

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”**



DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CIRCULANTES DE *Trypanosoma*  
*cruzi* EN PACIENTES CON VIH DE UNA POBLACIÓN  
ENDÉMICA DE BOLIVIA

**LILIAM AYME BARRUETA SORIA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Lima - Perú**

**2018**

## **ASESOR**

Dr. Holger Mayta Malpartida

## **MIEMBROS DEL JURADO**

Dra. Patricia Herrera Velit

Presidenta

Dra. Dionicia Gamboa Vilela

Vocal

Dra. Cristina Guerra Giraldez

Secretaria

## **FECHA DE SUSTENTACIÓN**

10-04-2018

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, LILIAM AYME BARRUETA SORIA, identificada con DNI 74933706, Bachiller en Ciencias Biológicas, declaro que soy la única autora de la tesis titulada “Detección de antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con VIH de una población endémica de Bolivia”, para optar el título de licenciado en Biología.

---

Liliam Ayme Barrueta Soria

## **DEDICATORIA**

A Dios por permitirme vivir mis días con alegrías, motivaciones y con la convicción de  
que nunca se deja de aprender.

A mis padres y mi hermana quienes con su cariño, cuidados y esmero me permitieron el  
tiempo necesario para realizar este trabajo

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor, el Dr. Holger Mayta, quien, con su apoyo y confianza en mi trabajo, me guio hasta alcanzar los objetivos de la presente tesis.

A los doctores: Robert H. Gilman, Manuela Verástegui y Maritza Calderón, investigadores del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas, por sus consejos y colaboración activa durante el desarrollo de la tesis.

A mi amiga y compañera de laboratorio Edith Málaga por su orientación, paciencia y por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades durante el desarrollo de la tesis.

A mis amigos y compañeros de trabajo Jessy Condori y Cristian Roca, quienes fueron un soporte emocional y profesional durante los días de trabajo en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio que de una u otra manera colaboraron con el desarrollo de la tesis.

## **FINANCIAMIENTO**

La presente tesis fue financiada por el Programa de Ciencia y Tecnología – FINCyT de acuerdo con el contrato PIAP-1-P-251-13

# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Taxonomía de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
1.4 Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
1.4.1 Tripomastigote.....	6
1.4.2 Amastigote.....	6
1.4.3 Epimastigote.....	6
1.5 Vector de la enfermedad de Chagas.....	7
1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.....	7
1.7 Técnicas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas.....	8
1.7.1 Métodos directos.....	8
1.7.2 Métodos serológicos.....	9
1.7.3 Método molecular.....	10
1.8 Antígenos de <i>Trypanosma cruzi</i> : TESA, 1F8 y proteína de membrana.....	10
1.9 Coinfección <i>Trypanosma cruzi</i> /VIH.....	12
1.10 Anticuerpos policlonales.....	13
1.11 Estudio previo.....	14
<b>II. HIPOTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Objetivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
4.1 Purificación de anticuerpos IgY.....	17

4.2 Purificación de anticuerpos IgG.....	17
4.3 Cuantificación de proteínas.....	18
4.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	18
4.5 Modificaciones del protocolo original ELISA-Ag.....	18
4.6 ELISA de captura de antígeno (ELISA-Ag) en suero, plasma y orina.....	19
4.6.1 Muestras evaluadas.....	19
4.6.2 Tratamiento de muestras.....	20
4.6.3 Procesamiento de la prueba ELISA-Ag.....	20
4.6.4 Evaluación de la reacción cruzada para la prueba ELISA-Ag.....	21
4.7 Análisis de resultados.....	21
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
5.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	23
5.2 Modificación de la prueba de Elisa-Ag.....	23
5.3 ELISA-Ag en muestras de suero.....	23
5.4 ELISA-Ag en muestras de plasma.....	24
5.5 ELISA-Ag en muestras de orina.....	25
5.6 Evaluación de reacción cruzada para la prueba de ELISA-Ag.....	26
<b>VI. DISCUSIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>VIII. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>



## Índice de Tablas

Tabla 1. Modificaciones al protocolo original del Elisa-Ag.....	37
Tabla 2. Ejemplo de la tabla de cuatro casillas.....	39
Tabla 3. Resultado de la estandarización de la prueba de ELISA –Ag.....	42
Tabla 4. Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de suero.....	43
Tabla 5. Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de plasma.....	45
Tabla 6. Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de orina.....	47
Tabla 7. Tabla 7: Evaluación de la reacción cruzada de la prueba ELISA-Ag.....	49

## Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
Figura 2: Representación estructural de las IgG de camélidos.....	35
Figura 3: Flujograma general de la inmunización de alpacas, gallinas y conejos.....	36
Figura 4: Esquema del ELISA-Ag.....	38
Figura 5: Flujograma del estudio “Detección de antígeno circulante de <i>Trypanosoma cruzi</i> en pacientes con VIH de una población endémica en Bolivia”.....	40
Figura 6: Inmunofluorescencia indirecta del anticuerpo de gallina IgY anti-PM y el IgG anti-TESA de alpaca.....	41
Figura 7: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de suero.....	44
Figura 8: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de suero.....	44
Figura 9: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de plasma...46	
Figura 10: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de plasma.....	46
Figura 11: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de orina.....	48
Figura 12: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de orina...48	

## Lista de Abreviaciones

ELISA-Ag: ELISA para la captura de antígeno circulante

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

TESA-blot: técnica de diagnóstico para la enfermedad de Chagas

IFI: inmunofluorescencia indirecta

HAI: hemaglutinación indirecta

1F8: proteína flagelar

PM: proteína de membrana

IgA, IgM, IgY, IgG: inmunoglobulinas

ADN: ácido desoxirribonucleico

PBST: tampón fosfato salino + tween

BSA: albúmina de suero bovino

OD: densidad óptica

VPP, VPN: valor predictivo positivo, valor predictivo negativo

$\kappa$ : coeficiente kappa

ROC: característica operativa del receptor

AUC: valor del área bajo la curva

Ct: ciclo umbral

$r^2$ : coeficiente de determinación

°C: grados centígrados

KDa: kilo Dalton

mg/ml: miligramos/mililitros

FINCyT: Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología

## Resumen

La enfermedad de Chagas es considerada uno de los mayores problemas de salud en América Latina. El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la detección de anticuerpos, sin embargo, estas pruebas permanecen positivas incluso después del tratamiento exitoso y la erradicación del parásito. Además, las pruebas serológicas podrían presentar reacción cruzada con otras enfermedades como la leishmaniasis y la malaria. Una alternativa adecuada de diagnóstico es la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* en fluidos corporales, ya que estos son un indicador de una infección activa. El presente estudio tuvo por objetivo el desarrollo de una prueba de ELISA para la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* en muestras de fluidos corporales. La prueba se basa en el uso de anticuerpos policlonales generados en gallinas y alpacas inmunizadas con un panel de diversos antígenos de *T. cruzi*. La prueba de ELISA se empleó en un análisis piloto en muestras de suero, plasma y orina de pacientes infectados con VIH, obtenidos de individuos que viven en zonas endémicas en Bolivia. Se espera que esta prueba contribuya en mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, anticuerpos policlonales, IgG e IgY, ELISA, VIH

## **Abstract**

Chagas disease is considered one of the biggest health problems in endemic areas of South America. The diagnosis of the disease is based mainly on the detection of antibodies; however, these assays remain positive even after the successful treatment and eradication of the parasite. In addition, serological tests might cross-react with other diseases such as leishmaniasis and malaria. A diagnostic adequate alternative is the detection of circulating *T. cruzi* antigens present in body fluids of infected individuals, since the presence of these antigens may be a direct indicator of an active infection. The aim of the present study was to develop an ELISA test to detect circulating *T. cruzi* antigens. The test is based on the use of polyclonal antibodies generated in chickens immunized with *T. cruzi* trypomastigote membrane antigens and alpacas immunized with TESA *T. cruzi* antigens. The ELISA test was used in a pilot study using serum, plasma and urine samples obtained from HIV-positive individuals from endemic areas in Bolivia. This test will contribute to improve the diagnosis of Chagas disease.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, policlonals antibodies, IgG and IgY, ELISA, HIV

## I NTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una infección sistémica causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Según los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se calcula que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas, principalmente en zonas endémicas de América Latina (Caryn Bern, 2015). Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una mayor frecuencia de la enfermedad en los Estados Unidos, Canadá, países europeos y algunos del Pacífico Occidental, debido al proceso de migración global (Schmunis, 2007). *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, puede transmitirse por diferentes vías, siendo la más común en América Latina la transmisión a través de las heces u orina de insectos triatominos. La infección, aunque con menor frecuencia, puede ser adquirida mediante transfusión de sangre, donación de órganos, transmisión congénita y por infección oral (Caryn Bern, 2015; Pérez-Molina & Molina, 2017).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por la aparición de anticuerpos específicos durante el desarrollo de la infección. La enfermedad se inicia con la fase aguda, donde los parásitos se encuentran circulando en el torrente sanguíneo y usualmente los individuos infectados no presentan sintomatología. Al cabo de un par de semanas aparecen los anticuerpos IgM como respuesta primaria, ocasionando la disminución de la parasitemia; los anticuerpos IgA también se incrementan en esta misma fase (Lorca, Veloso, Munoz, Bahamonde, & Garcia, 1995). Los anticuerpos IgG se expresan al final de la fase aguda, alcanzan un pico durante la fase crónica y se mantienen por periodos muy prolongados (Caryn Bern, 2015).

