueba IFA UVG en relación a una prueba comercial.

D. Hipótesis

1. Hipótesis principal

No hay diferencia significativa en la sensibilidad de la prueba IFA desarrollada en el laboratorio CES-UVG (IFA UVG) y la prueba IFA comercial (Vircell).

II. MÉTODOS

A. Diseño de estudio

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron las muestras del proyecto “Prevalencia de infecciones con *Trypanosoma cruzi* en una región de Guatemala con infestación persistente de triatominos (Comapa, Jutiapa, año 2015),” el cual se describió anteriormente. Específicamente se utilizaron las muestra de sangre completa extraídas de las personas que resultaron positivas y negativas por medio de ELISA recombinante. Dichas muestras fueron proporcionadas de tal modo que no pueden ligarse a la identidad de las personas de las cuales provienen.

B. Selección de muestra

Las muestras a utilizar se colectaron en las mismas localidades y hogares de Comapa, Jutiapa seleccionadas en el proyecto Chagas-OMS realizado en el 2012. Esta selección se basó en el Manual Operativo de Vigilancia y Control Entomológico de la Enfermedad de Chagas. La selección de las casas a incluir dentro de la investigación se hizo probabilísticamente y se basó en la metodología para la vigilancia entomológica definida en el Manual Operativo de Vigilancia y Control Entomológico de la Enfermedad de Chagas, la cual sugiere trabajar con 20 casas de cada localidad (MSPAS 2012). Se agregó un 20% adicional al número de casas encuestadas para compensar por pérdida, resultando en un máximo de 24 casas en 17 localidades y 21 casas en una comunidad (todos los hogares disponibles de dicha localidad), es decir 429 casas en total (De Urioste-Stone *et al.* 2015). Dentro de cada casa se seleccionó una mujer de 15 a 44 años y un niño/a de siete a 14 años para la toma de muestras.

1. Criterios de inclusión y exclusión. No se incluyeron dentro de la muestra aquellos niños/as o mujeres que habían sido previamente diagnosticadas con Enfermedad de Chagas y que se encontraran en tratamiento para la misma y no hayan terminado el proceso de evaluación para seroconversión. Esto con el fin de evitar el diagnóstico como una nueva infección cuando de hecho se trata de una infección preexistente para la cual no ha ocurrido la seroconversión posterior al tratamiento proporcionado.

2. Consideraciones éticas. La investigación “Prevalencia de infecciones con *Trypanosoma cruzi* en una región de Guatemala con infestación persistente de triatomíneos (Comapa, Jutiapa, año 2015),” investigadora principal (IP): Licda. Celia Córdón, fue aprobada por el Comité Nacional de Ética en Salud, con el número de aprobación 27-2014. Dicha aprobación fue ratificada por el Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala con el número de aprobación 100-04-2014.

C. Variables

La operacionalización de las variables de trabajo se muestra en el Cuadro 1 (siguiente página).

CUADRO 1. Operacionalización de variables

<i>Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Nivel de medición</i>	<i>Relación</i>	<i>Dimensión</i>	<i>Indicador</i>	<i>Escala</i>
Efectividad diagnóstica de las pruebas IFA	Sensibilidad y especificidad de cada prueba en relación a la prueba ELISA	Cuantitativa	Razón	Dependiente	Sensibilidad de las pruebas IFA comercial y caser tomando como método de referencia la prueba ELISA	Proporción de resultados positivos detectados con cada prueba IFA en relación a los positivos detectados con la prueba ELISA	Óptima: 90- 100%, Buena 80 - 89%, Regular 70-79%, Mala: menos de 70%
					Especificidad de las pruebas IFA comercial y casera tomando como método de referencia la prueba ELISA	Proporción de resultados negativos detectados con cada prueba IFA en relación a los negativos detectados con la prueba ELISA	

D. Procedimiento

Como parte del proyecto “Prevalencia de infecciones con *Trypanosoma cruzi* en una región de Guatemala con infestación persistente de triatomíneos (Comapa, Jutiapa, año 2015)”, se le realizó una prueba ELISA de tercera generación (IgM e IgG) Chagatest recombinante v. 3.0 (WeinerLab, Argentina) a muestras de sangre en papel filtro y suero. Los resultados de esta prueba se utilizaron para el desarrollo de esta tesis.

1. Pruebas de inmunofluorescencia indirecta

a. IFA comercial. Las muestras de sangre de los sujetos utilizadas para la prueba ELISA recombinante se almacenaron en tubos a -20°C hasta que fueran utilizadas para la prueba comercial Chagas IFA IgG + IgM (Vircell, España), la cual consiste en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA por sus siglas en inglés). Se siguieron las instrucciones del fabricante (ver Anexo 1 en sección de Anexos) para la realización de los ensayos. Los lavados rápidos con agua doble destilada o PBS se realizaron con una pipeta plástica y las sumersiones en PBS se realizaron en un recipiente para tinciones histológicas (Figura 6).

b. Desarrollo de IFA local (IFA UVG)

1) Cultivo de *T. cruzi*. Se cultivó una cepa de *T. cruzi* aislada de un caso agudo en el 2015 de Comapa, Jutiapa en medio LIT-FBS, compuesto por medio LIT modificado suplementado con suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés). El medio LIT modificado se preparó en base a la composición mostrada en el

Cuadro 2. Se disolvió la infusión de hígado, triptosa, cloruro de potasio, cloruro de sodio y fosfato de sodio en 60ml de agua y se esterilizó por autoclave. Luego se disolvió la dextrosa en 40ml de agua y se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 μ m (Naglene). Se mezclaron las dos soluciones estériles y se agregaron 400 μ l de solución de hemina (su preparación se muestra en el Cuadro 2). Finalmente se ajustó el pH a 7.2 con NaOH o HCl 0.1N. Este medio base se almacenó a 4°C hasta ser utilizado por un tiempo máximo de 2 meses.

CUADRO 2. Componentes por cada 100ml de medio LIT modificado

Componente	Cantidad (g)
Infusión de hígado (DIFCO Laboratories)	3.5
Triptosa (DIFCO Laboratories)	0.5
Cloruro de sodio (Merck)	0.4
Cloruro de potasio (Fischer Scientific)	0.04
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Sigma)	0.8
Dextrosa (Sigma)	0.2
Hemina (solución stock)*	0.4

* preparada con 50g de hemina en 10 ml de agua destilada estéril

Un día antes de realizar los cultivos se prepararon alícuotas de 40ml del medio base y se suplementaron con Penicilina-Streptomina (100 unidades/ml, Gibco) y con FBS inactivado al 5% (Sigma). Como control de calidad se colocó 1ml de cada medio LIT-FBS en un microtubo y se incubó a 37°C por una noche. Luego se revisó en el microscopio para asegurar que no existía crecimiento de hongos o bacterias.

El cultivo se preparó inicialmente a partir de sangre obtenida de un paciente en fase aguda almacenada en un tubo con heparina. Se colocaron 5ml de sangre en un tubo y se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos. Se descartó el plasma y se agregaron 5 ml de medio LIT-FBS y se incubó el cultivo a 26-27°C por una noche. Al día siguiente se formó un sedimento y la fase líquida se transfirió a un nuevo tubo al cual se le agregó medio fresco. El cultivo se mantuvo en una incubadora a 26-27°C y se monitoreó mensualmente mediante microscopía.

A partir de este hemocultivo se realizaron subcultivos para la preparación de la prueba IFA. Estos se hicieron al trasladar de 500ul del cultivo inicial a 5 ml de medio fresco. Dichos subcultivos se mantuvieron en la incubadora a 26-27°C y se monitorearon semanalmente mediante microscopía para determinar la fase de crecimiento de los parásitos.

Además de realizar cultivos con medio LIT-FBS, se hicieron pruebas preliminares para evaluar cultivo del parásito en un medio LIT alternativo. Este se suplementó con orina humana en lugar de suero bovino fetal (FBS), ya que se ha encontrado que puede actuar como un sustituto económico que promueve el crecimiento *in vitro* de algunas cepas del parásito (Ferreira *et al.* 2007). Para preparar este medio se utilizaron 5ml de medio base suplementado con 500µl orina humana previamente filtrada con una membrana de 0.22µm para obtener una concentración de orina del 9%. Al igual que con el medio LIT-FBS, se llevó a cabo un control de calidad antes de iniciar el cultivo. Los resultados preliminares de esta prueba indican que la orina sí permite el crecimiento del parásito, sin embargo, los parásitos mueren luego de 10 días. Es posible que la concentración de orina haya sido muy alta y haya inhibido el crecimiento del parásito. Debido a esto se realizaron todos los cultivos necesarios para la prueba IFA con el medio LIT-FBS.

2) Preparación de placas con antígeno. Para preparar las placas de antígeno fue necesario eliminar los restos de medio de cultivo con un lavado de solución amortiguadora con fosfatos (PBS por sus siglas en inglés). Se preparó el PBS con base en los componentes mostrados en el Cuadro 3 (Bishop, CDC, datos no publicados), los cuales se pesaron en una balanza analítica y se disolvieron en 800ml agua doble destilada estéril. Se ajustó el pH a 7.2 con NaOH o HCl 0.1N y luego se ajustó el volumen a 1L y se midió el pH de nuevo. Finalmente se esterilizó con autoclave y se almacenó a 4°C. Es importante mencionar que esta solución debe prepararse con agua doble destilada, ya que inicialmente se utilizó un PBS preparado con agua desmineralizada, lo cual esto resultó en la lisis celular de los

parásitos, posiblemente porque el uso de agua desmineralizada ocasionó que la solución no fuera isotónica con respecto a los parásitos. Por lo tanto, fue necesario preparar nuevamente el PBS con agua doblemente destilada para mantener la integridad de los parásitos. A continuación se describe el procedimiento del lavado y preparación de placas con antígeno.

CUADRO 3. Componentes para la preparación de 1L de PBS

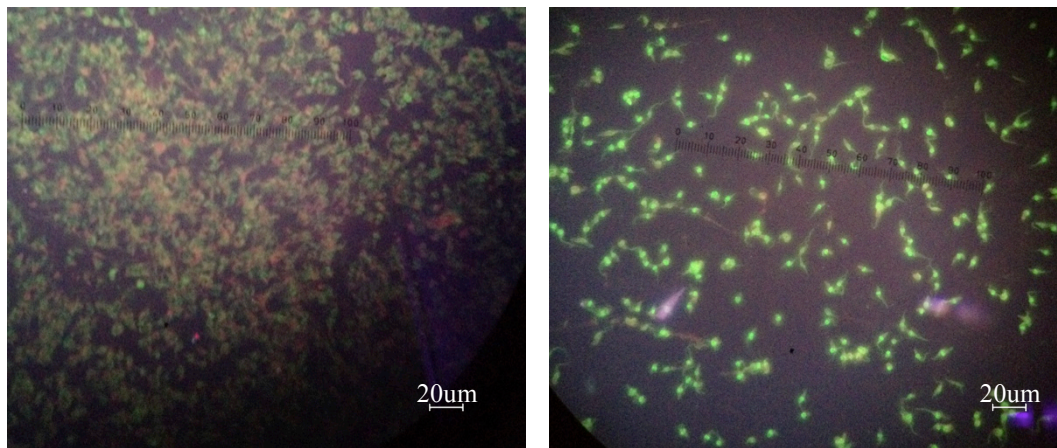
Componente	Cantidad (g)
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Sigma)	15.3
Fosfato de potasio monobásico (Sigma)	2.45
Cloruro de sodio (Merck)	4.25

La preparación de placas de antígeno se realizó con base al protocolo descrito por Bishop (CDC, datos no publicados) para ensayos de inmunofluorescencia. Se colocaron 20ml de cultivo de *T. cruzi* en fase epimastigote previamente preparado (7 días de crecimiento) en un tubo con 20 ml de PBS pH 7.2 y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 18°C (Hettich Zentrifugen EBA 12R, radio de rotor 99mm). Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado cuatro veces adicionales (cinco lavados en total). Finalmente se eliminó el sobrenadante del último lavado y se resuspendió el sedimento en 5-10ul de PBS pH 7.2 utilizando una pipeta serológica. Se colocaron 5ul de la suspensión celular en una celda de una placa de inmunofluorescencia indirecta. Dicha celda se revisó en un microscopio de alta magnificación (400X) para evaluar la densidad de parásitos por campo. En caso de que se observaran más parásitos de los necesarios, se diluyó la suspensión celular con PBS hasta obtener el número de células deseado por campo. Luego de agregar el antígeno a cada celda de la placa, se dejaron secar las placas a temperatura ambiente. Estas placas se almacenaron a -20°C envueltas en papel para tareas delicadas y dentro de bolsas con zíper de tal modo que estuvieran protegidas de la humedad.

