

Nº 3/2012



SOCIEDAD CHILENA DE PARASITOLOGIA
(SOCHIPA)

PARASITOLOGIA AL DIA

Resúmenes Reuniones Científicas

COMITÉ EDITORIAL

DR. WERNER APT Profesor Titular Universidad de Chile

DR. HECTOR ALCAINO Profesor Titular Universidad de Chile

DRA. MARISA TORRES Profesor Asistente Adjunto Pontificia Universidad Católica de Chile

DRA. INES ZULANTAY Profesor Asociado Universidad de Chile

**CARACTERIZACION DE *Cryptosporidium* AISLADO EN CHILE
USANDO el gen gp60, GLICOPROTEÍNA RELACIONADA
CON LA INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDERO**

*Rubén Mercado^a, Luiz S. Ozaki^b, Isabel Noemi^c, Alejandro Viovy^c, José Luis Cervá^c,
Ana María Pino^c, Camila Sepúlveda^d, Sebastián Peña^d, Leonardo Saenz^e
& Fernando Fredes^d.*

^a Unidad Docente de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile rmercado@med.uchile.cl.

^b Center for the Study of Biological Complexity, VCU, EEUU. ^c Unidad de Parasitología, Hospital Luís Calvo-Mackenna. ^d Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. ^e BIOVETEC, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

El género *Cryptosporidium* está compuesto por parásitos protozoarios que infectan las microvellosidades de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, generando cuadros diarreicos en toda clase de vertebrados (Xiao *et al.*, 2004; Fayer, 2008). Se reconocen 19 especies de *Cryptosporidium* (Fayer, 2010) y más de 40 aislados referidos como genotipos (Fayer, 2008). A lo menos ocho especies (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* y *C. ubiquitum*) (Guyot *et al.*, 2001; Coupe *et al.*, 2005; Chalmers y Davies, 2010; Fayer *et al.*, 2010; Xiao, 2010; Neira *et al.*, 2012) están asociados con enfermedad en seres humanos, siendo *C. hominis* y *C. parvum* causantes de aproximadamente el 90% de los casos de criptosporidiosis en los distintos países estudiados (Xiao, 2010).

Uno de los mayores problemas para entender la transmisión de las infecciones por *Cryptosporidium* es la ausencia de una diferenciación morfológica de los estadios de ooquistes del parásito. Debido a lo anterior, no es posible conocer el rol de las especies/genotipos en la virulencia o transmisión, así como el número de especies precisas que afectan al ser humano (Xiao *et al.*, 2004).

La codificación completa del genoma de *C. parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004) y *C. hominis* (Xu *et al.*, 2004), ha permitido la caracterización de marcadores genéticos y por lo tanto, ha facilitado la identificación de variaciones intra e inter-especies (Robinson y Chalmers, 2012). Uno de los que ha cobrado importancia es la secuenciación del gen gp60. Este gen codifica para una glicoproteína de 330 aminoácidos, el cual contiene un péptido señal en su extremo amino terminal, seguido de un tramo homopolimérico de residuos de serina, seguido de 36 sitios para O-glicosilaciones de proteínas y en su extremo carboxilo terminal, posee un péptido de unión a glicosilfosfatidilinositol (Strong *et al.*, 2000). Este precursor glicoproteico de 60 kDa es proteolíticamente escindido en dos glicoproteínas de 15 y 40 kDa en la membrana celular de esporozoitos y merozoitos de *Cryptosporidium* (Strong *et al.*, 2000; Cevallos *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2007). Estas glicoproteínas de superficie le confieren al parásito capacidad de adhesión y

ubicación intracelular pero extracitoplasmática en las células epiteliales del tracto gastrointestinal del hospedero (Strong *et al.*, 2000; Cevallos *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2003). Lo anterior lo convierte en uno de los objetivos importantes para la respuesta de anticuerpos neutralizantes en humanos (Xiao, 2010).