En la actualidad existen diversas pruebas de diagnóstico inmunológico que sirven para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra *T. cruzi* (IgG e IgM), como ensayos de inmuno-fluorescencia indirecta (IFI), ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI). Sin embargo, las pruebas serológicas tienen varias limitaciones, como la incapacidad para diferenciar entre una memoria inmunológica y un proceso activo de la enfermedad o una exposición simple a *T. cruzi* u otro parásito con una relación filogenética estrecha (*Leishmanias sp* y *Plasmodium sp*). Así mismo no pueden distinguir un tratamiento exitoso de la enfermedad (Da Silveira, Umezawa, & Luquetti, 2001).

El xenodiagnóstico y el hemocultivo son métodos sensibles para controlar la parasitemia en pacientes inmunosuprimidos. Sin embargo, son técnicas que requieren de mucho tiempo (30 – 120 días) y mano de obra especializada que puedan manipular los parásitos vivos, debido al riesgo de infección. Es por eso que se necesita de pruebas que sean igual de sensibles y que no requieran de largos periodos para así poder iniciar con el tratamiento lo antes posible (Moretti, 2012).

Se sabe que algunos componentes antigénicos de *T. cruzi* circulan libres o en complejos inmunes tanto en suero como en orina de pacientes chagásicos (García-Escalante, Ehrenberg-Enriquez, & Puerto, 1996), los cuales podrían ser útiles para el desarrollo de nuevas técnicas que permitirán detectar estos compuestos parasitarios.

Se asume que la presencia de antígenos circulantes en la fase crónica es baja, sin embargo, se observa un aumento en los niveles de estos antígenos durante la reactivación de la enfermedad, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos como los diagnosticados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La reactivación de la enfermedad ocurre aproximadamente en el 20% de estos individuos, (VIH/*T. cruzi*) y se caracteriza por altos niveles de parasitemia similares a la fase aguda. El corazón y el sistema nervioso central son los que resultan más afectados (Teixeira de Freitas et al., 2011). Si el diagnóstico en pacientes VIH/*T. cruzi* no es oportuno, la infección puede causar la muerte en el 80% al 100% de estos individuos (Stauffert et al., 2017). Esta situación puede ser controlada con el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno. El diagnóstico de la reactivación de la enfermedad de Chagas se basa en los métodos parasitológicos como la observación directa por microhematocrito y la detección por técnicas moleculares (que son costosas y necesitan de un ambiente apropiado). Por ello es necesario buscar técnicas más sensibles y menos costosas, que indiquen de igual manera la presencia del parásito. Una de estas podría ser la detección de proteínas circulantes de *T. cruzi* en diferentes fluidos corporales.

En el presente estudio se desarrolló una prueba para la detección de antígenos circulantes de *T. cruzi* en muestras clínicas de individuos HIV positivos con sospecha de enfermedad de Chagas provenientes de una población endémica en Bolivia. La prueba está basada en la técnica de ELISA tipo sándwich, empleando anticuerpos policlonales desarrollados en gallinas y alpacas en forma específica para un panel de

proteínas de *T. cruzi*, para la captura de antígenos del parásito tanto en suero, plasma y orina.

## 1.1 Generalidades

Según la última actualización de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), las denominadas “enfermedades tropicales” comprenden un grupo de 17 enfermedades que afectan a más de mil millones de personas en el mundo. Dentro de este grupo se encuentran las llamadas tripanosomiasis, causadas por el protozoos flagelados que pertenecen a la familia Tripanosomatidae, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos e insectos vectores (Cabezas-Sánchez, 2014).

La Tripanosomiasis Americana fue descrita por primera vez en el año 1909 por Carlos Chagas en Brasil, por lo que también se le denomina “Enfermedad de Chagas”. Esta enfermedad es causada por el protozoo *T. cruzi* (Toso, Vial, & Galanti, 2011). Es considerada uno de los problemas de salud pública más graves de América Latina, que afecta una gran variedad de mamíferos y humanos a través de vectores biológicos, que pueden ser encontrados en viviendas insalubres, urbanas, suburbanas o rurales (Caryn Bern, 2015). Debido a las migraciones, la problemática se ha extendido por todo el mundo (Schmunis & Yadon, 2010).

Según informes de la OMS, en la década de los 80 la mortalidad causada por la enfermedad de Chagas, fue aproximadamente de 45 000 personas, mientras que en la década de los 90 fue de 23 000 personas (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009). Así mismo según estadísticas actuales, se estima que dicha enfermedad afecta aproximadamente a 8 millones de personas en América Latina, de las cuales 30 a 40% desarrollan cardiomiopatías, mega síndromes digestivos, o ambos. Sin embargo, en las últimas tres décadas el control y manejo de la enfermedad ha experimentado mejorías, como los programas de control del vector en los hogares de la población y la disminución en la incidencia y prevalencia de la enfermedad en los donantes de sangre (Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010).

En Bolivia, más del 50% del territorio nacional es endémico, cerca del 20% de la población estaría infectada y la población de riesgo sería de 3.5 millones de personas siendo considerada la mayor tasa de infección de América Latina (Cassab, Noireau, & Guillén, 1999)



El virus de inmunodeficiencia humana daña las células TCD4+ del sistema inmunitario, esto ocasiona que las defensas inmunológicas disminuyan frente a infecciones parasitarias (Tassiopoulos et al., 2013). Al ocurrir una coinfección VIH/*T. cruzi*, cada una de estas enfermedades puede tener repercusiones clínicas importantes, como el aumento de parasitemia en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, ocasionando una grave encefalitis o miocarditis que pueden ocasionar la muerte del paciente, si no son tratadas a tiempo (Sartori et al., 2007). A diferencia de Chagas, la infección por VIH es una epidemia de concentración urbana, sin embargo, debido a las migraciones internas, la mitad de los pacientes chagásicos de América Latina residen en los principales centros urbanos (Rice et al., 2011). La superposición en la distribución de ambas enfermedades hace que se den las condiciones necesarias para la coinfección VIH/*T. cruzi* (Dolcini et al., 2008). En los países en donde la enfermedad de Chagas es endémica, la tasa de coinfección VIH/*T. cruzi* es aproximadamente del 1.3% a 7.1%. Además, un 20% de los pacientes chagásicos vuelve a contraer la enfermedad debido a la exposición con VIH (Stauffert et al., 2017).

## **1.2 Taxonomía de *Trypanosoma cruzi***

El término Trypanosoma deriva del griego trypain (perforar) o trepanos (taladro) y soma (cuerpo). Este género fue creado por Gruby en 1843 para designar a los “flagelados hemáticos de cuerpo aguzado y con movimientos ondulantes y espiralados”. *T. cruzi* es un protozooario hemoflagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae, incluida en el grupo de los Kinetoplastidos (Duffy, 2010).

Reino: Protozoa

Phylum: Euglenozoa

Clase: Zoomastigophora

Orden: Trypanosomatida

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Especie: *Trypanosoma cruzi*

Dentro de la familia Trypanosomatidae se encuentran diferentes géneros con especies causantes de enfermedades en humanos (*Leishmania* y *Trypanosoma*), cuyos miembros más importantes son *T. cruzi* y *T. brucei* (de Souza, 1999).