Inicialmente se prepararon las placas con aproximadamente 90 células por campo, sin embargo al evaluar las placas con los controles positivos se determinó que la

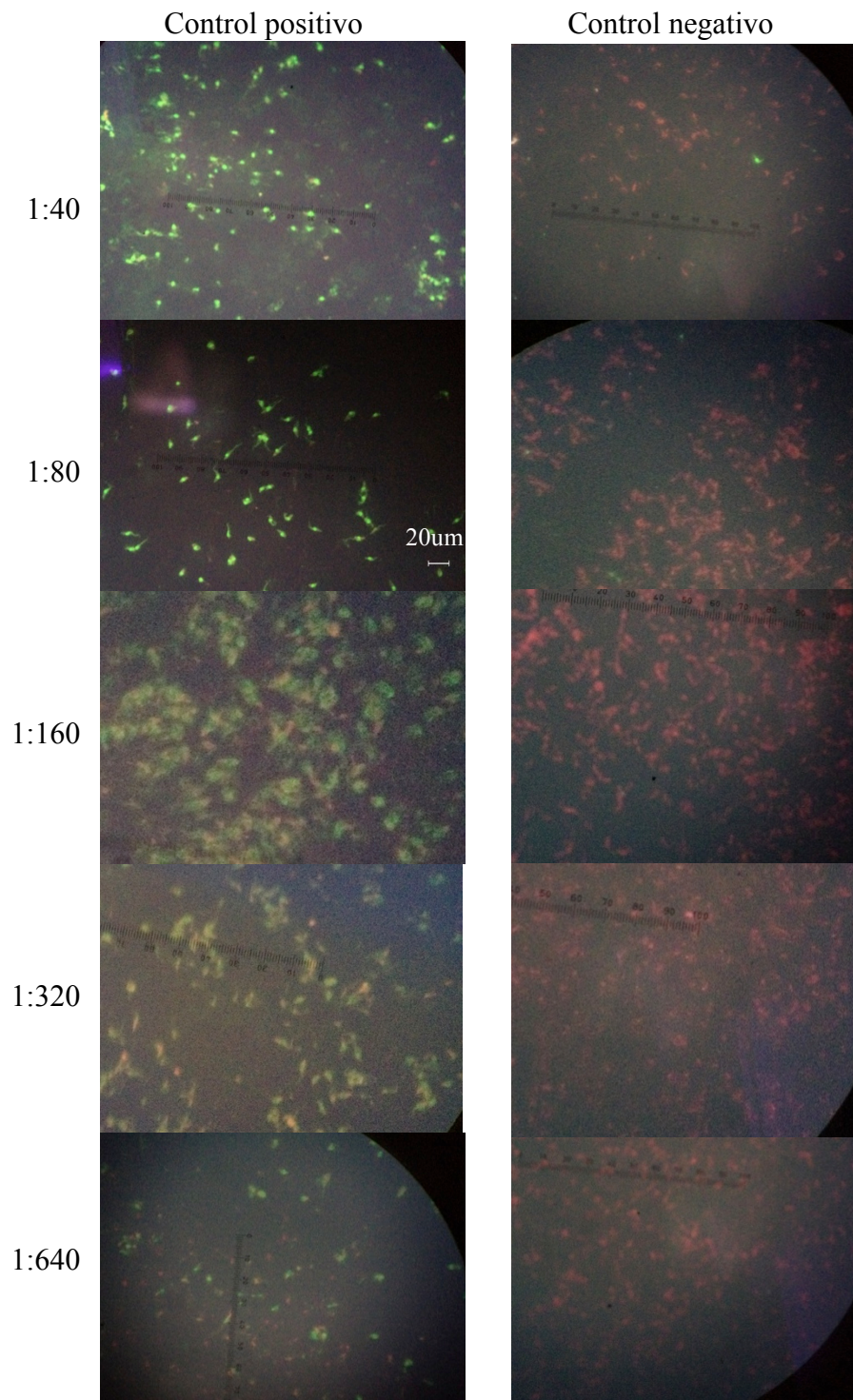
concentración de parásitos era muy alta y por lo tanto no se podían comparar los resultados con la prueba comercial. Fue necesario optimizar el método y preparar nuevas placas con 40 a 50 células por campo microscópico en alta magnificación (400X), ya que se determinó que esta era la densidad aproximada del kit comercial (Figura 4).

FIGURA 4. Densidad de parásitos de placas piloto y optimizadas del ensayo IFA local. Placa piloto (izquierda) y placa optimizada (derecha) (200X).



3) Elaboración de ensayo IFA UVG. Como parte de la optimización del ensayo IFA local, se evaluó si las placas preparadas localmente detectaban correctamente el anticuerpo y se determinó la dilución a utilizar para los controles. Como control positivo se utilizó el suero positivo proporcionado por el Laboratorio del Hospital Regional de Jutiapa. Dicho suero fue confirmado previamente como positivo mediante tres métodos distintos. Como control negativo se utilizó un suero confirmado negativo mediante dos métodos distintos. Se evaluaron ocho diluciones seriadas de cada control (1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640). Con base en estas pruebas se determinó que la dilución óptima para el control positivo era de 1:80, ya que permitía observar fluorescencia en todos los parásitos sin mostrar fluorescencia en el fondo (posiblemente ocasionada por la alta concentración de anticuerpos). Todas las diluciones evaluadas del control negativo mostraron los resultados esperados, por lo que seleccionó la dilución 1:80 al igual que el control positivo (Figura 5).

FIGURA 5. Optimización del ensayo IFA local. Evaluación de diferentes diluciones de los controles del ensayo (400X).



Se evaluaron las mismas diluciones utilizadas del ensayo IFA comercial para la metodología del ensayo local para lograr una mayor comparabilidad entre las pruebas. Por esta razón no se evaluaron todas las diluciones recomendadas por el protocolo de inmunofluorescencia utilizado como base para la preparación de las placas (Bishop, CDC, datos no publicados). Del mismo modo, se adaptaron los tiempos de lavado del protocolo local para que fueran los mismos que el IFA comercial.

En microtubos de 1.5 ml se prepararon las siguientes diluciones de los sueros con PBS: suero control positivo 1:80, suero control negativo 1:80 y sueros desconocidos 1:40 y 1:80. Se sacaron las placas del congelador y se mantuvieron dentro de las bolsas plásticas hasta alcanzar la temperatura ambiente para evitar la formación de condensación sobre los antígenos. Se agregaron las diluciones preparadas en cada pozo de la placa según se muestra en el Cuadro 4. Se colocaron las placas dentro de una caja plástica con un papel húmedo en el fondo y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Se enjuagó cada placa brevemente con PBS.

En las pruebas iniciales el lavado se realizó con una micropipeta (succionando y liberando la solución suavemente sobre cada celda), sin embargo, este método de lavado ocasionó que los parásitos se lavaran de las celdas. Por lo tanto se modificó el lavado y se realizó con una pipeta plástica, dejando caer cuidadosamente la solución sobre la placa completa) y luego sumirgiendo las placas por 10 minutos en PBS. Después de esto se enjuagaron brevemente con agua doble destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente (Figura 6).

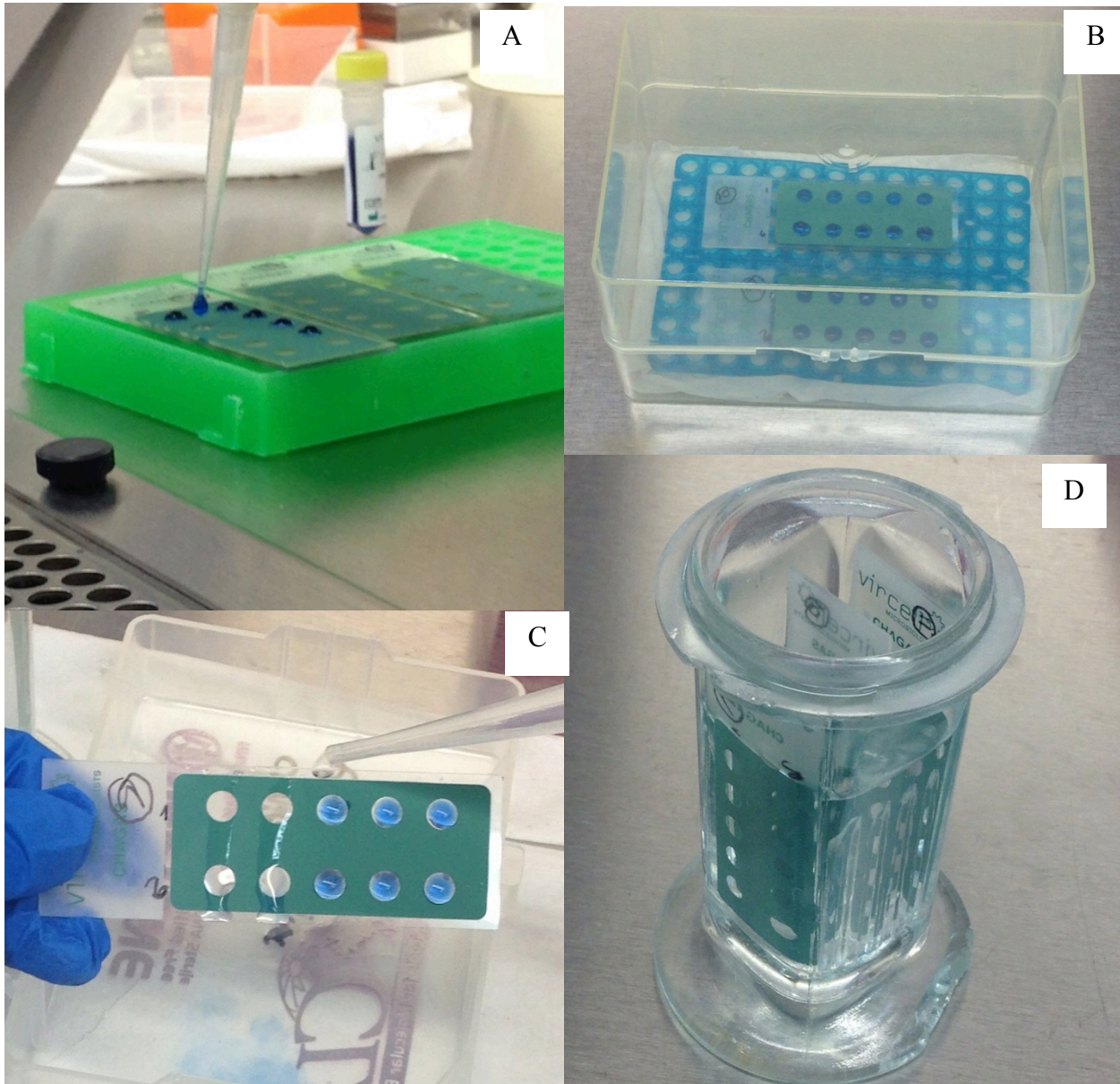
CUADRO 4. Disposición de soluciones en placa IFA