La utilidad de gp60 como marcador genético está dado por que es un gen de una sola copia (Strong *et al.*, 2000), lo que disminuye la posibilidad de encontrar polimorfismo en la secuencia dentro de un mismo individuo y/o dentro de un mismo aislado de este parásito en un hospedero, facilitando el análisis directo de su secuencia de DNA (Jex, A. *et al.*, 2007). Además, contiene múltiples regiones las cuales muestran una alta tasa de mutación, en especial, una región micro-satélite “hipervariable”, la cual comprende repeticiones de tres nucleótidos que codifican para serina (Strong *et al.*, 2000). El polimorfismo encontrado dentro de gp60, ha dado paso a la identificación de familias de subtipos dentro de *C. parvum* y *C. hominis*, los cuales se diferencian en las rutas de infección, rango de hospederos y en su patogenicidad (Cama *et al.*, 2008; Adamu, 2010; Nazemalhosseini-Mojarad, 2011) incrementándose así la comprensión de la epidemiología de la criptosporidiosis (Waldron y Power, 2011) y particularmente en los aislados de *C. hominis*, en los cuales este polimorfismo es mucho mayor que cualquier otro loci genético de *Cryptosporidium* examinado hasta la fecha (Alves *et al.*, 2003).

Hasta el año 2010, a nivel global, la riqueza de genotipos de *Cryptosporidium* mediante el análisis completo o parcial de la secuencia de gp60, dio como resultados la identificación de 6 familias de subtipos para *C. hominis* y 10 familias de subtipos para *C. parvum*, las cuales se denominan I para *C. hominis* (Ia-g, excluyendo a Ic el cual aún no ha sido identificado) y II para *C. parvum* (Ia-k) (Jex y Gasser, 2010). Las familias de subtipos más dominantes a nivel global en humanos y animales es IIa, seguido de Ib. Pero la familia de subtipo predominante en los aislados humanos es Ib (Jex y Gasser, 2010). Para designar cada subtipo, se utiliza la nomenclatura definida por Strong *et al.* (2000), donde “familia de subtipo” se refiere a las diferencias en la secuencia de gp60 que no se encuentran en el “tramo micro-satélite de TCA” (serina). Un “subtipo”, es una variante de cada familia, cuya variación nucleotídica se encuentra dentro del tramo TCA. El “tramo TCA micro-satélite” es la porción dentro del gen que codifica para gp60, que transcribe el tramo de serinas (de la proteína de superficie gp40) que muestra variaciones en la longitud y comprende un número variable de “A” (TCA), “G” (TCG), “T” (TCT) y “R” (repeticiones raras). Estas últimas se definen como repeticiones no comunes de trinucleótidos dentro de esta región micro-satélite, derivado desde una mutación puntual en la primera posición de TCA (casi siempre se observa como “ACA”) (Jex *et al.*, 2007; Jex y Gasser, 2010). Es así, como el nombre IbA10G2, indica que el parásito corresponde a *C. hominis* subtipo Ib y que tiene diez copias de la repetición TCA y dos copias de la repetición TCG en el tramo de serinas del gen de la gp60 (Xiao, 2010). Alrededor del

mundo el subtipo más común es IbA10G2R2, el cual se asocia con brotes de criptosporidiosis humana derivada de agua o alimentos contaminados (Jex y Gasser, 2010). Debe tenerse en cuenta que gp60 no amplifica para DNA de *C. felis*, *C. canis* y cualquier otra especie distante de *C. parvum* y *C. hominis* (Xiao, 2010).

Para la determinación de la secuencia del gen de gp60, se requiere del uso de métodos moleculares. La prueba mayormente utilizada es la PCR Anidada (Nested PCR) la cual comprende dos rondas de amplificación. La primera utiliza partidores externos que amplifican una región extensa de DNA, para luego en la segunda ronda, utilizar partidores internos que contienen la secuencia blanco (Saladrigas, 2006). Por lo general, existen protocolos que utilizan partidores basados en secuencias conservadas de la mayoría de los alelos de *C. parvum* y *C. hominis* conocidos hasta el momento (Chalmers *et al.*, 2005).