Los parásitos que pertenecen a esta familia presentan características que los diferencian del resto; como su núcleo en el centro del parásito; el sistema kinetoplasto-mitocondrión, con una mitocondria extendida por todo el cuerpo con el ADN kinetoplastídico (kADN), que representa 20% del ADN total, y está compuesto por minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (1.6 kpb) de ADN encadenados formando una compleja red compacta (Shapiro & Englund, 1995). Otra organela importante es el flagelo, el cual es utilizado como aparato locomotor. El bolsillo flagelar es el único sitio conocido hasta el momento por donde se llevan a cabo los procesos de endocitosis y exocitosis en los parásitos (Landfear & Ignatushchenko, 2001)

### **1.3 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes, en donde se encuentra completamente adaptado. En cada uno de estos organismos, el parásito presenta diferentes estadios, en el vector se encuentra como epimastigote y tripomastigote metacíclico, mientras que en el hospedero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos, El carácter especializado del parásito ocasiona que este tenga un alto potencial de transmisión. (Guzmán-Marín, et. al, 1999).

El ciclo biológico (figura 1) inicia cuando el insecto vector se alimenta de la sangre del hospedero infectado. Al ser ingeridos los tripomastigotes sanguíneos se transforman irreversiblemente a epimastigotes, que se dividen mediante fisión binaria longitudinal, y luego de unos pocos días viajan hasta la porción distal del intestino. En este se transforman a tripomastigotes metacíclicos, que son liberados del vector en las heces (Kowalska, Kowalski, & Torres, 2011).

La infección en el humano ocurre cuando el vector se alimenta de un hospedero sano. Al momento de picarlo con la probóscide, el insecto ingiere la sangre del hospedero y defeca en el mismo punto, los tripomastigotes metacíclicos son introducidos en el torrente sanguíneo a través de la picadura, lesiones causada por

el prurito de la picadura o a través de las mucosas (Brisse, Dujardin, & Tibayrenc, 2000). Dentro del hospedero los tripomastigotes metacíclicos penetran las células y se diferencian en amastigotes, los cuales pueden dividirse cada 12 horas por división binaria, provocando la destrucción y muerte de la célula infectada. Una vez liberados se transforman en tripomastigotes, algunos ingresan al torrente sanguíneo o infectan nuevas células (Brisse et al., 2000). Los tripomastigotes sanguíneos llegan a cualquier parte del organismo mediante la vía sanguínea. El ciclo vuelve a repetirse cuando el vector se alimenta de la sangre del hospedero infectado.

#### **1.4 Morfología de *Trypanosoma cruzi***

El parásito *T. cruzi* es un organismo digenético con un ciclo biológico complejo con alternancia entre un hospedero vertebrado y un insecto vector. La familia Trypanosomatidae presenta durante su ciclo biológico diferentes morfologías que pudieron ser identificadas mediante técnicas microscópicas. Posee estadios estructural y funcionalmente diferentes, con antígenos específicos.

##### 1.4.1 Tripomastigote

Se encuentra dentro del vector y el hospedero, con un tamaño de 16 – 20  $\mu\text{m}$ , posee un kinetoplasto grande muy característico, que contiene el 30% del ADN; un núcleo oval y una membrana ondulante poco plegada que termina con su flagelo (de Souza, 2002)

##### 1.4.2 Amastigote

Se localizan en vacuolas acídicas del hospedero, de un tamaño de 2-4 $\mu\text{m}$ , normalmente presentan una forma ovalada y con un flagelo muy corto o inexistente. (de Souza et al., 1996).

##### 1.4.3 Epimastigote

Su tamaño es de 35-40  $\mu\text{m}$ , presentan un kinetoplasto que se encuentra entre el núcleo y el flagelo. El kinetoplasto permite que el parásito se mueva con facilidad dentro del insecto vector (de Souza, 2002)

## 1.5 Vector de la enfermedad de Chagas

El principal vector es un triatomino hematófago (Hemiptera: Reduviidae) y la mayoría son selváticos. Existen más de 130 especies de triatominos. Sin embargo solamente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* tienen importancia epidemiológica en la transmisión de *T. cruzi* a humanos (García-jordán, Berrizbeitia, & Concepción, 2015). El insecto vector se infecta al alimentarse con sangre de un individuo con la enfermedad de Chagas y permanece infectado durante el resto de su vida. La sangre del hospedero es indispensable para los insectos hematófagos, gracias a esta ellos producen la ecdisoma u hormona de la metamorfosis que les permitirá pasar de un estadio evolutivo a otro (Teixeira, Nascimento, & Sturm, 2006). Antes de poder albergar y transmitir *T. cruzi*, los triatominos deben pasar por cinco estadios ninfales. La probabilidad de que un triatomino se infecte con *T. cruzi* aumenta de acuerdo a la cantidad de tomas de sangre ingeridas, de modo que los adultos tienden a tener las mayores tasas de infección (Rassi et al., 2010).

En Bolivia existen 15 especies de triatominos distribuidas en 6 géneros. *T. infestans* es el responsable de los altos índices de contaminación vectorial. Otras especies como *T. sordida*, *R. stali*, *P. rufotuberculatus* y *Eratyrus mucronatus* pueden encontrarse en los domicilios de las áreas rurales en Bolivia. Sin embargo, estas especies no juegan un rol epidemiológico importante (Cassab et al., 1999)

Al igual que en Bolivia, en Perú el agente etiológico principal de la enfermedad de Chagas es *Triatoma infestans* y durante el 2001 el Instituto Nacional de Salud (INS) y la Oficina General de Epidemiología (OGE) del Perú, dieron a conocer su distribución por la zona suroccidental del país.

## 1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

La infección producida por formas tradicionales (vectorial) se distingue en dos fases. En la aguda se han identificado síntomas como los cuadros de fiebre (30 a 60 días), cefaleas, signo de Romana, mialgias, artralgias, disneas, edemas, agotamiento extremo, insuficiencia cardiaca, dolor torácico, taquicardias y derrame pericárdico (Crisante & Parada, 2007). La fase crónica es asintomática y puede presentarse años más tarde de la infección inicial, esta situación puede

desarrollar problemas en los pacientes, un 27% presentan daños al corazón, 6% podrían tener problemas digestivos (megacolon y megaesófago) y un 3% presentarían problemas al sistema nervioso periférico (Mallimaci et al., 2010).

## **1.7 Técnicas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas**

En la actualidad no se cuenta con una prueba cien por ciento específica y sensible. En el Perú normalmente se emplea, como primera alternativa, la prueba de ELISA e IFI, la primera altamente sensible y la segunda de elevada especificidad. En conjunto ambas pruebas alcanzan el 95 a 98% de sensibilidad y especificidad. (Chirinos, 2005). Sin embargo, cuando los resultados de las pruebas son discordantes se debe realizar una tercera prueba confirmatoria. Para realizar el diagnóstico en el laboratorio se puede hacer uso de tres diferentes métodos.

### **1.7.1 Métodos directos:**

El 2005, el Instituto Nacional de Salud (INS) determinó que se debe hacer uso de estos métodos cuando existe una sospecha de que el paciente presente la enfermedad en fase aguda, ya que son procedimientos rápidos que duran menos de una hora. El mayor número de tripomastigotes presentes en el torrente sanguíneo se encuentra en las primeras semanas después de haber ocurrido la infección. Los exámenes que se usan en estas condiciones son:

- Gota gruesa-frotis; consiste en tomar una muestra fresca de sangre y colocarla en un portaobjetos para que posteriormente pueda ser desfibrada, coloreada y observada al microscopio. Se observará la presencia de tripomastigotes del parásito en los pacientes positivos.
- Concentración de Strout (microconcentración); técnica con alta sensibilidad que consiste en obtener una muestra de sangre (sin coágulos), que se centrifuga hasta obtener únicamente el sedimento (leucocitos, hematíes, resto del suero), que se observará al microscopio a 40X. En pacientes positivos presentará los tripomastigotes con su movimiento ondulatorio clásico. Esta técnica

también puede ser usada en niños con la diferencia de que el volumen de sangre es menor (Moretti, 2012).

- Xenodiagnóstico; una técnica sensible que consiste en hacer picar al posible sujeto infectado con el vector libre de la infección, en cuyas heces se detectará la presencia del parásito. Esta técnica puede realizarse tanto en la fase aguda como en la crónica y permitir ver el desarrollo de la enfermedad *in vivo*.