Pozo	1	2	3	4	5
Muestra	Muestra A 1:40	Muestra A 1:80	Muestra B 1:40	Muestra B 1:80	Control Positivo 1:80
Pozo	6	7	8	9	10
Muestra	Muestra C 1:40	Muestra C 1:80	Muestra D 1:40	Muestra D 1:80	Control Negativo 1:80

Posteriormente, a cada pozo se le agregó 25ul de conjugado anti-IgG humano FITC diluido 1:1000 en PBS con Azul de Evans 1% (Fischer Scientific). Se incubaron las placas a 37°C por 30 minutos y se enjuagaron con PBS de la misma forma descrita arriba. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se montaron la placas agregando una gota pequeña de glicerol amortiguado a pH 9.0 en cada pozo y luego cubriéndolos con un cubreobjetos. Se observaron las placas con una magnificación 400X en un microscopio de fluorescencia inmediatamente después de terminar su preparación o se almacenaron a 4°C en un recipiente que no permite el paso de luz por un máximo de 24 horas. Se consideraron positivas las muestras con fluorescencia observada en diluciones 1:40 o 1:80.

FIGURA 6. Metodología de los ensayos IFA. A. Adición de suero ó conjugado con micropipeta, B. Incubación dentro de una caja de puntas con un papel humedecido en el fondo. C. Lavado rápido de las placas previo y posterior a la sumersión en PBS. D. Sumersión de las placas en PBS utilizando un recipiente para tinciones histológicas.



2. Comparación de costos de los ensayos IFA. Se realizó una estimación del costo del ensayo IFA UVG con base en todos los materiales necesarios para preparar los componentes que incluye el kit comercial de forma que la comparación entre los costos de cada ensayo fuera equitativa. Por ejemplo, se incluyeron dentro de los costos los reactivos para preparar las placas, pero no se incluyeron los cubreobjetos, micropipetas, microscopio, etc., ya que es material que el kit comercial no incluye. Para la estimación se realizaron cotizaciones a proveedores locales al igual que a proveedores internacionales. Se seleccionó el precio más bajo encontrado para cada producto y se contabilizó la presentación más pequeña del mismo, siempre y cuando alcanzara para producir al menos 100 placas. Esta estimación se hizo según las cantidades mencionadas en la sección anterior. Finalmente se sumó el costo de todos los insumos y se calculó el costo por cada placa al dividir el total dentro de 100 (cantidad por paquete de placas multipozos). El costo por cada placa de la prueba IFA comercial se calculó al dividir el precio dentro del número de placas incluidas en cada kit.

E. Análisis estadístico

1. Selección de muestra para comparación de métodos. El tamaño de muestra aproximado se obtuvo con base al nomograma desarrollado por Malhotra e Idrayan (2010) para calcular el tamaño de muestra para determinar la sensibilidad y especificidad de pruebas médicas. Con esta herramienta, una sensibilidad esperada del 90%, una prevalencia seleccionada del 90% (9 de cada 10 muestras utilizadas para el ensayo serán positivas según los resultados del kit comercial de ELISA) y una precisión absoluta de 0.1 se determinó que el tamaño de muestra necesario es de aproximadamente 40.

Basado en esta estimación, se utilizaron 44 muestras para realizar el ensayo del IFA casero y del IFA comercial. De estas, 39 fueron positivas según la prueba ELISA

comercial y 5 negativas. Esto con el objetivo de tener una prevalencia de cerca del 90% según lo mencionado anteriormente.

2. Comparación de pruebas. Se utilizó el programa SPSS (IBS Statistics for Macintosh) para realizar el análisis estadístico de este trabajo. Se tomaron los resultados positivos y negativos del ELISA como positivos y negativos verdaderos ya que no existe un método de referencia o *gold standard* acordado para el diagnóstico de esta enfermedad. Se hizo una prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparar de forma cuantitativa los niveles de intensidad de la fluorescencia observada entre las pruebas IFA para las mismas muestras. Esta prueba no paramétrica es equivalente a la prueba t para valores dependientes. Mide la diferencia entre la magnitud de valores pareados y utiliza la hipótesis nula que indica que no hay diferencia significativa entre la mediana de la diferencia entre los valores pareados (Berman 2007). En este caso, la magnitud de los valores corresponde a la intensidad de la fluorescencia observada en las muestras. Por lo tanto se asignó un valor numeral a las diferentes intensidades observadas durante la evaluación de las muestras. Se asignó el cero a las muestras negativas (sin fluorescencia), y valores positivos de 0.1 a 3 para muestras con fluorescencia, siendo el 3 el valor correspondiente a la mayor intensidad observada.

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas no paramétricas frecuentemente empleadas en la comparación de la eficacia de pruebas serológicas para detectar la infección por *T. cruzi* (Shah *et al.* 2014, Gamboa-León *et al.* 2011, Gorlin *et al.* 2008, entre otros). Se determinó la sensibilidad y especificidad de los ensayos IFA tomando los resultados de la prueba ELISA como positivos y negativos verdaderos. Se determinó el porcentaje de concordancia entre cada prueba IFA y el ELISA al calcular el porcentaje de muestras con el mismo resultado en ambas pruebas.

Se calculó el coeficiente de predicción positivo ($CPP = \text{sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})$) y el coeficiente de predicción negativo ($CPN = (1 - \text{sensibilidad}) / \text{especificidad}$); índices que combinan la sensibilidad y especificidad en un solo valor. El valor del CPP es mayor cuando tanto la especificidad como la sensibilidad son cercanos a 1, por lo que mientras mayor sea el valor CPP, más efectiva es una prueba de diagnóstico. De forma opuesta, mientras menor sea el valor del CPN más efectiva es la prueba de diagnóstico (Karimollah 2013)

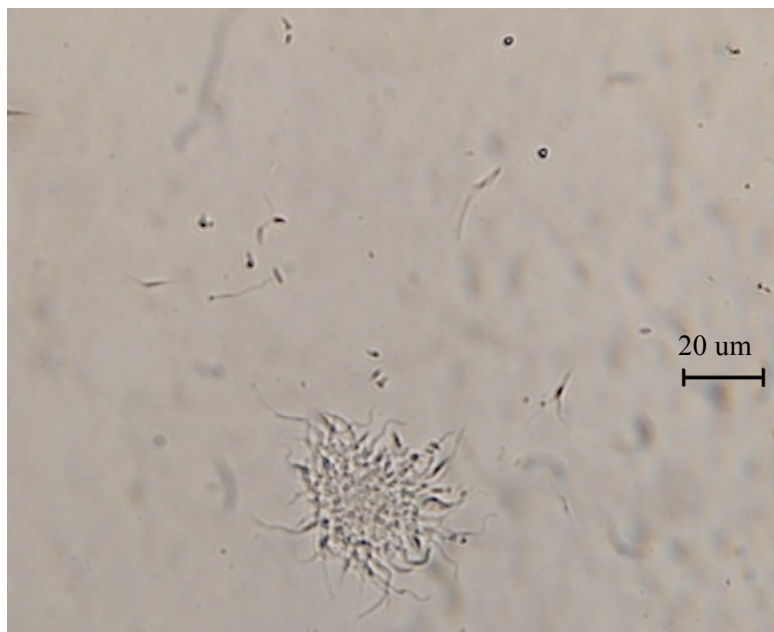
Se realizó una prueba McNemar para comparar la sensibilidad de las dos pruebas IFA realizadas en el mismo grupo de muestras. Esta prueba se asemeja a la prueba chi-cuadrado y utiliza datos dicótomos dependientes; trabaja con la hipótesis nula que dice que no hay diferencia significativa entre la sensibilidad de ambas pruebas (Alonzo y Pepe 2007). Además se realizó una prueba de Kappa para determinar la magnitud de concordancia entre las pruebas no atribuible al azar. Un índice con valor k mayor a 0.81 representa una concordancia excelente, un valor entre 0.81 y 0.6 representa una buena concordancia; entre 0.41 y 0.6 una concordancia moderada; entre 0.21 y 0.4 una concordancia débil, y valores menores a 0.21 representan concordancia despreciable (Bergmann y Aires 2013).

III. RESULTADOS

A. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Se logró cultivar una cepa local de *Trypanosoma cruzi* a partir de la sangre de una persona con caso agudo de la enfermedad (Figura 7). El medio LIT-FBS fue efectivo para el cultivo ya que se mantuvieron cultivos con alta densidad de parásitos (hasta 4×10^7 parásitos/ml aproximadamente) incluso tres meses después de la inoculación del medio. Dicha cepa se utilizó para preparar los subcultivos a partir de los cuales se prepararon placas de inmunofluorescencia con una densidad de aproximadamente 80 parásitos por campo a una magnificación de 400X.

FIGURA 7. Cepa de *Trypanosoma cruzi* aislada de muestra de sangre de caso agudo de la Enfermedad de Chagas detectado en Comapa, Jutiapa, 2015 (magnificación: 200X).



B. Ensayos IFA comercial (Vircell) e IFA UVG

Se produjeron 30 placas de antígeno a partir de los cultivos de la cepa aislada en el 2015 de Comapa, Jutiapa para su utilización en la prueba IFA local. El método de inmunofluorescencia indirecta desarrollado en la Universidad del Valle (IFA UVG) es funcional para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Chagas, ya que no se observó fluorescencia al evaluar negativos, mientras que sí se observó fluorescencia con controles positivos.

Se llevó a cabo el ensayo IFA comercial (Vircell, España) y el local (IFA UVG) a todas las muestras de suero. La fluorescencia observada cualitativamente para ambos ensayos fue diferente para los controles positivos, los cuales se observaron más brillantes en el IFA UVG (Figura 8). En las muestras positivas la fluorescencia también fue mayor en el ensayo UVG en relación al ensayo comercial. Esto puede observarse claramente en la Figura 9 en donde se comparan dos muestras, con dos diluciones cada una, evaluadas con ambos ensayos IFA. Además se puede observar que a mayores diluciones la prueba UVG sigue mostrando fluorescencia, mientras que en la comercial las mismas muestras a la misma dilución incluso podrían interpretarse como negativas.

Sin embargo, las diferencias en la fluorescencia mencionadas en la Figura 7 corresponden únicamente a dos muestras cuya interpretación difirió según el ensayo utilizado, por lo que las observaciones no pueden generalizarse a todo el estudio. Además, la prueba Wilcoxon realizada para comparar cuantitativamente las diferencias en la intensidad de fluorescencia indica que no hay diferencia significativa entre las observaciones de ensayos IFA para la dilución 1:80 ($Z=-0.464$, $p=0.642$). No se realizó la prueba para la dilución 1:40 ya que la mayoría de observaciones concordaban entre los dos ensayos, por lo que no fue necesario determinar si habían diferencias significativas (Cuadro 5). De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que no hay diferencia en la intensidad de la fluorescencia observada en IFA comercial y la

IFA UVG en la dilución de 1:80. La magnitud de la fluorescencia observada para cada muestra se puede encontrar en la sección de Anexos.