En Chile hasta la fecha, no se ha efectuado la caracterización *Cryptosporidium* a partir del gen de gp60. Los estudios moleculares de aislados chilenos del parásito solo han llegado hasta el nivel de especie y genotipo (Neira *et al.*, 2005; Mercado *et al.*, 2007; Díaz-Lee *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011; Neira *et al.*, 2012).

En esta presentación se describe por primera vez la identificación molecular de *Cryptosporidium* que causa infecciones humanas endémicas en Chile usando la secuenciación del gen gp60 del parásito. Se detectó la presencia del protozoo mediante tinción de Ziehl-Neelsen modificada en una muestra fecal de un menor de sexo masculino de 4 años de edad en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Luis C. Mackenna. Se trata de un paciente que es trasplantado hepático de donante vivo y que presentó un cuadro de diarrea prolongada. Se realizó extracción de DNA de la muestra fecal y se efectuó PCR usando los partidores (primers) gp15-ATG (ATGAGATTGTCGCYCATTATC) y gp15-STOP (TTACAACACGAATAAGGCTGC) descritos por Strong *et al.*, 2000. El segmento amplificado fue secuenciado una vez usando el método de secuenciación di-deoxy terminal en NARF (Nucleic Acid Research Facilities en VCU, EEUU (NARF: <http://www.narf.vcu.edu/sequencing.html>) y se analizó mediante programa computacional Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EEUU). Fue identificado como **IdA16** (codón de serinas =16 TCA) comparándose exactamente con secuencias descritas en GenBank. Se puede concluir que este paciente se infectó por el ciclo antroponótico (a partir de otro humano) con *C. hominis* genotipo IdA16.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1121035
y parcialmente Proyecto FONDECYT 1110255

Referencias

- Adamu, H., Petros, B., Hailu, A., Petry, F. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Tropica* (2010), 115:77-83.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A., Matos, O., Antunes, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* (2003), 41:2744-2747.
- Cama, V., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C., Ortega, Y., Gilman, R., Xiao, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Perú. *Emerging Infectious Diseases* (2008), 14:1567-1574.
- Cevallos, A., Bhat, N., Verdon, R., Hamer, D., Stein, B., Tzipori, S., Pereira, M., Keusch, G., Ward, H. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by neutralizing monoclonal antibody. *Infect. Immu.* (2000), 68:5167-5175.
- Chalmers, R., Davies, A. Minireview: clinical criptosporidiosis. *Exp Parasitol.* (2010), 124:138-146.
- Chalmers, R., Ferguson, C., Cacciò, S., Gasser, R., Abs EL-Osta, Y., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M., Stevens, M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology* (2005), 35:397-410.
- Coupe, S., Sarfati, C., Hamane, S., Derouin, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* (2005), 43:1017-1023.
- Díaz-Lee, A., Mercado, R., Onuoha, E., Ozaki, L., Muñoz, P., Muñoz, V., Martínez, F., Fredes, F. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet Parasitol.* (2011) 176:139-144.
- Fayer, R. General Biology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis 2nd ed. CRC Press. Florida, USA. (2008), pp. 1-35.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelièvre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* (2010), 39:3472-3480.

- Jex, A. and Gasser, R. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies – Research review. *Biotechnology Advances* (2010), 28:17-26.
- Jex, A., Whipp, M., Campbell, B., Cacciò, S., Stevens, M., Hogg, G., Gasser, R. A practical and cost-effective mutation scanning-bases approach for investigation genetic variation in *Cryptosporidium*. *Electrophoresis* (2007), 28:3875-3883.
- Mercado, R., Buck, G., Manque, P., Ozaki, L.S. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. *Emerg Infect Dis* (2007) 13:462-464.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E., Haghighi, A., Taghipour, N., Keshavarz, A., Mohebi, S., Zali, M., Xiao, L. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology* (2011), 179:250-252.
- O'Connor R., Wanyiri, J., Cevallos, A., Priest, J., Ward, H. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2007), 156:80-83.
- Robinson, G., Chalmers, R. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp. Parasitol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.016>.
- Strong, W., Gut, J., Nelson, R. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect. Immun.* (2000), 68:4117-4134.
- Waldron, L. and Power, M. Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution* (2001), 11:1388-1395.
- Xiao, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol* (2010), 124: 80-89.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* (2004), 17:72-97.