#### 1.7.2 Métodos serológicos:

En el 2005 el Instituto Nacional de Salud recomendó hacer uso de estas técnicas durante la etapa crónica, cuando la parasitemia es baja en el torrente sanguíneo y las técnicas directas no pueden actuar (Chirinos, 2005). Estas técnicas normalmente no pueden detectar la presencia del parásito, pero si la presencia de anticuerpos desarrollados específicamente contra *T. cruzi* (dos o tres semanas después de la infección). Las técnicas más comunes son:

- Hemaglutinación indirecta (HAI): es una técnica *in vitro*, en donde se ve la capacidad que tienen los anticuerpos (anti-*T. cruzi*) de producir aglutinación específica de hematíes o eritrocitos (origen humano o animal) sensibilizados con los antígenos correspondientes.
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): examen confirmatorio para la enfermedad de Chagas, donde se evalúa la presencia de anticuerpos en las muestras de los pacientes. El anticuerpo que se une a la superficie del parásito (epimastigotes) es revelado empleando un anticuerpo anti-humano marcado con fluorescencia y es observado a través de un microscopio de inmunofluorescencia (40X)
- ELISA: en esta técnica, los antígenos de *T. cruzi* se adhieren a una placa de plástico de 96 pocillos, para ser enfrentados con el suero del paciente y luego a un anticuerpo anti-humano conjugado a una enzima. Las muestras positivas presentarán una coloración mediante una reacción enzimática.

Estas pruebas son de gran importancia para determinar si el paciente presenta o no la enfermedad de Chagas, para lo cual es necesario que al menos dos de estas pruebas resulten ser positivas.

### 1.7.3 Métodos moleculares:

Entre los métodos moleculares se resalta la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Este método ayuda a confirmar la presencia del parásito en la sangre o en tejidos infectados (Piron et al., 2007). A partir de la muestra del paciente se extrae el ADN total y se realiza un PCR con iniciadores específicos para amplificar cierta región del ADN de *T. cruzi*. Al comparar las diferentes técnicas de PCR diagnóstico se ha confirmado que la amplificación de ADN del kinetoplasto es la que presenta mayor sensibilidad en comparación con la del ADN nuclear, pues detecta un parásito en 100ml de muestra (0,005 parásito/ml) (Escamilla-Guerrero et al., 2012). La técnica molecular de PCR en tiempo real (qPCR) también es utilizada y se caracteriza por el monitoreo continuo del producto amplificado durante una PCR, su detección y cuantificación se debe a la fluorescencia de la molécula reportera (sonda), medida a lo largo de un ciclo. Debido a su especificidad, esta prueba puede ayudar a identificar el tipo de cepa del parásito que infecta al humano, así mismo facilita a los médicos a definir el tratamiento que deben seguir sus pacientes (Martínez, Cervantes-Landín, & Espinoza, 2013).

## **1.8 Antígenos de *Trypanosoma cruzi*: TESA, 1F8 y proteína de membrana (PM)**

El antígeno TESA (Antígeno de Excreción – Secreción de *Trypanosoma cruzi*) es secretado y excretado por la forma tripomastigote de *T. cruzi*. Estos antígenos son importantes para el diagnóstico, ya que los tripomastigotes son la forma que se encuentra en el torrente sanguíneo de los individuos infectados, por tanto, su antígeno genera una respuesta inmune directa evitando reacciones cruzadas. En su mayoría, los componentes de TESA son enzimas llamadas transialidasas (TS), las cuales catalizan la transferencia del ácido siálico desde las células del hospedero hasta las moléculas de mucina ubicadas en la membrana del parásito,

por lo tanto se considera que las TS y el ácido siálico participan en la interacción parásito–huésped (Berrizbeitia et al., 2012)

Se ha descrito la estructura de las TS. La región N-terminal constituye el dominio catalítico y la C-terminal es altamente inmunogénica. Ambas regiones estimulan la respuesta de los linfocitos B en pacientes con la enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica (Jazin et. al, 1991).

El antígeno 1F8 es una proteína flagelar de 234aa (51 kDa) con unión a calcio que exhibe 4 dominios estructurales tipo mano EF (hélice-bucle-hélice). De ellos 3 pueden contener sitios de unión a calcio (Gonzalez et al., 1985).

El antígeno 1F8 ha sido utilizado en la técnica de ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Un estudio evaluó 541 muestras de suero de áreas endémicas a Chagas mediante la prueba de ELISA usando el antígeno 1F8 y además cuatro antígenos repetitivos (H49, JL7, B13 y JL8) compuestos por un tándem de aminoácidos repetidos. Curiosamente se observó una sensibilidad (99%) y especificidad (99.6%) del antígeno 1F8, similar a la de los antígenos repetitivos, concluyendo que los pacientes chagásicos generan anticuerpos contra los antígenos repetitivos y no repetitivos (Umezawa & Franco Da Silveira, 1999).

Proteínas de membrana (PM) de diferentes tipos y familias se encuentran en la superficie del parásito. En *T. cruzi* estas proteínas son del estadio de tripomastigotes y epimastigotes. Sin embargo, la superficie del estadio tripomastigote suele ser más compleja, ya que en esta etapa es donde se empieza a evadir el sistema de complemento para poder realizar una infección y evasión exitosa. La mayoría de las proteínas de superficie participan en este proceso (Alberti et al., ). La mayoría de las PM pertenecen a la familia de las glicoproteínas. Un ejemplo es la T-DAF, una glicoproteína de membrana que se encarga de inhibir el ensamblaje y acelerar el rápido decaimiento de los complementos 3 y 5. Otra proteína importante es la trombospondina 1 (TSP–1) una proteína grande capaz de unirse a diferentes receptores de la superficie extracelular (Johnson et al., 2012). También existen otras proteínas como Calreticulina, Glicoproteína 58/68 o el Factor H, que pueden cumplir otras



funciones como el disminuir la fagocitosis o servir de marcadores serológicos (Alberti et al., n.d.)

Las proteínas antigénicas de parásitos son y han sido usadas para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, destinadas para el diagnóstico o terapias de pacientes.

### **1.9. Coinfección *Trypanosoma cruzi*/VIH**

El aumento de las migraciones de áreas rurales a áreas urbanas ha logrado la expansión de la enfermedad de Chagas en las grandes ciudades. A esta realidad se suma la epidemia de SIDA, por lo que hoy en día es más probable que la coinfección *T. cruzi*/VIH se incremente. Además ambas enfermedades comparten vías de transmisión, como la vía sexual y la congénita (Caryn Bern, 2015). Así mismo *T. cruzi*, como otros organismos infecciosos, es un protozoo oportunista en pacientes que han sufrido trasplante de órganos, que presenten cáncer y/o en adultos con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La reactivación de la enfermedad de Chagas en pacientes infectados con VIH puede causar problemas en el sistema nervioso central en forma de meningoencefalitis o signos neurológicos focales (encefalitis necrosante multifocal con formación de abscesos por *T. cruzi*) y miocarditis (de Oliveira et al., 2002).

Aún no se conoce con exactitud la frecuencia de la reactivación de Chagas en pacientes que presentan la enfermedad VIH/SIDA, sin embargo en el 2007 un estudio reveló que existe una probabilidad del 20% de reactivación de la enfermedad de Chagas en individuos VIH positivos (Sartori et al., 2007). Esto ocurre normalmente en pacientes que presentan cifras de linfocitos CD4 inferiores a 200 células/ $\mu$ l, que afectan especialmente al sistema nervioso central y al miocardio (Cecchini et al., 2009).

Por otro lado se ha demostrado que la coinfección *T. cruzi*/VIH aumenta simultáneamente la carga viral de VIH junto a la parasitemia, además el tratamiento antiparasitario exitoso ocasiona que la carga viral del VIH disminuya a los niveles de antes de reactivar la tripanosomiasis, sugiriendo que *T. cruzi* podría regular la replicación del VIH (Sartori et al., 2002).

## 1.10 Anticuerpos policlonales

El uso de anticuerpos para la investigación y diagnóstico de enfermedades se realiza desde hace varias décadas. Normalmente estos anticuerpos se obtienen a partir del suero de mamíferos como roedores, caprinos, equinos, etc. Sin embargo, los anticuerpos policlonales, especialmente los de alpaca y gallinas, han proporcionado buenos resultados en el diagnóstico de enfermedades (Larsson, Karlsson-Parra, & Sjoquist, 1991); por tanto, hoy en día se hace más exigente no solo su calidad, sino también la metodología empleada para su producción. Algunas de las razones por las cuales la producción de anticuerpos policlonales es tan exitosa, es por su amplia gama, que les permite unirse a los diferentes antígenos (Haurum, 2006).