CUADRO 5. Comparación de intensidad de fluorescencia de las pruebas IFA comercial e IFA UVG

	Dilución 1:80
Valor Z	-.464
Nivel de significancia (valor P)	.642

Se evaluaron 44 muestras de suero, 39 positivas y cinco. negativas según la prueba ELISA recombinante (*gold standard*). De estas se obtuvieron 40 positivas según la prueba IFA comercial y 38 según la prueba IFA UVG. Únicamente cuatro muestras mostraron resultados discordantes entre las pruebas evaluadas (Cuadro 6). En la sección de anexos se muestran los resultados de cada muestra.

CUADRO 6. Resumen de muestras de suero con resultados discordantes según las pruebas IFA comercial e IFA UVG.

Muestra	ELISA (<i>gold standard</i>)	IFA comercial (Vircell)	IFA UVG
3327 mu01	0	1	1
3331ni01	1	1	0
3296ni01	0	1	0
3778Bni01	1	0	0

*1= positivo, 0 = negativo. Resultados completos en sección de anexos

FIGURA 8. Controles positivos y negativos de los ensayos IFA comercial (Vircell) e IFA UVG. Columna A: control positivo IFA Vircell. Columna B: control positivo IFA UVG. Columna C: control negativo IFA Vircell. Columna D: control negativo IFA UVG.

Magnificación 400X.

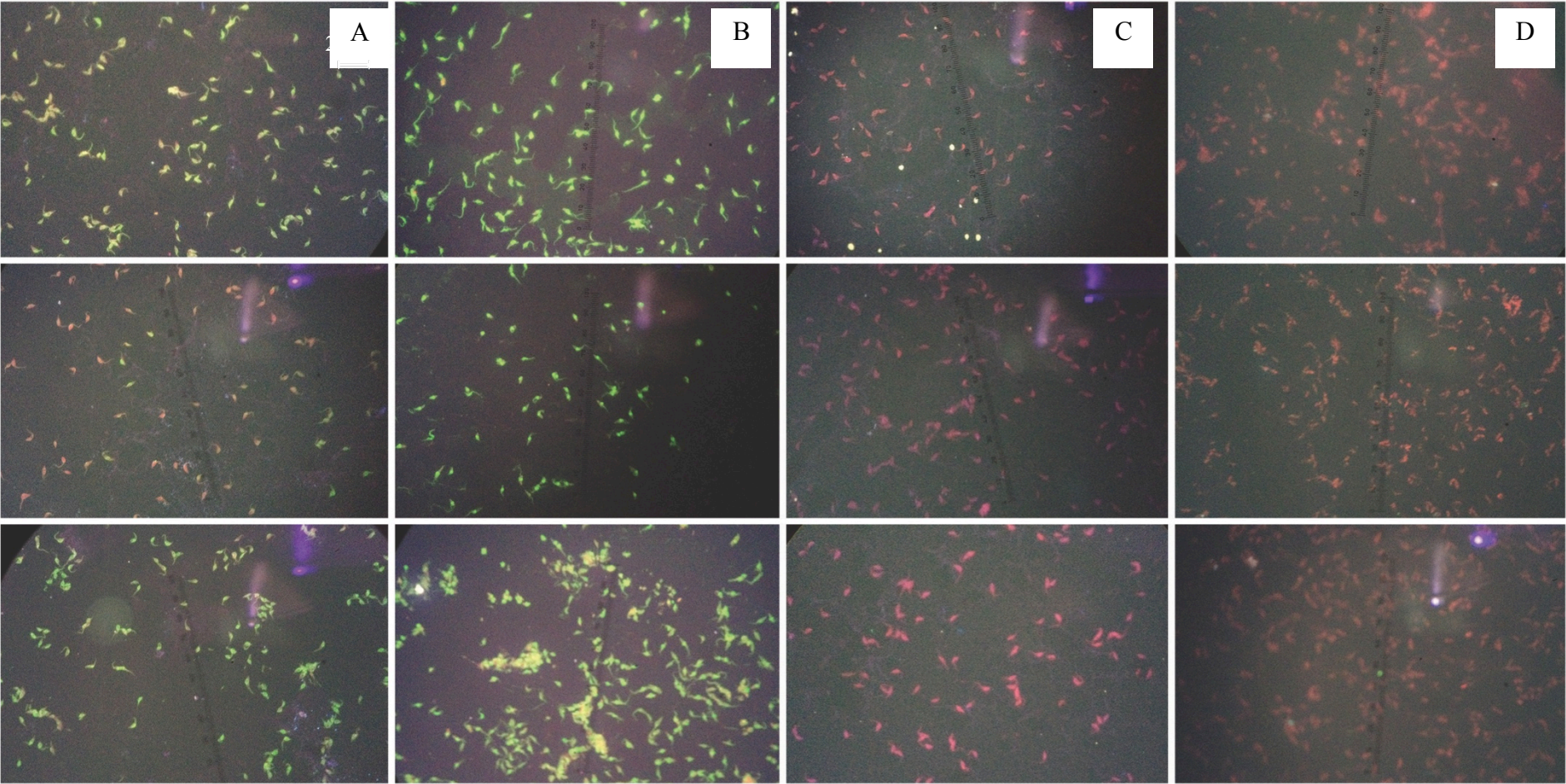
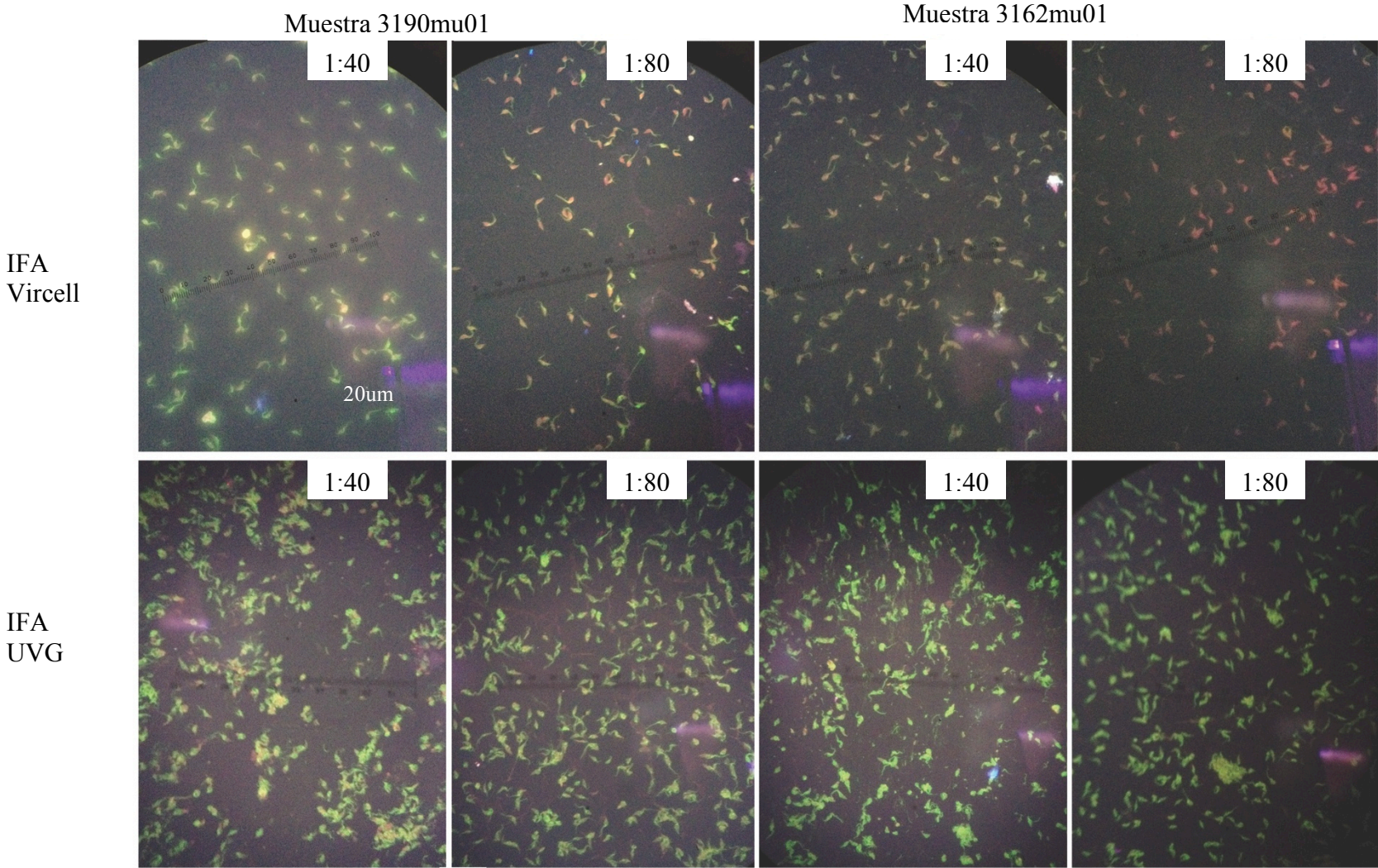


FIGURA 9. Microscopía fluorescente de dos muestras comparando IFA comercial (Vircell) e IFA UVG, dos diluciones cada muestra (1:40, 1:80). Fila superior: prueba IFA comercial (Vircell), fila inferior: prueba IFA UVG. Magnificación: 400X.



Ambas pruebas mostraron una alta concordancia con los resultados de la prueba ELISA (utilizada en este trabajo como estándar de referencia), lo cual quiere decir que el resultado fue el mismo para el 90.9% de cada prueba IFA con respecto al ELISA (Cuadro 7). En el Cuadro 7 también se puede observar que los dos ensayos presentan una sensibilidad mayor al 94%; sin embargo, la prueba UVG presenta una especificidad mayor a la comercial en un 20%, lo cual quiere decir que tiene una mayor capacidad de identificar correctamente a los pacientes sin la enfermedad. Del mismo modo, el cociente de predicción positivo (CPP) es mayor y el cociente de predicción negativo (CPN) es menor para la prueba UVG. Sin embargo, los intervalos de confianza indican que ninguna de estas diferencias es significativa. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la prueba IFA UVG es igual de eficiente que la prueba IFA comercial para el diagnóstico de la enfermedad, con una precisión de 0.1.

CUADRO 7. Sensibilidad, especificidad y cocientes de predicción positivo y negativo para el ensayo IFA comercial e IFA UVG.

ELISA	IFA Comercial		IFA UVG	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Negativo	3	2	4	1
Positivo	1	38	2	37
Concordancia (%)	90.9%		90.9%	
Sensibilidad (%)*	97.44 (86.52-99.94)		94.87 (82.68-99.37)	
Especificidad (%)*	60 (14.66-94.73)		80 (28.36-99.49)	
Cociente de probabilidad positiva (CPP) *	2.44 (0.83-7.14)		4.74 (0.82-27.42)	
Cociente de probabilidad negativa (CPN) *	0.4 (0.01-0.34)		0.06 (0.02-0.27)	

*valores expresados como porcentaje y entre paréntesis como intervalo de confianza 95%

Las pruebas estadísticas indican que no hay diferencia entre los ensayos evaluados. La prueba McNemar ($p=0.5$) indica que no hay diferencia significativa entre las

sensibilidades de la prueba IFA comercial y la prueba UVG. Del mismo modo, el índice de Kappa ($k = 0.776$, $p < 0.0005$) muestra que la magnitud de concordancia entre las pruebas es buena y por lo tanto no se debe al azar (Cuadro 8).