**DENSIDAD RELATIVA DE *Mepraia spinolai* Y PREVALENCIA
DE *Trypanosoma cruzi* EN FOCOS DE LAS REGIONES DE COQUIMBO,
VALPARAÍSO Y METROPOLITANA.**

Viviana Estadella, Antonella Bacigalupo, Pedro E. Cattán.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile

Para caracterizar la situación epidemiológica del vector silvestre en la zona centro-norte del Chile, se quiso determinar la densidad relativa de *Mepraia spinolai* y comparar su prevalencia de *Trypanosoma cruzi* por estadio y foco.

Los insectos se capturaron utilizando cebos emisores de dióxido de carbono, y se evaluó la positividad a *T. cruzi* de los abdómenes de cada triatomino, realizándose extracción de ADN, posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los partidores 121 y 122, dirigidos a la región constante de los minicírculos del kinetoplasto del protozoo, y finalmente, electroforesis en gel de agarosa. Los resultados de prevalencia se compararon mediante el test exacto de Fisher.

Se capturaron 450 especímenes en 39 noches. Las densidades relativas para cada foco fueron: El Maqui: 1,43 individuos/10 m²; Reserva Nacional Las Chichillas: 0,85 individuos/10 m²; El Sobrante: 0,82 individuos/10 m²; Putaendo: 1,63 individuos/10 m² y Til-Til: 1,72 individuos/10 m². Los resultados de positividad a *T. cruzi* por foco fueron: El Maqui: 35,42%; Reserva Nacional Las Chinchillas: 44,67%; El Sobrante: 27,27%; Putaendo: 32,81% y Til-Til: 36,94%. No se encontraron diferencias en la prevalencia entre estos focos ($p= 0,325$), ni dentro de los estadios ninfales en cada foco (El Maqui: $p= 0,965$; Las Chinchillas: $p= 0,515$; El Sobrante: $p= 1,000$; Putaendo: $p= 0,970$; Til - Til: $p= 0,256$).

Se observa que las densidades relativas muestran índices menores a los obtenidos en estudios previos; tales diferencias se podrían atribuir a la variabilidad de *M. spinolai* dentro de cada sitio, por su distribución agregada. Se destaca que cualquier estado ninfal o adulto de esta especie tiene una probabilidad similar de estar infectado con *T. cruzi*, y por tanto, todos ellos representan un riesgo de transmisión del parásito a los mamíferos susceptibles, incluyendo a los seres humanos.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100339

Referencias

- BACIGALUPO, A.; SEGURA, J.; GARCÍA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P.E. 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Med Chil* 134: 1230-1236.
- BARROZO, R.; LAZZARI, C. 2004. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem Senses* 29: 319-329.
- BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A. 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 237-9.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.E.; MEDEL, R. 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop* 98: 219-223.
- CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.E. 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol Día*: 22: 3-4.
- CATTAN, P.E.; PINOCHET, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ACUÑA, M.; CANALS, M. 2002. Abundance of *Mepraia spinolai* in a Periurban Zone of Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(3): 285-287.
- FRÍAS, D.; SOLARI, A.; GONZALES, C.; HENRY, A.; ALVIÑA, A. 1995. Índices de infección de *Mepraia spinolai* con *Trypanosoma cruzi*, su invasión a ambientes domésticos e interacción con *Triatoma infestans*. *Parasitol Día*; 19: 139-A, 195.