Las aves han sido un modelo útil en investigación básica en inmunología. El modelo aviar presenta muchas similitudes funcionales al sistema inmune de los mamíferos y normalmente tiene grandes concentraciones de anticuerpos en el suero y aún más en la yema de huevo (Funk & Thompson, 1996; Vainio & Imhof, 1995). Los anticuerpos extraídos de la yema de huevo (IgY) producidos por gallinas inmunizadas son una alternativa muy interesante (Chanana, Kaur, & Salunke, 2004). Existen tres clases de inmunoglobulinas similares a la de los mamíferos encontradas dentro del huevo: IgM, IgA e IgY (Kovacs-Nolan & Mine, 2012).

Las inmunoglobulinas A y M aviares son muy similares a las de los mamíferos. La IgM posee un alto peso molecular, mientras que la IgA se encuentra en secreciones externas y en el plasma sanguíneo (Lebacqz-Verheyden, Vaerman, & Heremans, 1974). La concentración de estas inmunoglobulinas en los huevos de gallina es muy variada, las IgA e IgM se encuentran en cantidades insignificantes de 0.15mg/ml y 0.7mg/ml, respectivamente, en la clara del huevo, mientras que la IgY es transferida a la yema de huevo a través del epitelio folicular del ovario durante la ovogénesis, en donde presenta una concentración de 5.0mg/ml (Rose & Orleans, 1981). La IgY posee dos cadenas pesadas llamadas “cadenas H” y dos cadenas ligeras llamadas “cadenas L”, ambos pares idénticos entre sí (Chalghoumi et al., 2008). En el dominio constante de las cadenas pesadas se puede observar la diferencia del peso molecular entre las IgG e IgY, ya que esta

última presenta 4 dominios Cv1, Cv2, Cv3 y Cv4, en vez de 3 (Wilber & Gutierrez, 2009).

La alpaca es una especie doméstica de mamífero artiodáctilo de la familia *camelidae*, que también incluye las llamas y los camellos. Su sistema inmunológico presenta características únicas que las diferencian de otras especies, como las subclases de sus inmunoglobulinas IgG, denominadas IgG1, IgG2 e IgG3. La IgG1 corresponde a los anticuerpos convencionales con dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, constituyen 25% de las IgG séricas y tienen un peso molecular de 175 KDa (Wernery, 2001); en cambio, la IgG2 e IgG3 carecen de cadenas livianas y funcionales, y además poseen dímeros de cadenas pesada cortas, las cuales se caracterizan por poseer un fragmento cristalizante (Fc) normal sin un dominio CH1, estas formas pesan 100 KDa y constituyen el 75% de la IgG séricas. Así mismo, éstas dos últimas son conocidas como los anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) que desempeñan un papel importante en la defensa inmune (Figura 2) (Daley et al., 2005)

Los HCAbs, junto con sus dominios únicos simples (VHHs) o nanoanticuerpos, tienen muchas ventajas, debido a su pequeño tamaño, que hace mucho más sencillo su manejo mejorando su distribución y permitiendo una mejor penetración tisular (Wernery, 2001). Así mismo estos anticuerpos tienen muchas ventajas sobre los tradicionales, incluyendo su alta afinidad y especificidad para reconocer sitios antigénicos que son normalmente inaccesibles a los anticuerpos convencionales (Muyldermans et al., 2009). La producción de estos anticuerpos puede ser utilizado como una alternativa económica de alto rendimiento en distintos campos médicos controlando varias enfermedades de animales y humanos.

### **1.11 Estudio previo**

Los anticuerpos policlonales utilizados durante el trabajo fueron obtenidos, sin purificar, de la tesis de maestría “Estandarización de la prueba de ELISA de captura para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente” (Lovon-Luque, 2016 Perú)

Esa tesis evaluó los anticuerpos policlonales extraídos de animales (gallinas, alpacas y conejos) inmunizados con diferentes antígenos de *T. cruzi*, con la finalidad de elegir los óptimos y emplearlos en la técnica de ELISA sándwich para la detección de antígeno circulante de *T. cruzi* en muestras de orinas y sueros de *Cavia porcellus* infectadas experimentalmente (figura 3). Luego de la evaluación, se optó por utilizar en el presente trabajo las IgY-anti-PM de gallina e IgG anti-TESA de alpaca como anticuerpos de captura y detección, respectivamente, para la prueba de ELISA de captura de antígeno circulantes de *T. cruzi*.

## **HIPÓTESIS**

La prueba de ELISA de captura, empleando anticuerpos policlonales, permite detectar antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina, suero y/o plasma de pacientes VIH positivos que viven en una zona endémica en Bolivia

## **OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Detectar antígenos circulantes de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes con VIH de una población endémica en Bolivia empleando anticuerpos policlonales mediante la prueba de ELISA de captura.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Purificar y evaluar mediante IFI los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de alpacas y gallinas inmunizadas con antígeno TESA y PM de *T. cruzi*, respectivamente.
- Evaluar los diferentes anticuerpos policlonales mediante la técnica de ELISA de captura de antígeno (ELISA-Ag)
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA-Ag frente a las pruebas serológicas y qPCR.
- Evaluar la presencia de reacción cruzada de la prueba de ELISA-Ag frente a otras enfermedades: leishmaniasis, malaria y toxoplasma.

## METODOLOGÍA

### **4.1 Purificación anticuerpos IgY**

El trabajo inició al descongelar las muestras pretratadas con cloroformo (Ntakarutimana, 1992) que fueron obtenidas de la yema de los huevos de la gallina inmunizada con el antígeno PM de *T. cruzi* durante el estudio previo (Lovon-Luque, 2016).

Las muestras fueron dializadas en PBS a 4°C durante 24 horas. Luego de la diálisis los anticuerpos fueron concentrados, siguiendo la guía que brinda Stirred Ultrafiltration Cells Millipore, hasta un volumen final de aproximadamente 5 ml. A la muestra concentrada se le agregó una solución deslipidante (IgY Delipidation Reagent, Thermo Scientific Prod #21055) en una relación de 1:5 y, se incubó 24h a 4°C. Al sobrenadante obtenido luego de centrifugar a 10 000 g por 15 min, se le agregó la solución precipitante (IgY Precipitation Reagent, Thermo Scientific, Prod# 21057) en una relación 1:1, se dejó incubando por 2h a 4°C. La muestra se centrifugó a 10 000g x 15min y el pellet obtenido se resuspendió al volumen inicial con PBS. Finalmente, los anticuerpos fueron purificados empleando una la columna HiTrap™ IgY (General Electric, Uppsala, Suecia) y tres buffers diferentes: buffer de limpieza (PBS, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, Isopropanol 30%. pH=7.5), buffer de unión (PBS, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5M. pH=7,5) y buffer de elución (solución fosfato 20mM, pH=7.5) (Romero-Ramirez, 2014).

### **4.2 Purificación anticuerpo IgG**

Durante el estudio previo se obtuvieron los sueros de alpacas inmunizadas con el antígeno TESA de *T. cruzi*. Para la purificación de los sueros de alpaca se utilizó la columna de afinidad HiTrap™ Protein G HP de 1 ml de volumen. La muestra fue diluida con 50 ml de buffer de unión (fosfato de sodio 20 mM, pH 7) y filtrada usando una membrana de 0.45 µm (Lovon-Luque, 2016).

### **4.3 Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de la concentración de las inmunoglobulinas purificadas (IgG o IgY) se realizó utilizando el método colorimétrico de Bradford empleando una curva estándar con albúmina sérica bovina (Sigma®, A-7030, USA) y reactivo de Bradford (Protein Assay – Dye Reagent Concentrate BIORAD – cat 500-0006, USA).

### **4.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Mediante IFI, se evaluaron los anticuerpos policlonales obtenidos de la gallina y alpaca, inmunizadas con los antígenos PM y TESA de *T. cruzi* respectivamente, con el fin de corroborar la presencia de los anticuerpos policlonales antes de iniciar el ELISA-Ag.