CUADRO 8. Prueba McNemar para la diferencia en sensibilidades y Prueba Kappa para la concordancia entre los ensayos IFA

	Valor	Nivel exacto de eignificancia (valor p)
Prueba McNemar		0.500
Prueba Kappa (k)	0.776	0.000
No. de casos válidos	44	

C. Comparación de costos

El costo estimado por cada placa del ensayo IFA comercial es de Q. 70.00, mientras que para el ensayo UVG el costo es de Q.110.72 (Cuadro 9 y 10 respectivamente). La estimación indica que el ensayo UVG es 58% más costoso que el kit comercial.

CUADRO 9. Costo estimado por cada placa del ensayo IFA comercial

Rubro	Presentación	Cantidad requerida	Costo unitario (Q)	Costo total (Q)
Kit Chagas IFA IgG IgM Vircell	10 placas	1	700.00	700.00
Costo por placa IFA Vircell				70.00

CUADRO 10. Costo estimado por cada placa del ensayo IFA UVG

Rubro	Presentación	Cantidad requerida	Costo unitario (Q)	Costo total (Q)
<i>Cultivo de parásitos</i>				
Glicerol	100 ml	1	347.32	347.32
Infusión de hígado	500g	1	950.00	950.00
Triptosa	100g	1	276.30	276.30
Na ₂ HPO ₄	50g	1	409.64	409.64
Dextrosa	250g	1	430.16	430.16
KCL	500g	1	319.96	319.96
NaCl	250g	1	310.84	310.84
Hemin	1g	1	319.96	319.96
FBS	100ml	1	3420.00	3420.00
Pen-strep	20ml	1	95.00	95.00
KH ₂ PO ₄	100g	1	203.68	203.68
Filtros 0.22um	30u	1	426.36	426.36
Filtros 0.45um	30u	1	426.36	426.36
Tubos corning 15 ml	50u	1	215.00	215.00
<i>Reactivos para ensayo IFA local</i>				
anti-IgG humano FITC	1ml	1	1132.40	1132.40
Azul de Evans	10g	1	396.72	396.72
Bolsas con cierre	10u	10	12.90	129.00
Kimwipes	280 u	1	62.70	62.70
<i>Placas IFA (placas multipozo)</i>				
	100 placas	1	1200.80	1200.80
Costo total por un mínimo de 100 placas				11072.20
Costo por placa IFA local (IFA UVG)				110.72

IV. DISCUSIÓN

A. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

El medio de cultivo fue efectivo para obtener altas densidades de parásito, sin embargo, los componentes del mismo son costosos, especialmente el suero bovino fetal (FBS), que se utiliza para aumentar el rendimiento celular (Schuster y Sullivan 2002). Debido al alto costo de los componentes del medio de cultivo, es recomendable que se evalúe el cultivo del parásito con sustitutos para el FBS de tal modo que se reduzcan los costos y el diagnóstico mediante IFA UVG sea más factible. Una alternativa podría ser el uso de orina humana como sustituto del FBS, ya que como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que promueve el crecimiento *in vitro* de ciertas cepas *T. cruzi* (Ferreira *et al.* 2007). De hecho, los datos preliminares del laboratorio CES-UVG que sugieren que este sustituto podría ser exitoso para el cultivo de esta cepa del parásito. Sin embargo, el control de calidad se dificulta con este tipo de suministro.

B. Ensayos IFA comercial e IFA UVG

Como se mencionó anteriormente, el ensayo IFA UVG se realizó con antígenos obtenidos de un caso de Comapa, Jutiapa, región endémica de la enfermedad, misma localidad de donde se obtuvieron las muestras para el estudio. Por otro lado, el origen de la cepa de *T. cruzi* utilizada para la prueba IFA comercial es desconocida. Si las cepas de parásito producen diferentes respuestas inmunes, se esperaría obtener diferencias en la intensidad de fluorescencia de ambas pruebas ya que distintas cepas

de *T. cruzi* generan la producción de diferentes anticuerpos (Bergman y Aires 2013) por lo que es posible que los anticuerpos reaccionen de forma distinta ante antígenos de diferente origen geográfico.

Sí se detectaron muestras con una mayor intensidad de fluorescencia en el ensayo IFA UVG que en el ensayo comercial, lo cual sugeriría que visualmente existen diferencias entre la sensibilidad de las pruebas. Sin embargo, la prueba Wilcoxon indica que éstas no son significativas en la dilución 1:80. Por lo tanto, puede inferirse que la cepa de *T. cruzi* utilizada para el IFA UVG genera la misma respuesta de fluorescencia que la cepa utilizada en el kit comercial Vircell. Sin embargo, se podría proponer realizar un estudio para evaluar el límite de detección con ambas pruebas para evaluar si realmente existe una diferencia significativa. Se esperaría que al evaluar más diluciones se encuentre que la prueba IFA local tiene una mayor sensibilidad que la comercial.

Ambos ensayos tienen sensibilidad alta (>94%). La prueba comercial es la más sensible con un 97.44% y por lo tanto tiene una mayor capacidad de identificar correctamente a los pacientes con la enfermedad. Sin embargo, esta mostró una menor especificidad que la local. Esto podría indicar que la prueba UVG es más efectiva para el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo, para fines prácticos es preferible un falso positivo (baja especificidad) que un falso negativo (baja sensibilidad), ya que una prueba que resulta en un falso negativo implica que la persona enferma posiblemente nunca será diagnosticada mientras que un falso positivo será detectado al realizar las pruebas confirmatorias de rutina (Verani *et al.* 2009).

En cuanto a la baja especificidad encontrada en las pruebas es importante mencionar que el diseño del estudio se realizó para evaluar únicamente la sensibilidad de las pruebas, ya que se consideró que es el aspecto más importante para el diagnóstico. Por lo tanto se utilizó el 90% de muestras positivas. Debido a esto, la especificidad obtenida según este diseño experimental no necesariamente refleja la

especificidad real de las pruebas. Para evaluar correctamente la especificidad es necesario realizar un estudio distinto con un nuevo diseño experimental (Malhotra e Indrayan 2010).

La comparación cuantitativa de los resultados de los ensayos muestra que ambos concuerdan en un 90.9% con los resultados de la prueba ELISA. Para el IFA UVG, dos de los cuatro datos discordantes con el ELISA ocurren en muestras de niños, al igual que para el IFA comercial. Esto podría indicar que la sensibilidad de estos ensayos varía según la edad de la persona. Además, las pruebas estadísticas sugieren que no hay diferencia significativa entre la sensibilidad de los ensayos IFA (prueba McNemar, $p=0.500$) y que hay una buena concordancia entre los resultados de las mismas (prueba Kappa, $k=0.776$, $p=0.000$). Por lo tanto, ambas pruebas parecen ser igual de efectivas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Aunque los resultados indican que la prueba IFA UVG sí es efectiva para detectar los anticuerpos contra la enfermedad de Chagas, estos no pueden generalizarse a otras regiones en donde la reacción antígeno-anticuerpo varíe, ocasionando que la sensibilidad de la prueba sea distinta. Por lo tanto, es recomendable que se lleve a cabo una genotipificación de la cepa local cultivada para la realización del ensayo UVG, así como una caracterización biológica de la misma de tal modo que se determine si la prueba desarrollada en este trabajo es aplicable para el diagnóstico de la enfermedad en otras regiones de Centroamérica e incluso México donde predominan cepas del DTU TcI (Higo *et al.* 2004).

Es importante tomar en cuenta actualmente que no existe un método utilizado en todos los laboratorios como estándar de referencia o *gold standard* ya que no existe un consenso entre expertos sobre cuál es el método más adecuado para el diagnóstico de la enfermedad (Brasil *et al.* 2010, Leiby *et al.* 2000); sin embargo, algunos consideran el Ensayo de Radioinmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés) como estándar de referencia (Cordón, C.; Directora del Centro de Estudios en Salud, UVG, abril 2016 comunicación personal), aunque este no es aplicado uniformemente

para el diagnóstico. Éste método se utiliza frecuentemente como una parte del estándar de referencia o se aplica de forma aleatoria a algunas muestras con fines confirmatorios (Alfonso *et al.* 2012). Idealmente, un estándar de referencia debe ser siempre efectivo, como es el caso de las biopsias para ciertas enfermedades. Sin embargo dichas pruebas no son adecuadas para la Enfermedad de Chagas debido a la ausencia de síntomas o signos concretos en fases crónicas de la enfermedad. Por lo tanto, el uso de la prueba ELISA como estándar de referencia puede representar una fuente de error en los resultados ya que no es 100% efectivo, y los errores de diagnóstico que pudo haber presentado se reflejan en los resultados de sensibilidad y especificidad de las pruebas IFA y cualquier otra prueba evaluada a partir del ELISA (Kumar e Indrayan 2011).

C. Comparación de costos

El costo del ensayo UVG es mayor al ensayo comercial (Vircell) en un 58%. Por lo tanto, la producción del IFA UVG no es competitiva en términos de costo. La estimación del costo del IFA UVG se hizo asumiendo una producción de 100 placas, ya que es la presentación más pequeña disponible del producto. Adicionalmente, se contempló una producción a baja escala ya que preparar más de 100 placas IFA consumiría mucho tiempo y su almacenamiento a largo plazo podría afectar la reactividad del antígeno.

Para dicha estimación se contempló la compra de la presentación más pequeña de cada reactivo necesario, sin embargo, todos los reactivos están disponibles en presentaciones mayores a la necesaria para la producción de 100 placas. Esto ocasiona que el costo incremente y que no se utilicen reactivos, ocasionando que la producción del ensayo IFA UVG no sea factible en comparación al costo de un ensayo comercial.

D. Limitantes del estudio

Una de las limitaciones principales del estudio es la disponibilidad de recursos, ya que no permitió que se utilizara el método RIPA como estándar de referencia. Como se mencionó anteriormente, éste es el método que algunos expertos consideran como estándar de referencial. El no utilizarlo puede representar una fuente de error en el estudio y ocasionar datos inflados de sensibilidad y especificidad (Alfonso *et al.* 2008). Además, la falta de recursos tampoco permitió que se evaluaran más diluciones para determinar el título de detección de cada prueba IFA. Esto habría permitido establecer si la prueba IFA local realmente detecta títulos más altos que la comercial, lo cual indicaría si tiene utilidad para la confirmación de diagnóstico de muestras con resultados indeterminados según otras pruebas serológicas.

Se ha encontrado que sueros con anticuerpos contra *Leishmania*, malaria, *Toxoplasma*, entre otros pueden producir falsos positivos en pruebas ELISA e IFA para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* (Leiby *et al.* 2000, Malan *et al.* 2006). La prueba IFA UVG diseñada en este trabajo no contempla la reactividad cruzada, lo cual pudo afectar en la sensibilidad y especificidad de la misma. Por lo tanto, es recomendable evaluar la reactividad cruzada de la prueba IFA UVG con sueros positivos para anticuerpos contra otros parásitos o agentes infecciosos para descartar el efecto de otros anticuerpos en los diagnósticos.