MECANISMOS DE EVASIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO MEDIADOS POR *Trypanosoma cruzi*

Galia Ramírez^a, Valentina Tapia^a, Pablo Galdames^a, Arturo Ferreira^b,
Carolina Valck^b, Viviana Ferreira^c, Lucía Valenzuela^d y Gonzalo Cabrera^d

^aUnidad de Parasitología, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. ^bPrograma Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile. ^cDepartment of Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, University of Toledo, OH, USA. ^dPrograma de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La enfermedad de Chagas es considerada la tercera enfermedad infecciosa más frecuente en Latinoamérica, donde afecta alrededor de 11 millones de personas, causando discapacidad en aproximadamente un 30% de los infectados (Clayton J., et al. 2010).

Su agente causal, *Trypanosoma cruzi* ha desarrollado a lo largo de la evolución diversas estrategias evasoras de la respuesta inmune de su hospedero. Entre ellas, se describe su capacidad de evadir el sistema del complemento a través de múltiples mecanismos que involucran diversas proteínas. Es así como se describe que los epimastigotes, formas replicativas no infectantes, son susceptibles a la destrucción por el sistema del complemento. Por el contrario, los tripomastigotes, las formas infectantes son resistentes a la lisis (Schenkman, S., et al. 1986).

El sistema del complemento es una red de alrededor de 40 proteínas plasmáticas que se activan secuencialmente en presencia de distintas señales de peligro presentes en los agresores microbianos. Está compuesto por tres rutas de activación. La ruta clásica, cuyo patrón de reconocimiento es C1q, el cual reconoce complejos antígeno-anticuerpo presentes en las superficies de los patógenos. La ruta de las lectinas, cuyo patrón de reconocimiento es MBL y ficolinas con capacidad reconocer manosa y otros carbohidratos presentes en la superficie de algunos agresores, y finalmente, la ruta alterna, que está en constante activación y su control depende de la presencia de diversas proteínas con capacidad de inhibir o potenciar la ruta, discriminando entre superficies “propias” o “ajenas”. Las tres rutas convergen en la formación de C3, molécula con acción enzimática capaz de formar una C3 convertasa que escindirá a otras proteínas de la cascada, llegando a la formación del complejo de ataque a membrana que llevará a la lisis celular (Lambris J.D., et al., 2008).

En relación a la evasión de la ruta clásica del sistema del complemento, Ferreira et al., 2004 demostró que *T. cruzi* puede evadir esta ruta a través de la unión de calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) presente en su superficie a C1q. Además, esta interacción TcCRT/C1q media un aumento en la infectividad de los tripomastigotes, la que puede ser inhibida mediante el uso de fragmentos F(ab')₂ dirigidos contra TcCRT (Ramírez et al., 2011).

Por otro lado, entre las proteínas de control negativo de la ruta alterna del sistema del complemento podemos destacar a factor H (fH), compuesta por 20 dominios con sitios de unión para diferentes moléculas de superficie y poli-aniones que le confieren diversas funciones. Entre ellas, se destacan su capacidad de acelerar el decaimiento de la convertasa de C3 y servir de co-

factor para el factor I, molécula encargada de la inactivación de C3b a iC3b (Pangburn M.K., et al., 2009).

Antecedentes previos han demostrado que fH se une a *T. cruzi* de manera diferencial en tripomastigotes y epimastigotes (Joiner, K., et al., 1986). Probablemente, esta unión se realiza a través del ácido siálico que *T. cruzi* recluta y deposita en las mucinas de superficie del parásito desde las células del hospedero. Sin embargo, recientemente se ha descrito que existen diferentes susceptibilidades al sistema del complemento entre distintas cepas de *T. cruzi* (Cestari, I. and Ramírez, M.I., 2010). Nosotros proponemos que las diferencias en la susceptibilidad al sistema del complemento puede deberse, al menos en parte, a diferencias en la unión de fH a la superficie de *T. cruzi*.