Se utilizaron láminas de 12 pozos pretratadas con lisina, en las cuales se fijaron aproximadamente 40 parásitos de *T. cruzi* por pozo, en estadio epimastigote (15  $\mu$ l aproximadamente) (Romero-Ramirez, 2014). Los anticuerpos policlonales de alpaca y gallina fueron diluidos 1:20 y 1:10 en PBS respectivamente, empleándose 25  $\mu$ l de la dilución en cada pozo e incubó a 37°C por 30min. Se lavó las láminas 3 veces con PBS de IFI. Luego se dejaron secar las láminas y se colocó 25 $\mu$ l del conjugado marcado con fluorescencia junto con el colorante “Evans Blue” a una concentración del 0.002% se incubó a 37°C por 30min. Las láminas fueron leídas en el microscopio confocal a 1000X (ZEISS LSM 880, Alemania).

### **4.5 Modificaciones del protocolo original ELISA-Ag**

El protocolo original de la técnica ELISA–Ag fue obtenido del estudio previo (Lovon-Luque, 2016) y se le realizaron modificaciones con la finalidad de mejorar sus resultados. Para este proceso se emplearon muestras provenientes de individuos sanos como controles negativos (pool negativo) y estas mismas contaminadas con lisado total de tripomastigotes (2  $\mu$ g/ml) y diluidas 1:1 con PBS como controles positivos (pool positivo).

## **4.6. ELISA de captura de antígeno (ELISA-Ag) en suero, plasma y orina**

### 4.6.1 Muestras evaluadas

Una vez modificada la prueba ELISA-Ag, se inició con la evaluación de las muestras de individuos VIH positivo-provenientes de zonas endémicas a Chagas. Todas las muestras utilizadas en el presente estudio fueron evaluadas en ciego, ya que aún no se tenía conocimiento sobre si eran positivas o negativas a la enfermedad de Chagas. Estas muestras provinieron de dos proyectos aún no concluidos y en ambos casos eran las únicas que estos conservaban, además fueron colectadas con el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de las instituciones respectivas; 26 muestras de plasmas y 12 muestras de orinas del mismo grupo de pacientes del Hospital Cochabamba en Bolivia fueron brindadas por el proyecto “Evaluación de síndromes Neurológicos en individuos infectados por el VIH en Bolivia y Perú” (Gilman & Bowman, 2017) y 33 muestras de suero de pacientes proveniente del Hospital San Juan de Dios de la ciudad de Santa Cruz en Bolivia obtenidas del proyecto “Determinación y análisis de las manifestaciones clínicas, alteraciones inmunológicas debidas a la infección por T. cruzi en personas que viven con el VIH / SIDA” (Gilman & Torrico, 2016), donde se colectaron muestras de individuos VIH positivos provenientes de una zona endémica a Chagas, se conservaron las muestras de los pacientes negativos y se continuo el estudio con las muestras de los pacientes positivos. Teniendo en cuenta esto, las principales características de los pacientes es que presentan VIH y provienen de una zona endémica a Chagas, sin embargo, no se sabía si presentaban o no dicha enfermedad.

Antes de iniciar con el análisis de los resultados se tomó en cuenta que las muestras ya habían sido evaluadas mediante las pruebas serológicas (IFI, HAI Y TESA-blot) y la prueba molecular qPCR que se les realizó a los pacientes durante los proyectos mencionados.



#### 4.6.2 Tratamiento de las muestras:

La prueba de ELISA-Ag se realizó empleando tres tipos diferentes de muestras: suero, plasma y orina. Estas muestras fueron previamente tratadas de la siguiente manera.

- Orinas: Se liofilizaron 5ml de orina por individuo; el polvo obtenido fue reconstituido en 500  $\mu$ l de PBS. Durante la prueba de ELISA-Ag se utilizaron 50  $\mu$ l de la muestra más 50  $\mu$ l de PBS Tween 0,3%, leche 1% y BSA 0.2%.
- Plasma: Se realizó una dilución 1:1 del plasma con PBS Tween 0,3%, leche 1% y BSA 0.2%. La mezcla se incubó en baño maría a 56°C durante 30 minutos y se emplearon 100  $\mu$ l por pozo en la placa para ELISA.
- Suero: Las muestras de suero fueron igualmente diluidas 1:1 con PBS Tween 0,3%, leche 1% y BSA 0.2%. La mezcla se incubó en baño maría a 56°C durante 30 minutos, empleándose 100  $\mu$ l de la dilución por pozo para la prueba de ELISA.

#### 4.6.3 Procedimiento de la prueba ELISA-Ag:

Los anticuerpos de captura (IgY-anti-PM) fueron fijados en una placa de 96 pocillos (Maxisorp) 100  $\mu$ l/pozo a una concentración de 4  $\mu$ g/ml. La placa se incubó durante  $16 \pm 2$  horas a temperatura ambiente con movimiento constante evitando que tenga contacto con la luz. Después los pozos fueron lavados tres veces con 200  $\mu$ l/por pozo de PBS Tween 0,3% (PBST o buffer de lavado) dejando 1 minuto entre cada lavado. Los sitios de unión a proteínas inespecíficas remanentes fueron bloqueados con 200  $\mu$ l/por pozo de buffer de bloqueo (PBST, leche 6%, BSA 1%) durante 2 horas a 37°C. Después de lavar por cinco veces, se agregó 100  $\mu$ l/por pozo de las muestras de orina, suero o plasma pretratadas, por duplicado, y se incubó a 37°C durante 1 hora. La placa fue lavada cinco veces y luego se colocó 100  $\mu$ l/por pozo del anticuerpo policlonal de detección (IgG-anti TESA) a una concentración de 4  $\mu$ g/ml diluido en una solución de PBST, leche 1%, BSA 1%. La placa se incubó por 1h a 37°C. Luego de cinco

lavados se agregó 100  $\mu$ l/por pozo del conjugado de cabra anti llama-enzima peroxidasa marcado con HRP (Bethyl, laboratorios. Inc) a una dilución de 1/7500 empleando PBST leche 1%, BSA 1% como diluyente. Luego de un periodo de incubación de 30 minutos a 37°C, la placa fue lavada cinco veces y revelada empleando 100  $\mu$ l/por pozo del sustrato orto- fenilendiamina (OPD, Sigma Aldrich Chemical, USA). Esta reacción fue detenida con 50  $\mu$ l de una solución 2M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lectura de la placa se realizó empleando el equipo lector de microplacas VersaMax™ ELISA (Molecular Devices) con filtro de longitud de onda de 492 nm (Lovon-Luque, 2016) (figura 4)

#### 4.6.4 Evaluación de reacción cruzada para la prueba ELISA-Ag:

Para demostrar que el test de ELISA-Ag no presenta reacción cruzada frente a otras enfermedades, se realizó la misma prueba en 2 diferentes muestras de plasma y 2 diferentes muestras de suero de individuos naturalmente infectados con Leishmaniasis (n=4), Toxoplasmosis (n=4) y Malaria (n=4) obtenidos del banco de muestras del laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### 4.7 Análisis de resultados

Los valores de corte (Cut – off) se determinaron usando el promedio de la densidad óptica (OD) de las muestras negativas a todas las pruebas (Tesa - blot, qPCR, ELISA-Ag) más dos desviaciones estándar. Los valores mayores al número de corte fueron considerados como un resultado positivo, y los resultados menores indicaron que es negativo.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) del ELISA-Ag frente a las pruebas de referencia (pruebas serológicas y qPCR) se determinaron mediante la tabla de cuatro casillas (Gonzalez et al., 1985) (Tabla 2).

Además, se usó el programa STATA para determinar el coeficiente kappa ( $\kappa$ ), que indica concordancia entre la prueba de referencia y la prueba a evaluar. El valor de kappa puede variar entre 0 y 1, cuanto más cercano sea su valor a 1, la fuerza de concordancia es considerada “casi perfecta” y viceversa (Landis & Koch, 1977). De igual manera se determinó la curva ROC (Característica Operativa del Receptor) que fue utilizada principalmente para evaluar la bondad de la prueba diagnóstica mediante el valor del Área Bajo la Curva (AUC). Además, se obtuvo el Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ) con la finalidad de medir la proporción de variabilidad total de la variable dependiente, que en este caso fueron los valores de OD del ELISA-Ag, en muestras de suero, plasma y orina frente a los Valores de Ct, obtenidos mediante la prueba molecular de qPCR. Es usual expresar esta medida en porcentaje

A continuación, el flujograma de la figura 5 explica el procedimiento completo del presente estudio.