Es importante tomar en cuenta que el método IFA requiere mucho tiempo debido a los tiempos de incubación. Además, si el número de muestras a procesar es grande el ensayo requiere aún más tiempo debido a la preparación de las diluciones. Por lo tanto, este método es recomendado para diagnóstico y no como método de tamizaje o control rutinario de la enfermedad en áreas endémicas.

Además, cabe mencionar que las placas deben ser evaluadas en un máximo de 24 horas después de terminar el ensayo para evitar que ocurra fotoblanqueo (destrucción de moléculas fluorescentes) de las moléculas fluorescentes. Esto también ocurre cuando las muestras se exponen por un período prolongado a la luz ultravioleta. Por lo tanto esta técnica debe ser evaluada dentro del marco de lectura y por personal capacitado que pueda evaluar los resultados rápidamente.

Otra limitante del estudio, específicamente de las pruebas IFA, es la subjetividad en la interpretación de los resultados. Esto se debe a que el diagnóstico recae en la capacidad del técnico o profesional de determinar correctamente si una muestra es positiva o negativa, así como evaluar la intensidad de la fluorescencia. A esto se le suma el sesgo que se crea cuando varios técnicos realizan el diagnóstico. Por lo tanto, es recomendable que las pruebas de inmunofluorescencia indirecta se realicen por personal entrenado y únicamente para confirmación de diagnóstico utilizando el método de doble ciego para reducir el sesgo del operador.

V. CONCLUSIONES

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) desarrollada en la UVG (IFA UVG) a partir del cultivo de una cepa aislada de Comapa, Jutiapa detecta detecta los anticuerpos de la Enfermedad de Chagas con una sensibilidad del 94.87% (IC 95%, 82.68-99.37) bajo las condiciones evaluadas.

Las diferencias en la intensidad de fluorescencia medida a la dilución 1:80 y en la sensibilidad de la prueba IFA UVG y la prueba IFA comercial (Vircell) no son significativas (Wilcoxon $p=0.642$, McNemar $p=0.5$) por lo que ambos métodos funcionan igual de eficientemente para la detección de la enfermedad.

El costo de producir la prueba IFA UVG es 58% mayor al de adquirir la prueba IFA Comercial Vircell, por lo tanto, la producción a baja escala de la prueba local aunque técnicamente es factible, no es competitiva con la prueba comercial. Si se deseara producir la prueba localmente, sería conveniente realizar un estudio del mercado local.

VI. LITERATURA CITADA

- Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). 2014. *Buenas Prácticas en el Control de la Enfermedad de Chagas en Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua. 2000-2014*. JICA, Tegucigalpa. 286pp.
- Alfonso, A. M.; M.H. Ebell y R. L. Tarleton. 2012. *A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease*. PLoS Neglected Tropical Diseases 6(11): e1881. En: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001881>
- Alonzo, T. A. y M. S. Pepe. 2007. *Development and Evaluation of Classifiers*. En: Ambrosius, W.T. (Ed). Topics in Biostatistics. Humana Press, Nueva Jersey. 516 pp.
- Andrade, D.V.; K.J. Gollob y W.O. Dutra. 2014. *Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease*. PLoS Neglected Tropical Diseases 8(7): e3010. En: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003010> [con acceso el 9-3-2015].
- Araujo-Jorge, T.; A. Aufderheide, J. Telleira y J. Rios-Dalenz. 2010. *History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*. En: Telleira, J. y M. Tibayrenc (Eds.) American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, Reino Unido. 870 pp.

- Bergmann, A.; M.E. Aires. 2013. *Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 17(2): 174-178.
- Berman, N. 2007. *Comparison of Means*. En: Ambrosius, W.T. (Ed). Topics in Biostatistics. Humana Press, Nueva Jersey. 516 pp
- Bern, C.; D. Martin, y Gilman. 2011. *Acute and Congenital Chagas Disease*. En: Weiss L.M.; H.B. Tanowitz y L.V. Kirchhoff (Eds.). Advances in Parasitology, Chagas Disease, Part A. Academic Press, Reino Unido. 390pp
- Brasil, P.E.; L. De Castro, A.M. Hasslocher-Moreno, L.H. Sangenis y J.U. Braga. 2010. *ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis*. BMC Infectious Diseases 10: p.337-337. En: www.biomedcentral.com/1471-2334/10/337 [con acceso el 9-3-2015].
- Center for Disease Control (CDC). 2014. *Chagas Disease*. Estados Unidos. En: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html> [con acceso el 8-3-2015].
- Dorn, P.L.; C. Calderon, S. Melgar, B. Moguel, E. Solorzano, E. Dumonteil, A. Rodas, N. de la Rúa, R. Garnica, y C. Monroy. 2009. *Two Distinct Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) Taxa Are Found in Sympatry in Guatemala and Mexico*. PLoS Neglected Tropical Diseases 3(3): e393. En: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000393> [con acceso el 8-3-2015].
- Dumonteil, E.; P. Nouvellet, K. Rosecrans, M.J. Ramirez-Sierra, R. Gamboa-León, V. Cruz-Chan, M. Rosado-Vallado, y S. Gourbière. 2013. *Eco-Bio-Social Determinants for House Infestation by Non-domiciliated Triatoma dimidiata in the Yucatan Peninsula, Mexico*. PLoS Neglected Tropical Diseases 7(9): e2466. En: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002466> [con acceso el 8-3-2015].

- Gamboa-León, R.; C. González-Ramírez, N. Padilla-Raygoza, S. Sosa-Estani, A. Caamal, Kantun, P. Buekens y E. Dumontiel. 2001. *Do Comercial Serologic Tests For Trypanozoma cruzi Infection Detect Mexican Strains in Women and Newborns*. Journal of Parasitology 97(2): 338-343.
- Gorlin, J.; S. Rossman, G. Robertson, F. Stallone, N. Hirschler, K. Nguyen, R. Gilcher, H. Fernandes, S. Alvey, P. Ajongwen, P. Contestable y H. Warren. 2008. *Evaluation of a new Trypanosoma cruzi antibody assay for blood donor screening*. Transfusion 48(3): 531-540.
- Guhl, F. y A. Aufderheide. 2010. *Chagas Disease in Pre-Colombian Civilizations*. En: Telleira, J. y M. Tibayrenc (Eds.) American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, Reino Unido. 870 pp. .
- Hamilton, P. y J. Stevens, 2010. *Classification and Phylogeny of Trypanosoma cruzi*. En: Telleira, J. y M. Tibayrenc (Eds.) American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. Elsevier, Reino Unido. 870 pp.
- Hashimoto, K.; C. Cordon-Rosales, R. Trampe, y M. Kawabata. 2006. *Impact of single and multiple residual sprayings of pyrethroid insecticides against Triatoma dimidiata (Reduviidae; Triatominae), the principal vector of Chagas disease in Jutiapa, Guatemala*. The American journal of tropical medicine and hygiene 75(2): 226–230.
- y C.J. Schofield. 2012. *Elimination of Rhodnius prolixus in Central America*. Parasites & Vectors 5(1):45. En: www.parasitesandvectors.com/content/5/1/45 [con acceso el 9-3-2015].
- Higo, H.; S. Miura, M. Horio, T. Mimori, S. Hamano, T. Agatsuma, T. Yanagi, A. Cruz-Reyes, N. Uyema, A.R. de Arias, V. Matta, H. Akahane, K. Hirayama, T. Takeuchi, I. Tada y K. Himeno. 2004. *Genotypic variation among lineages of Trypanosoma cruzi and its geographic aspects*. Parasitology International 53(4): 337–344.

- Karimollah, H. 2013. *Receiver Operating Characteristic (ROC) curve for Medical Diagnostic Test Evaluation*. Caspian Journal of Intern Medicine 4(2): 627-635.
- King, R.J.; C. Cordon-Rosales, J. Cox, C.R. Davies y U.D. Kitron. 2011. *Triatoma dimidiata Infestation in Chagas Disease Endemic Regions of Guatemala: Comparison of Random and Targeted Cross-Sectional Surveys*. R. PLoS Neglected Tropical Diseases 5(4): e1035. En: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001035> [con acceso el 9-3-2015].
- Kirchhoff, L. 2011. *Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*. En: Weiss L.M.; H.B. Tanowitz y L.V. Kirchhoff (Eds.). *Advances in Parasitology, Chagas Disease, Part A*. Academic Press, Reino Unido. 390pp.
- Kumar, R. y A. Indrayan. 2011. *Receiver Operating Characteristic (ROC) curve for Medical Researchers*. Indian Pediatrics 48: 277-287
- Leiby, D.A.; S. Wendel, D. T. Takaoka, R. M. Fachini, L. C. Oliveira y M. A. Tibbals. 2000. *Serologic Testing for Trypanosoma cruzi: Comparison of Radioimmunoprecipitation Assay with Commercially Available Indirect Immunofluorescence Assay, Indirect Hemagglutination Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits*. Journal of Clinical Microbiology. 38: 639-642
- Litwin, V. M. y G. Virella. 2007. *Diagnostic Immunology*. En: Virella, G. (Ed). *Medical Immunology*. 6th Edition. CRC Press, Nueva York. 448 pp.
- Malan, A.K.; E. Avelar, S. E. Litwin, H.R. Hill y C.M. Litwin. 2006. *Serological diagnosis of Trypanosoma cruzi: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay*. Journal of Medical Microbiology. 55: 171-178.

Malhotra, R. K. y A. Indrayan. 2010. *A simple nomogram for a sample size for estimating sensitivity and specificity of medical tests*. Indian Journal of Ophthalmology. 58(6): 519-522.

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), 2007. *Protocolos Nacionales de Vigilancia de Salud Pública*. Centro Nacional de Epidemiología, Guatemala. 460pp. En: http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/PROTOCOLOS_MSPAS_2007.pdf [con acceso el 19-7-2015].

-----, 2011. *Enfermedad de Chagas en Guatemala*. Mario Rodolfo Gatica. Coordinador del Programa de Control y Prevención de la Enfermedad de Chagas.

Monteiro, W.M.; L.K.C. Magalhães, A.R.N. de Sá, M.L. Gomes, M.J. de O. Toledo, L. Borges, I. Pires, J.A. de Oliveira Guerra, H. Silveira y M. das G.V. Barbosa. 2012. *Trypanosoma cruzi IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia*. PLoS ONE 7(7): e41284. En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848457> [con acceso el 9-3-2015].

-----, OPS/OMS, Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), USAC, UVG. 2012. *Manual operativo de vigilancia y control entomológico de la enfermedad de chagas*. 2a edición. Comité Inter-institucional de Chagas, Guatemala. 36pp.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. *Control of Chagas disease second report of a WHO expert committee*. Organización Mundial de la Salud, Geneva. 109pp. En: apps.who.int/iris/handle/10665/42443 [con acceso el 9-3-2015].

-----, 2012. *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and*

Leishmaniasis. Organización Mundial de la Salud, Geneva, Suecia. 100pp.
En: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf [con acceso el 19-3-2015].

------. 2013. *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases*. Organización Mundial de la Salud, Geneva, Suecia. 138pp.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2006. *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas*. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. En: <http://www.bvsops.orguy/pdf/chagas19.pdf> [con acceso el 8-3-2015].