Determinamos la susceptibilidad al sistema del complemento de tripomastigotes y epimastigotes mantenidos en cultivo celular y axénico, respectivamente, del clon Dm28 y la cepa Y de *T. cruzi*. Luego, medimos el depósito de fH presente en un suero deficiente en C5 en la superficie de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* con un anticuerpo policlonal anti-fH a través de citometría de flujo para ambas cepas a los 30 minutos de activación, en presencia de EGTA.

Nuestros resultados muestran que existen diferencias en la susceptibilidad de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* al sistema del complemento, siendo los epimastigotes susceptibles y los tripomastigotes resistentes. Sin embargo, no existen diferencias entre el clon Dm28 y la cepa Y.

En relación al depósito de fH a los 30 minutos de activación de la ruta alterna del sistema del complemento, los tripomastigotes del clon Dm28 y la cepa Y no muestran depósito de fH en su superficie. Paradójicamente, los epimastigotes de ambos depositan fH, sin embargo, este mayor depósito no se refleja en una mayor protección al sistema del complemento. Es probable, que este hecho sea dado por la unión de un dominio de fH que no posee una consecuencia funcional en la inhibición de la ruta alterna. Estos experimentos en curso abren nuevas interrogantes para dilucidar los dominios específicos de unión de fH a epimastigotes.

La identificación de los mecanismos moleculares que utiliza *T. cruzi* para evadir el sistema inmune del hospedero contribuirá en la búsqueda de nuevas terapias para incrementar la susceptibilidad de este agente biológico.

Financiamiento: Este trabajo fue financiado por FONDECYT de Iniciación N° 11110251 (GR), FONDECYT de Iniciación N° 11100053 (GC) y el Fondo de Investigación en Ciencias Veterinarias FIV 121017019102028 (GR)

Referencias

- Cestari, I. and Ramírez M.I. (2010). Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. PLoS One. 5(3): e9721.
- Clayton, J. (2010). Nat. 465(7301):4-5.
- Ferreira, V., et al. (2004). The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 172(5): 3042-3050
- Joiner, K., et al. (1986). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. Proc Natl Acad Sci USA. 83(17): 6593-6597.
- Lambris, J.D., et al. (2008). Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 6(2): 132-142.
- Pangburn, M.K., et al. (2009). Polyanion-induced self-association of complement factor H. J Immunol. 182(2): 1061-1068.
- Pechtl, I.C., et al. (2011). Disease-associated N-terminal complement factor H mutations perturb cofactor and decay-accelerating activities. J Biol Chem. 286(13):11082-90.
- Ramírez, G., et al. (2011). *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. Immunobiol. 216(1-2):265-73
- Ramírez, J.D., et al. (2010). Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chronic Chagasic Patients. PLoS Negl Trop Dis. 4(11): e899.
- Schenkman, S., et al. (1986). Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. J Immunol. 137(5): 1623-1628.

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA. DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE PCR TIEMPO REAL EN DEYECCIONES DE TRIATOMINOS ALIMENTADOS POR XENODIAGNÓSTICO

Miguel Saavedra, Inés Zulantay, Eduardo Araya, Nicolás Bravo, Werner Apt
Laboratorio de Parasitología Básico Clínico. Programa de Biología Molecular y Celular.
Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar parasitemias bajas y fluctuantes. La reacción de PCR convencional, ha evidenciado alta sensibilidad en la detección de *Trypanosoma cruzi* (Britto *et al.*, 2010; Schijman *et al.*, 2011), al contrario de técnicas parasitológicas convencionales como el xenodiagnóstico (XD) (Schenone, 2009). No obstante, nuestro grupo ha demostrado que combinando la capacidad del PCR de amplificar una secuencia de ADN blanco y de *Triatoma infestans* para amplificar *T. cruzi* mediante XD, aumenta considerablemente la sensibilidad diagnóstica. A dicha herramienta la hemos denominado XD-PCR (Zulantay *et al.*, 2007, 2011).

La introducción reciente de PCR Tiempo Real para cuantificar *T. cruzi* (Duffy *et al.*, 2009) nos ha permitido proponer la aplicación de XD-qPCR en individuos con enfermedad de Chagas crónica con el fin de detectar parásitos viables amplificados en el vector biológico y cuantificar el rango de *T. cruzi* multiplicados en el intestino de *Triatoma infestans*.