## **RESULTADOS**

### **5.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Mediante la microscopía confocal se pueden observar los epimastigotes fijados en las láminas de IFI y de esta manera confirmar que la fluorescencia observada va a ser debido a estos (figura 6B).

Las muestras de IgY anti-PM mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en el área de la membrana del parásito, mientras que en las muestras de IgG anti-TESA se observó una fluorescencia en toda la estructura del parásito sin definir un sitio en específico, en algunos casos se puede observar una mayor intensidad en el kinetoplasto y el núcleo del parásito (flecha roja, figura 6C). Para ambos casos se utilizó un microscopio confocal (ZEISS LSM 880, Alemania) a 1000X.

### **5.2 Modificación de la prueba Elisa-Ag**

El protocolo original (Lovon-Luque, 2016) realizado en orina de *C. porcellus* presentó óptimos resultados ( $1,892 \pm 0,004$  /  $0,314 \pm 0,003$ ) comprobando que la metodología es reproducible.

El protocolo I mostró mejores resultados, los OD de las muestras de plasmas positivos fueron los más altos ( $1,895 \pm 0,002$ ) comparados a los OD obtenidos en suero ( $1,767 \pm 0,002$ ) o en orina ( $1,756 \pm 0,003$ ). Sin embargo, las muestras de orina negativas presentaron el menor OD ( $0,268 \pm 0,004$ ). El punto de corte fue menor en muestras de plasma (tabla 3).

De acuerdo con estos resultados, las muestras de pacientes VIH positivos con sospecha de la enfermedad de Chagas fueron procesadas empleando el protocolo I.

### **5.3 ELISA-Ag en muestras de suero**

El punto de corte para las muestras de suero fue de 0,3242. Las muestras fueron evaluadas, en un estudio previo, mediante pruebas serológicas (IFI, HAI y Tesa-blot), donde se obtuvieron 20 muestras positivas. Sin embargo, la prueba de

ELISA-Ag detectó 13 de las 20 muestras de suero positivas a la enfermedad de Chagas. Los resultados del análisis de la tabla de cuatro casillas, comparando las pruebas serológicas IFI, HAI y Tesa-blot frente al ELISA-Ag presentaron una sensibilidad del 65% (13/20), especificidad del 100% (13/13), VPP del 100% (13/13) y VPN del 65% (13/20) (tabla 4A)

Las muestras de suero también habían sido evaluadas por la prueba molecular qPCR, obteniendo 18 muestras positivas, mientras que la prueba de ELISA-Ag detectó 11 de las 18 muestras de suero positivo a la enfermedad de Chagas. Además, con la prueba qPCR se obtuvieron 15 muestras de suero negativo, de las cuales 2 resultaron positivas por la prueba de ELISA-Ag. Los resultados del análisis de la tabla de cuatro casillas, comparando la prueba molecular qPCR frente al ELISA-Ag presentaron una sensibilidad del 61.1% (11/18), especificidad del 86.6% (13/15), VPP del 84.6% (11/13) y un VPN del 65% (13/20) (tabla 4B).

El coeficiente de kappa entre las pruebas serológicas y el ELISA-Ag fue de 0,8115, mientras que entre el qPCR y el ELISA-Ag fue de 0,4649. Para ambos casos la fuerza de concordancia es “moderada” (Landis & Koch, 1977). Los valores de AUC obtenidos mediante la curva ROC fueron de 0,8115 y 0,7556 al enfrentar las pruebas serológicas y la prueba molecular de qPCR con el ELISA-Ag respectivamente (figura 7).

Se obtuvo el índice de correlación 0,2575 entre los valores Ct de la prueba molecular qPCR y el ELISA-Ag. La gráfica muestra una relación negativa, esto indica que la prueba ELISA-Ag no se ajusta a la prueba molecular qPCR, explicando únicamente un 25,75% (figura 8).

#### **5.4 ELISA-Ag en muestra de plasma**

El punto de corte para las muestras de plasma fue de 0,3342. Al igual que los pacientes que brindaron las muestras de suero, estos también fueron evaluados en un estudio previo mediante las pruebas serológicas (IFI, HAI y Tesa-blot) donde se obtuvieron 23 muestras positivas. De igual manera, la prueba de ELISA-Ag detectó las 23 muestras de plasma positivas para la enfermedad de Chagas.

Los resultados del análisis de la tabla de cuatro casillas, comparando las pruebas serológicas IFI, HAI y Tesa-blot y al ELISA-Ag, presentaron una sensibilidad (23/23), especificidad (3/3), VPP (23/23) y VPN (3/3) del 100 % (tabla 5A).

Los pacientes que brindaron las muestras de plasma también fueron evaluados por la prueba molecular qPCR, obteniendo 19 muestras positivas. De igual manera, la prueba de ELISA-Ag detectó las 19 muestras de plasma positivas para la enfermedad de Chagas. En la prueba molecular qPCR se observaron 7 muestras negativas, de las cuales 4 resultaron ser positivas a la enfermedad de Chagas utilizando la prueba ELISA-Ag.

Del mismo modo se comparó la prueba molecular qPCR y el ELISA-Ag y se observó una sensibilidad del 100% (19/19), especificidad del 42,8% (3/7); VPP del 84,6% (19/23) y un VPN del 100% (3/3) (tabla 5B).

El coeficiente kappa entre las pruebas serológicas y el ELISA-Ag fue de 1,000, mientras que para la prueba molecular qPCR fue de 0,5229. Esto generó una fuerza de concordancia “casi perfecta” y “moderada” respectivamente. Los valores del área bajo la curva fueron de 1,000 y 0,8647 al enfrentar las pruebas serológicas y el qPCR con el ELISA-Ag respectivamente (figura 9).

Por otro lado, el índice de correlación entre los valores Ct del qPCR y los OD del ELISA-Ag fue de 0,5637, observándose una relación negativa. Esto indica que el modelo ELISA-Ag explica un 56,37% de la variable real (figura 10).

## **5.5. ELISA-Ag en muestras de orina**

El punto de corte para las muestras de orina fue de 0,3832. Para el análisis de las orinas se tomó en cuenta los resultados obtenidos por las pruebas serológicas (IFI, HAI, Tesa-blot) y el qPCR que se realizó en estudios previos a los pacientes que brindaron sus muestras.

Mediante la prueba molecular qPCR se observaron 5 muestras positivas, la prueba de ELISA-Ag, también detectó estas 5 muestras de orina como positivas a la enfermedad de Chagas. Además, con el qPCR se obtuvieron 7 muestras negativas,

de las cuales 2 resultaron ser positivas al Elisa-Ag. Se comparó la prueba molecular qPCR y el ELISA-Ag y se observó una sensibilidad (5/5) y VPN (5/5) del 100%, además de una especificidad (5/7) y VPP (5/7) del 71,42% (tabla 6B)

El coeficiente kappa entre las pruebas serológicas (IFI, HAI y TESA-Blot) y el ELISA-Ag fue de 0,6364 con una fuerza de concordancia “casi perfecta”, mientras que al enfrentar la prueba molecular de qPCR, el coeficiente kappa fue de 0,6757 con una fuerza de concordancia considerable. Los valores del área bajo la curva (AUC) fueron de 1,000 y 0,8857 al enfrentar las pruebas serológicas y el qPCR con el ELISA-Ag respectivamente (figura 11).

Así mismo el índice de correlación obtenido entre los Valores Ct del qPCR y el Elisa-Ag fue de 0,5644 observándose una relación negativa. Esto indica que el modelo ELISA-Ag se ajusta de manera adecuada a la variable real y se podría afirmar que explica solo un 56,44% (figura 12).

