



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académica Profesional de Microbiología y Parasitología

**Estandarización y evaluación de una prueba de
inmunohistoquímica para la detección de *Trypanosoma
cruzi* en tejidos de *Cavia porcellus* experimentalmente
infectados**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Teresa Milagros ROJAS ROJAS

ASESOR

Rosa Nerida MARTÍNEZ ROJAS

Lima, Perú

2013

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi*, que se encuentra en América Latina y afecta sobre todo zonas rurales de regiones endémicas del Perú, Chile, Argentina, Brasil, Colombia, México y el sur de los Estados Unidos. Actualmente, no existen muchos estudios en modelos animales de las consecuencias que genera el parásito en la infección crónica en el ser humano. Entre los modelos animales para esta enfermedad parasitaria, ha sido escogido el “cobayo”, como modelo experimental. Debido a la importancia epidemiológica que ha adquirido la enfermedad de Chagas en la región sur del Perú, donde es endémica.

El objetivo principal del estudio fue estandarizar y evaluar la prueba de inmunohistoquímica (IHC) en tejido cardíaco de cobayos experimentalmente infectados. Para ello, se estudiaron 48 cobayos infectados con la cepa Y de *T. cruzi* y 12 cobayos no infectados, los cuales sirvieron como grupo control. La infección en cada animal fue verificada mediante un frotis de sangre. Para encontrar el tiempo mínimo de post-infección en que la prueba de IHC puede detectar al parásito, se sacrificaron los cobayos pertenecientes a los grupos de 5, 13, 27, 56, 117 y 167 días post-infección, para coincidir con los días de infección aguda y crónica. Al mismo tiempo, la prueba de IHC fue comparada con la tinción de Hematoxilina Eosina (H&E).

Para el desarrollo de la prueba de IHC, fue necesario la producción de anticuerpos polivalentes utilizando antígenos de excreción-secreción de formas tripomastigotes del parásito (TESA). Se escogió el conejo, ya que la cantidad que se requería de anticuerpo policlonal es poca y es factible la manipulación de estos animales en el laboratorio.

La prueba de IHC presentó una sensibilidad del 58%, mientras que la tinción de H&E presentó una sensibilidad del 44%. La especificidad de ambas pruebas fue del 100%. El tiempo mínimo de detección del parásito *T. cruzi* en tejido cardíaco fue de 13 días post-infección, empleando la prueba de Inmunohistoquímica,

De acuerdo a los datos obtenidos, se puede concluir que la prueba de IHC resulta ser más sensible que la tinción de H&E, al detectar mayor cantidad de nidos de amastigotes en tejido cardíaco y en un menor tiempo.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, modelo animal, Inmunohistoquímica, Hematoxilina eosina, antígenos de excreción y secreción.

ABSTRACT

Chagas' disease is an infectious disease caused by *Trypanosoma cruzi* being responsible for an important mortality rate in several endemic Latin American countries, such as Argentina, Brazil, Chile, Colombia, Mexico and Peru. It has also been described in the past decade in the Southern region of the United States. To date, there is a paucity of *in vivo* experimental models reproducing the chronic infection observed during the infection in human. Among the available animal models, the guinea pig has been chosen as an animal model because of increased epidemiological importance in the southern region of Peru where Chagas' disease is endemic.

The main objective of this study was to develop and standardize an immunohistochemistry (IHC) assay for the detection of *T. cruzi* in the cardiac tissues of infected *C. porcellus*. For this purpose we used 48 guinea pigs infected with *T. cruzi* Y strain and 12 non-infected normal controls. Infection in each animal was verified by blood smears. In order to find the minimal period of infection in the immunohistochemistry assay we sacrificed guinea pigs from 5, 13, 27, 56, 117 and 167 days post-infection. Immunohistochemistry assay was compared with Haematoxylin eosin staining (H&E).

Using rabbits, we produced polyvalent antibodies against *T. cruzi* using secretion and excretion antigens of tripomastigote (TESA) forms of the parasite.

The sensitivity of the IHC assay was of 58% compared to 44% obtained by the H&E staining; the specificity obtained by each assay was 100%. The minimum period to detect the parasite in cardiac tissue was 13 days post-infection.

Our results show that the IHC is more sensitive than H&E to detect *T. cruzi* infection, being thus a better tool to detect the presence of amastigote nests within cardiac tissue. Further study with a higher numbers of specimens is needed to evaluate the real efficiency of the IHC assay.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, animal model, Immunohistochemistry, Haematoxylin eosin, excretion and secretion antigens.