A diez individuos con enfermedad de Chagas crónica bajo Consentimiento Informado se aplicó dos cajas de XD que contenían un total de 14 ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans*.

Se obtuvo un pool de muestras de deyección (MD) a los 30, 60 y 90 días post alimentación (3 muestras por individuo), a las cuales se aplicó qPCR (XD-qPCR) utilizando el sistema de detección TaqMan® con los partidores de ADN satelital cruzi 1, cruzi 2 y sonda cruzi 3, para un volumen final de reacción de 20 µL. La curva estándar se construyó con diluciones de ADN de *T. cruzi* partiendo de 100.000 a 1 parásito/ml (RSq: 0.999; Y: -3.383; Eficiencia: 97.1%) y como control interno exógeno se aplicó X12 según se describe en Bravo *et al.*, 2012.

La cuantificación de *T. cruzi* en las 30 MD, evidencia la amplificación exponencial post-alimentación descrita en literatura, con rangos entre <1 a 1500 parásitos/ml. La metodología XD-qPCR para detectar *T. cruzi*, está siendo aplicada por nosotros en la evaluación de eficacia con nifurtimox, considerando la demostrada capacidad de amplificación de *T. infestans*.

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1100768 y 1120382

Referencias

- Bravo N, Muñoz C, Nazal N, Saavedra M, Martínez G, Araya E, Apt W, Zulantay I. 2012. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. *Parasit Vectors* 5:59
- Britto CC. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (1):122-35.
- Shenone, H. 1999. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94:289-294.
- Zulantay I, Apt W, Gil LC, Rocha C, Mundaca K, Solari A, Sánchez G, Rodríguez C, Martínez G, De Pablos LM, Sandoval L, Rodríguez J, Vilchez S, Osuna A. 2007. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol* 101(8):673-9
- Zulantay I, Apt W, Valencia C, Torres A, Saavedra M, Rodríguez J, Sandoval L, Martínez G, Thieme P, Sepúlveda E. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother*. 66(10):2224-6.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 11;5(1):e931.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3(4):e419. *PLoS Negl Trop Dis* 3(4):e419.



REUNIÓN CIENTÍFICA
SOCIEDAD CHILENA DE PARASITOLOGÍA (SOCHIPA)

31 de Agosto 2012
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

**Caracterización de *Cryptosporidium* aislado en Chile usando el gen gp60,
glicoproteína relacionada con la interacción parásito-hospedero**

*Rubén Mercado, Luiz S. Ozaki, Isabel Noemí, Alejandro Viovy, José Luis Cerva,
Ana María Pino, Camila Sepúlveda, Sebastián Peña, Leonardo Saenz, Fernando Fredes*

Unidad Docente de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Center for the Study of Biological Complexity, VCU, EEUU.

Unidad de Parasitología, Hospital Luís Calvo-Mackenna.

Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

BIOVETEC, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

**Densidad relativa de *Mepraia spinolai* y prevalencia de *Trypanosoma cruzi*,
en focos de las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana.**

Viviana Estadella, Antonella Bacigalupo, Pedro E. Cattán

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Mecanismos de evasión del sistema del complemento mediados por *Trypanosoma cruzi*.

Galia Ramírez, Valentina Tapia, Pablo Galdames, Arturo Ferreira, Carolina Valck,

Viviana Ferreira, Lucía Valenzuela, Gonzalo Cabrera.

Depto. Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile.

Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, University of Toledo, OH, USA.

Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**PCR Tiempo Real para *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de *Triatoma infestans*
alimentados sobre individuos con enfermedad de Chagas crónica**

Miguel Saavedra, Inés Zulantay, Eduardo Araya, Nicolás Bravo, Werner Apt

Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Impreso financiado por los Proyectos Fondecyt 1100768 (I.Z.) y 1120382 (W.A.)