------. 2009. *Enfermedad de Chagas: Guía para la vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos*, Área de Vigilancia sanitaria y Manejo de Enfermedades, Proyecto de Enfermedades Comunicables (PAHO/HSD/CD/539.09), Río de Janeiro. 94 pp.

------. 2010a. *XII Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA) para la Interrupción de la Transmisión Vectorial, Transfusional y Atención Médica de la Enfermedad de Chagas*. Organización Panamericana de la Salud, San Salvador. 57pp.

------. 2010b. *Estrategia y plan de acción para la prevención, el control y la atención de la Enfermedad de Chagas*. Consejo Directivo Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C. En: <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2010/CD50-16-s.pdf> [con acceso el 8-3-2015].

------. 2010c. *Programa Regional para el Control de La Enfermedad de Chagas en América Latina: Iniciativa de Bienes Públicos Regionales*. Banco Interamericano de Desarrollo, Montevideo. 242 pp.


- Patterson, J. y F. Guhl. 2010. *Geographical Distribution of Chagas Disease*. En: Telleira, J. y M. Tibayrenc (Eds.) *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Elsevier, Reino Unido. 870 pp.
- Pellecer, M.J.; P.L. Dorn, D.M. Bustamante, A. Rodas y M.C. Monroy. 2013. *Vector Blood Meals Are an Early Indicator of the Effectiveness of the Ecohealth Approach in Halting Chagas Transmission in Guatemala*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4): 638–644.
- Pennington, P.M.; C. Paiz, L.M. Grajeda y C. Cerdón-Rosales. 2009. *Concurrent detection of Trypanosoma cruzi lineages I and II in domestic Triatoma dimidiata from Guatemala*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80 (2): 239–241.
- Pinto, J., Rizzo, N.R.; B.A. Arana, A. Diaz, C. Cordon-Rosales, R.E. Klein y M.R. Powell. 2003. *Seroprevalence of Trypanosoma cruzi infection among school-age children in the endemic area of Guatemala*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 68(6): 678–682.
- Ruiz-Sánchez, R.; M.P. de León, V. Matta, P.A. Reyes, R. López, D. Jay y V.M. Monteón. 2005. *Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(3): 281–283.
- Sánchez, B.; V. Monteón, P. A. Reyes y B. Espinoza. 2001. *Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of Trypanosoma cruzi Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens*. *Archives of Medical Research* 32: 382-388.
- Schofield C. y J. Rios-Dalenz, 2010. *Social and Medical Aspects: Morbidity and Mortality in General Population*. En: Telleira, J. y M. Tibayrenc (Eds.) *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Elsevier, Reino Unido. 870 pp.

- Schuster, F.L. y J.J. Sullivan. 2002. *Cultivation of clinically significant hemoflagellates*. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3): 374-389.
- Shah, V.; L. Ferrufino, R.H. Gilman, M. Ramirez, E. Saenza, E. Malaga, G. Sanchez, E.E. Okamoto, J.E. Sherbuck, E.H. Clarck, G. Galdos-Cardenas, R. Bozo, J.L. Flores-Franco, R. Colanzi, M. Verastegui y C. Bern. 2014. *Field evaluation of the inBios Chagas detect plus rapid test in serum and whole blood specimens in Bolivia*. *Clinical and Vaccine Immunology* 21(12): 1645- 1649.
- The Chagas Disease Foundation. 2015. *Chagas Disease - General Information*. En: <http://www.chagasfound.org/chagas-disease-info.php?ID=1&t=Life%20Cycle> [con acceso 15-3-2015].
- Tibayrenc, M. 2003. *Genetic subdivisions within Trypanosoma cruzi (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution*. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2(1): 12. En: www.kinetoplastids.com/content/2/1/12 [con acceso el 9-3-2015].
- Urbina, J. 2010. *Quimioterapia específica de la enfermedad de Chagas: bases científicas para justificar el tratamiento etiológico de todos los seropositivos para Trypanosoma cruzi*. En: Organización Panamericana de Salud (OPS) (Ed). XII Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA) para la Interrupción de la Transmisión Vectorial, Transfusional y Atención Médica de la Enfermedad de Chagas. Organización Panamericana de la Salud, San Salvador. 57pp.
- De Urioste-Stone, S.M.; P.M. Pennington, E. Pellecer, T.M. Aguilar, G. Samayoa, H.D. Perdomo, H. Enríquez y J.G. Juárez. 2015. *Development of a community-based intervention for the control of Chagas disease based on peridomestic animal management: an eco-bio-social perspective*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109(2): 159–167.


- Verani, J. R.; A. Seitz, R. H. Gilman, C. LaFuente, G. Galdos-Cardenas, V. Kawai, E. de LaFuente, L. Ferrufino, N.M. Bowman, C. Pinedo-Cancino, M.Z. Levym F. Steurer, C. W. Todd, L. V. Kirchhoff, L. Cabrera, M. Verastegui y C. Bern. 2009. *Geographic Variation in the Sensitivity of Recombinant Antigen-based Rapid Tests for Chronic Trypanosoma cruzi Infection*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 80(3): 410-415.
- Zingales, B.; S.G. Andrade, M.R.S. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturn, M. Tibayrenc y A.G. Schijman. 2009. *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 104(7): 1051–1054.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Instrucciones para prueba IFA comercial



vircell
MICROBIOLOGISTS



ES

CHAGAS IFA IgG+IgM

Producto para diagnóstico *in vitro*

PCHAG: Kit de inmunofluorescencia indirecta para determinar anticuerpos totales frente a *Trypanosoma cruzi* en suero/plasma humano.

INTRODUCCIÓN:
La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a animales y personas por insectos vectores triatomínicos, que se encuentran solamente en América (principalmente, en áreas rurales de Latinoamérica). Las personas también pueden infectarse por ingestión de alimentos crudos contaminados con heces de insectos infectados, transmisión congénita, transmisión sanguínea, trasplante de órganos o exposición accidental en el laboratorio. Se estima que aproximadamente de 8 a 11 millones de personas en México, América Central y Suramérica tienen la enfermedad de Chagas, la mayoría de los cuales no saben que están infectados. Si no se trata, la infección puede durar toda la vida y hasta ser mortal.
Hay dos fases en la enfermedad de Chagas: la fase aguda y la fase crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas o ser potencialmente mortales. La fase aguda termina a las pocas semanas o meses de la infección. Usualmente es asintomática o presenta síntomas leves (fiebre, fatiga, dolor de cuerpo, dolores de cabeza, sarpullido, pérdida de apetito, diarrea y vómitos). La señal más característica de la fase aguda de la enfermedad de Chagas es el signo de Romaña, el cual se caracteriza por un hinchazón del párpado en el lado de la cara más cercano a la picadura. Los síntomas generalmente desaparecen en pocas semanas, pero la infección, si no es tratada, persiste. Raramente, niños jóvenes (<5%) o pacientes inmunocomprometidos mueren de infección/inflamación del músculo cardíaco (miocarditis) o el cerebro (meningoencefalitis). Durante la fase crónica, la infección puede permanecer latente durante décadas o incluso toda la vida. En este estadio, algunas personas desarrollan complicaciones cardíacas (cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, paro cardíaco, arritmias) e intestinales (megaesófago o megacolon).
La detección de anticuerpos es el principal método para el diagnóstico del Chagas. Los ensayos más empleados han sido la hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y ELISA con antígenos totales o semipurificados de epimastigotes de *T. cruzi*. Estas pruebas han demostrado alta sensibilidad y especificidad y pueden estandarizarse como pruebas de rutina. La prueba de inmunofluorescencia indirecta se basa en el uso de epimastigotes de *T. cruzi* fijados sobre portaobjetos de vidrio.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:
El método de inmunofluorescencia indirecta está basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie del portaobjetos. Los anticuerpos específicos presentes en la muestra reaccionan con el antígeno, y las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior el complejo antígeno-anticuerpo es revelado mediante globulina antihumana marcada con fluoresceína, resultando visualizable mediante microscopio de fluorescencia.

CARACTERÍSTICAS:
Todos los reactivos a excepción del PBS vienen listos para su uso. Los componentes del equipo se presentan numerados para facilitar su identificación inequívoca. En el Procedimiento del Ensayo se indican los números de los reactivos que han de utilizarse en cada etapa.

CONTENIDO DEL KIT:
1] VIRCELL CHAGAS SLIDE: 10 portaobjetos de 10 pocillos con formas epimastigotes de *T. cruzi*, crecido en medio LIT. Las cepas se inactivan con formaldehído y se fijan con acetona.
2] VIRCELL PBS: 1 vial para preparar 1 l de PBS pH 7,2.
3] VIRCELL CHAGAS POSITIVE CONTROL: 200 µl de suero control positivo (contiene azida sódica).
4] VIRCELL CHAGAS NEGATIVE CONTROL: 200 µl de suero control negativo (contiene azida sódica).
5] VIRCELL ANTI-HUMAN IgT FITC CONJUGATE: 2 viales de 1,1 ml de una solución de globulina anti-IgT humana marcada con fluoresceína en tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, azul de Evans y azida sódica.
6] VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml de medio de montaje: glicerol tamponado (contiene azida sódica).

Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.

Material necesario no contenido en el kit:
Pipetas de precisión adecuadas.
Incubador termostatzado.
Agua destilada.
Cubreobjetos de 24x60 mm.
Microscopio de fluorescencia y filtros apropiados según recomendaciones del fabricante.
Cámara húmeda.

CONSERVACIÓN:
Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. Los kits son estables hasta el final del mes indicado en la fecha de caducidad, siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
PBS reconstituido	4 meses a 2-8°C, siempre dentro de su fecha de caducidad
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:
Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas. Utilizar sólo la cantidad de controles, PBS y conjugado necesaria para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante. Una vez preparado el PBS debe ser conservado a 2-8°C y no debe emplearse si presenta turbidez.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

Vircell, S.L. Parque Tecnológico de la Salud, Avicena 8, 18016 Granada, España. Tel. +34 958 441 264 www.vircell.com

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es sólo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar sólo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Sólo el PBS, el medio de montaje y los portaobjetos son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de IFA VIRCELL. El resto de los componentes son compatibles entre distintos equipos cuando coincida el lote.
3. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar sólo material limpio y preferentemente desechable.
4. No utilizar en caso de deterioro del envase.
5. No pipetear con la boca.
6. El conjugado y los controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg, anticuerpos frente a VIH y Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. Los pocillos contienen antígeno de *T. cruzi* inactivado, no obstante, deben manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de estos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.
7. Por contener azida sódica (concentración <0,1%), debe evitarse el contacto del conjugado, medio de montaje y controles con ácidos y metales pesados.
8. Por contener glicerol, debe evitarse el contacto del medio de montaje con ácidos. No exponer a temperaturas elevadas.
9. El azul de Evans (concentración <0,1%), es cancerígeno. Evite el contacto con la piel o los ojos. En caso de contacto lavar la superficie afectada con agua y solicitar asistencia médica.
10. Use únicamente los protocolos descritos en este prospecto. Si los intervalos o temperaturas de incubación empleados en la prueba no son los especificados, los resultados pueden ser erróneos.
11. La contaminación cruzada por muestras de distintos pacientes en un portaobjetos puede causar resultados equívocos. Tome las precauciones necesarias para evitarla.
12. La óptica del microscopio, el mantenimiento y el tipo de fuente de luz pueden afectar la calidad de la fluorescencia.
13. No dejar los reactivos a temperatura ambiente más tiempo del absolutamente necesario.
14. Cada portaobjetos debe ser utilizado una sola vez. No debe ser fraccionado, ni se deben reutilizar los pocillos no usados.
15. El kit contiene elementos de vidrio que en caso de rotura podrían provocar lesiones físicas. Manipular con precaución.

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas estériles o asépticas para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias ya que estas podrían provocar una disminución del título de las inmunoglobulinas, especialmente de IgM. No utilizar muestras hiperlipémicas o contaminadas. Las muestras que presenten

partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

El único reactivo que es necesario preparar con antelación a la realización de la prueba es el PBS. Para ello, agregar el contenido del vial 2 a 1 litro de agua destilada y agitar hasta completa disolución. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Permita que los portaobjetos alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos.
2. Realizar una dilución 1/40 y 1/80 de las muestras, para ello poner 10 µl de muestra en 390 µl de PBS 2, rotularla como dilución 1/40. Doble diluir con 50 µl de PBS (dilución 1/80). Los sueros control 3 y 4 no deben ser diluidos.
3. Poner 20 µl de la dilución 1/40 y 1/80 en dos pocillos del portaobjetos 1. Realizar lo mismo con los controles positivo 3 y negativo 4.
4. Incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
5. Enjuagar brevemente el portaobjetos 1 con PBS 2 (evitar verter directamente el PBS sobre los pocillos). Sumergir el portaobjetos durante 10 minutos en PBS. Dar un ligero lavado con agua destilada.
6. Dejar que los portaobjetos 1 se sequen.
7. Añadir 20 µl de solución de anti-IgT humana 5T en cada pocillo. (No requiere dilución).
8. Repetir los pasos 4, 5 y 6.
9. Añadir una pequeña gota de medio de montaje 6 a cada pocillo y poner el cubreobjetos.
10. Examinar en microscopio de fluorescencia a 400x lo más rápidamente posible. De no ser así, mantener a 2-8°C en oscuridad durante un máximo de 24 horas, hasta la observación.
11. En caso de obtener positividad a estas diluciones de screening, estudiar de nuevo las muestras empleando diluciones hasta 1/640.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles. La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

En cada ensayo se deben incluir control positivo y negativo. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo. El patrón de fluorescencia que debe observarse será:

Control positivo: Fluorescencia periférica, citoplasmática y flagelar.

Control negativo: Patrón celular rojo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

El título del suero vendrá dado por la máxima dilución a la que se observe una reacción positiva.

Una reacción positiva será aquella en la que se observe fluorescencia periférica, citoplasmática y flagelar.

Una reacción negativa será aquella en la que se observe un patrón celular rojo.

Patrones de fluorescencia diferentes a los definidos en el protocolo de validación no deben ser interpretados como positivos.

La presencia de anticuerpos a título de 1/80 sugiere infección, pero es conveniente titular las muestras a esta dilución.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

1. Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
2. El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
3. Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos.
4. El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
5. La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
6. Las muestras recogidas al inicio de la infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En esos casos se recomienda realizar un ensayo para determinación de IgM, u obtener una segunda muestra transcurridos entre 14 y 21 días para ser ensayada en paralelo con la muestra original, con el fin de determinar una seroconversión.
7. Los resultados obtenidos en la detección de IgG en neonatos deben ser interpretados con precaución, ya que las IgG maternas son transferidas pasivamente de la madre al feto antes del nacimiento. La determinación de IgM es mejor indicador de infección en niños menores de 6 meses.
8. Los resultados de determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente. Se deben recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión o un incremento significativo en el nivel de anticuerpos.
9. En la enfermedad de chagas una respuesta inmune de alta intensidad puede ser detectada por Inmunofluorescencia indirecta. En áreas endémicas pueden darse reacciones cruzadas con *Leishmania infantum* por lo que los resultados deberían ser confirmados mediante técnicas alternativas.
10. En pacientes con anticuerpos antinucleares puede aparecer un patrón de fluorescencia sobre el kinetoplasto y el núcleo que no debe ser considerado específico ni, por lo tanto, indicativo de enfermedad.

PRESTACIONES:

• SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:

TEST 1:

Se ensayaron 107 muestras de suero/plasma con CHAGAS IFA IgG+IgM frente a varios equipos de ELISA de otra casa comercial, obteniendo los siguientes resultados frente al consenso:

	Nº muestras	Sensibilidad	Especificidad
IgG + IgM	107	100%	98.6%

Los valores indeterminados fueron suprimidos de los cálculos finales

TEST 2:

Se ensayaron 71 muestras de suero/plasma con CHAGAS IFA IgG+IgM frente a un equipo ELISA de otra casa comercial, obteniendo los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad	Especificidad
IgG + IgM	71	100%	100%

Los valores indeterminados fueron suprimidos de los cálculos finales

• PRECISIÓN INTRAENSAYO:

Se titularon 3 sueros, 2 positivos y 1 negativo, pipeteados individualmente en grupos de 5 en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas. En ningún caso se observaron oscilaciones superiores a 1 título.

• PRECISIÓN INTERENSAYO:

Se titularon 3 sueros, 2 positivos y 1 negativo, pipeteados individualmente en 5 condiciones diferentes en las que variaron el operador o el día de realización. En ningún caso se observaron oscilaciones superiores a 1 título.

• REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:

Se ensayaron 22 muestras caracterizadas positivas frente a Leishmania.

Las muestras ensayadas dieron resultados positivos, demostrando la reacción inespecífica del ensayo con reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <X> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos

BIBLIOGRAFÍA:

1. Camargo, M. E. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 8:227-35.
2. Camargo, M. E. and C. Rebonato. 1969. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Am J Trop Med Hyg 18:500-5.
3. Carvalho, M. R., M. A. Krieger, E. Almeida, W. Oelemann, M. A. Shikanai-Yassuda, A. W. Ferreira, J. B. Pereira, A. Saez-

- Alquezar, P. E. Dorlhiac-Llacer, and D. F. Chamone. 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33:830-4.
4. CDC. Chagas Disease: Fact Sheet. . Infectious Disease Information by the National Center for Infectious Diseases, CDC. (<http://www.cdc.gov/ncidod/>).
5. Guhl, F. and S. Nicholls. 2001. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. 98 pp. Universidad de Los Andes, Santafé de Bogotá.
6. Kagan, I. G. 1980. Serodiagnosis of parasitic diseases. p. 573-604. In Rose, N. R., and H. Friedman (eds.), *Manual of Clinical Immunology*, 2nd ed. ASM, Washington.
7. Leiby, D. A., S. Wendel, D. T. Takaoka, R. M. Fachini, L. C. Oliveira, and M. A. Tibbals. 2000. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol* 38:639-42.
8. Lelchuk, R., A. P. Dalmasso, C. L. Inglesini, M. Alvarez, and J. A. Cerisola. 1970. Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol* 6:547-55.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:
customerservice@vircell.com

REVISADO: 11/2014

Anexo 2. Intensidad de fluorescencia observado para ambas pruebas IFA en las dos diluciones evaluadas (1:40 y 1:80).

Muestra	Dilución 1:40		Dilución 1:80	
	IFA Comercial	IFA UVG	IFA Comercial	IFA UVG
3352mu01	++	++	+/-	+
3024mu01	++	++	+	+
3147mu01	++	+	+	+
3681mu01	++	++	+/-	+
3190mu01	++	++	++	++
3021mu01	+	++	-	+
3149mu01	+++	++	+/-	++
3162mu01	+/-	++	+/-	++
3191mu01	++	++	+	++
3331ni01	-	-	-	-
3327mu01	++	++	++	++
3816ni01	+	+	-	+/-
3818ni01	-	-	-	-
3179mu01	+/-	+/-	+/-	+/-
3330mu01	-	-	-	-
3313mu01	++	++	++	+
3555mu01	++	++	+	+
3071mu01	++	++	+	+
3067mu01	++	++	++	+
3173mu01	+	++	+/-	++
3127mu01	++	++	+	++
3125mu01	+/-	-	+/-	-
3137mu01	++	++	+	+
3778Bni01	-	-	-	-
3287mu01	++	+	++	+
3120mu01	++	++	+	+
3032mu01	++	++	++	++
3054mu01	+	++	+	+
3052mu01	++	+	++	+
3058mu01	++	++	++	+
3070mu01	++	++	+	++
3057mu01	++	++	+	+
3197mu01	++	++	++	++
3793mu01	++	++	++	+
3809mu01	++	++	++	++
3606ni01	+/-	+/-	+/-	+/-

Continuación Anexo 2

Muestra	Dilución 1:40		Dilución 1:80	
	IFA Comercial	IFA UVG	IFA Comercial	IFA UVG
3031mu01	++	+++	+	++
3248mu01	+	++	+/-	+
3227mu01	++	+	+	+
3207mu01	++	++	+	+
3878mu01	++	+	++	+
3296ni01	+/-	-	+/-	-
3363mu01	++	++	+	+
3365mu01	++	++	+	+

* Un signo – indica ausencia de fluorescencia, un signo + indica presencia de fluorescencia. A mayor cantidad de signos positivos, mayor fue la intensidad observada. Combinaciones de signos +/- indican que la fluorescencia observada fue baja.

** A los signos se les asignaron las siguientes magnitudes para la prueba Wilcoxon:

- = 0;

+/- = 0.25;

+/- = 0.5;

+/- = 0.75;

+ = 1;

++ = 2;

+++ = 3

Anexo 3. Detalle edad del sujeto y resultados para las pruebas ELISA, IFA Comercial (Vircell) e IFA local (IFA UVG) para cada muestra.

Muestra	Edad	Resultados ELISA recombinante	Resultados IFA (Vircell)	Resultados IFA UVG
3052mu01	24	1	1	1
3054mu01	35	1	1	1
3057mu01	44	1	1	1
3058 mu01	32	1	1	1
3067 mu01	35	1	1	1
3070 mu01	44	1	1	1
3071 mu01	33	1	1	1
3555 mu01	35	1	1	1
3197 mu01	39	1	1	1
3207 mu01	40	1	1	1
3024 mu01	39	1	1	1
3021 mu01	24	1	1	1
3363 mu01	44	1	1	1
3365 mu01	44	1	1	1
3878 mu01	40	1	1	1
3352 mu01	42	1	1	1
3127 mu01	21	1	1	1
3137 mu01	44	1	1	1
3031 mu01	39	1	1	1
3032 mu01	28	1	1	1
3147 mu01	41	1	1	1
3149 mu01	34	1	1	1
3162 mu01	39	1	1	1
3173 mu01	43	1	1	1
3179 mu01	19	1	1	1
3191 mu01	33	1	1	1
3190 mu01	32	1	1	1
3681 mu01	41	1	1	1
3313 mu01	39	1	1	1
3327 mu01	35	0	1	1
3331ni01	11	1	1	0
3816 ni01	8	1	1	1
3330 mu01	39	0	0	0
3818ni01	11	0	0	0
3793 mu01	37	1	1	1

Continuación Anexo 3

Muestra	Edad	Resultados ELISA recombinante	Resultados IFA (Vircell)	Resultados IFA UVG
3809 mu01	34	1	1	1
3296ni01	8	0	1	0
3120 mu01	39	1	1	1
3606 ni01	13	1	1	1
3287 mu01	35	1	1	1
3778Bni01	12	1	0	0
3248 mu01	42	1	1	1
3227 mu01	30	1	1	1
F1	20	0	0	0

*1= positivo, 0 = negativo. Resultados discordantes marcados en gris.