## **5.6 Evaluación de reacción cruzada para la prueba ELISA-Ag**

Teniendo en cuenta nuestros puntos de corte para las muestras de suero (0,3242) y plasma (0,3342), no se observó reacción cruzada en las muestras de pacientes con leishmaniasis, malaria y toxoplasmosis (tabla 7)

Las muestras de suero, a comparación del plasma, presentaron un mayor valor de OD en el caso de leishmaniasis ( $0,2081 \pm 0,0002$ ) y toxoplasmosis ( $0,2371 \pm 0,0012$ ), mientras que, para malaria, la muestra de plasma presentó un OD ligeramente más elevado ( $0,1160 \pm 0,0024$ )

## **DISCUSIONES**

La enfermedad de Chagas aún continúa siendo una de las principales causas de muerte en países endémicos de América Latina y debido a las migraciones a zonas urbanas, también es un problema de salud en países no endémicos (Schmunis & Yadon, 2010). Las pruebas serológicas son herramientas que permiten estimar los niveles de exposición así como evaluar las medidas de control para *T. cruzi* (Palacios, Belli, & Espino, 2000)

En el presente trabajo se desarrolló una prueba basada en la técnica de ELISA con la finalidad de demostrar la presencia de antígenos circulantes en la tripanosomiasis americana en pacientes VIH positivos. La prueba es altamente sensible y específica (100%) tanto en plasma como en orina, comparada con las pruebas serológicas (TESA blot, HAI e IFI) así como con la prueba de qPCR (88% de sensibilidad). Este estudio demuestra además la posibilidad del empleo de anticuerpos policlonales para la detección específica de antígeno de *T. cruzi* circulante sin la necesidad de contar con anticuerpos monoclonales que hacen que este tipo de pruebas sean mucho más costosas.

La detección de fracciones antigénicas del parásito circulantes en el huésped puede considerarse equivalente a los métodos de observación directa del parásito, ya que muchas de estas fracciones antigénicas son proteínas excretadas o secretadas por el parásito. Además, posibilita el diagnóstico de una enfermedad activa, sobre todo en las etapas de la enfermedad en los que no hay parásitos circulantes (Petray P et al, 1992)

Comparada con las pruebas serológicas, la prueba de ELISA-Ag detecta indirectamente la presencia del parásito en el hospedero, mientras que las técnicas serológicas convencionales, si bien detectan anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (Machado-de-Assis et al., 2012) no son capaces de diferenciar entre un paciente con la enfermedad activa y la presencia de anticuerpos de su memoria inmunológica.

En el presente trabajo se utilizaron anticuerpos de gallina, pues estos animales tienen la capacidad de producir anticuerpos contra antígenos altamente conservados de mamíferos y no presentan reactividad contra el factor reumatoide (FR), presente en el fragmento cristalizante (Fc) de las moléculas IgG, esto hace que sean



particularmente útiles al momento de diseñar las pruebas serológicas (Casillas-iglesias et al., 2015)

Durante un estudio previo se propuso inmunizar a las alpacas con un panel de antígenos, con la finalidad de no solo obtener los anticuerpos IgG convencionales, sino los isótopos de IgG (Lovon-Luque, 2016). Para los anticuerpos IgG de cadena pesada (HcIgG), existen dos tipos; la IgG2 y la IgG3 que se diferencian por el largo de la región bisagra. A diferencia de las IgG convencionales, las HcIgG presentan una sola región variable (VHH), donde se encuentra el sitio de combinación al antígeno, este dominio es un polipéptido estable con la misma capacidad de unión al antígeno que el anticuerpo completo (Vanina, 2010). El uso de VHHs resulta ser una alternativa prometedora porque, además de ser pequeños (15 kDa) pueden llegar a reconocer diferentes epítomos incluyendo antígenos que se expresan en bajas concentraciones (Rothbauer et al., 2006). Además, son fáciles de manipular debido a su elevada estabilidad y excelente plegado en condiciones extremas. Estos anticuerpos combinan los beneficios de los anticuerpos convencionales junto a las ventajas de las moléculas pequeñas para generar anticuerpos que puedan ayudar en las nuevas aplicaciones que puedan ser inaccesibles para los anticuerpos convencionales.

Los resultados de IFI muestran que los anticuerpos fueron capaces de detectar partes específicas de los epimastigotes. Para el caso del anticuerpo IgY anti-PM, se pudo observar una fluorescencia con mayor intensidad en la membrana ondulante y el flagelo del parásito. Debido a que el antígeno es un extracto de membrana, era de esperarse que la fluorescencia fuera alrededor de *T. cruzi*, así como en el flagelo. En algunos casos también se puede observar fluorescencia en el kinetoplasto ya que a partir de este último se inicia la membrana ondulante (Botero & Restrepo, 2012). De igual manera las IgG anti-TESA reconocieron diferentes partes del parásito observándose presencia de fluorescencia en el soma, kinetoplasto y el núcleo. Esto se debe a que TESA es un antígeno excretado-secretado de *T. cruzi*, es decir, que es obtenido a partir de los productos de secreción y/o de excreción del metabolismo o durante su desarrollo. Como consecuencia de ello, la fluorescencia puede aparecer en diferentes partes del parásito (Berrizbeitia et al., 2012).

Las muestras empleadas como controles negativos, así como las muestras de pacientes negativos por serología y qPCR, presentaron una absorbancia (OD) elevada en la técnica de ELISA-Ag. El punto de corte (promedio más dos desviaciones estándar) más alto fue para las muestras de orina y el más bajo para las muestras de suero. Los puntos de corte altos pueden ser una consecuencia de la naturaleza de los anticuerpos, ya que estos al ser policlonales y ser obtenidos empleando antígenos parcialmente purificados, probablemente reconozcan antígenos inespecíficos presentes en las muestras de estos individuos. Como se muestra en este estudio esta “inespecificidad” puede ser reducida y probablemente eliminada con el uso de mejores agentes, técnicas de bloqueo o con pre-absorción de las muestras con antígenos provenientes de otros organismos.

Las muestras que se analizaron para la detección de antígenos fueron sueros, plasmas y orinas. Las orinas presentan mejores beneficios ya que pueden ser obtenidas fácilmente, al no ser obtenidas de forma invasiva reducen el riesgo de transmisión de enfermedades (Minion et al., 2011). Sin embargo, las muestras de orina tienen la desventaja de tener bajas concentraciones de antígenos, los mismos que además podrían estar degradado; haciendo que la sensibilidad de muchas pruebas sea baja. Algunas investigaciones recomiendan realizar pretratamiento a las muestras en general con la finalidad de detectar los antígenos que se encuentran en bajas concentraciones (Hyde & Miselis, 1984).

Se ha demostrado, mediante qPCR, que existe una mayor concentración de parásitos en pacientes VIH/*T. cruzi* con reactivación de la enfermedad de Chagas, seguido de pacientes coinfectados (VIH/*T. cruzi*) y finalmente pacientes con la enfermedad de Chagas en fase aguda (Teixeira de Freitas et al., 2011). Se puede inferir que el nivel de parasitemia en las muestras analizadas es elevado, igual o mayor al de un paciente enfermo de Chagas en fase aguda.

El plasma fue la muestra con mejores resultados en el ELISA-Ag frente a las pruebas serológicas (IFI, HAI, Tesa blot), mientras que los niveles de antígenos más bajos fueron detectados en las muestras de suero. No se conoce la razón de este bajo rendimiento, se sabe que los antígenos de *T. cruzi* circulan en sangre como inmunocomplejos. Estos complejos inmunes podrían ser atrapados dentro del

coágulo de fibrina, disminuyendo la disponibilidad del antígeno (Ohyama, Kawakami, & Inoue, 2017).

Los valores del área bajo la curva (AUC) fueron mayores en las muestras de orina, enfrentando al qPCR y el ELISA-Ag, mientras que al enfrentar con las pruebas serológicas (IFI, HAI y TESA-blot) las muestras de orina y plasma obtuvieron el mayor valor del AUC (AUC = 1,000). Esto quiere decir que su capacidad de discriminación para clasificar pacientes sanos como sanos y enfermos como enfermos es mejor en estas muestras. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de muestras de plasma es el doble al de las muestras de orina, se necesitaría de una cantidad similar para realizar una adecuada comparación.

Se espera continuar con la evaluación de la prueba ELISA-Ag en recién nacidos y se debe tener en cuenta que la prevalencia de transmisión congénita para la enfermedad de Chagas en zonas endémicas es de 5 a 7% (Bern et al., 2009). En un estudio se observó que durante la infección por *T. cruzi* en las madres y los recién nacidos, la sensibilidad del PCR supera a la del método microscópico, el cual presenta 58% de sensibilidad y 98% de especificidad (Kirchhoff, Votava, & Ochs, 1996). Tomando como prueba de referencia al PCR, con el programa Epidat 4.2 se calcularon 307 pacientes como tamaño de muestra, los necesarios para que el ELISA-Ag alcance una sensibilidad de 68% (10% más que el método microscópico) y una especificidad de 95% en un próximo estudio.

La evaluación con la técnica ELISA-Ag presentó mayor sensibilidad, especificidad y fuerza de concordancia que las pruebas serológicas, pero no superó la prueba molecular de qPCR; sobre todo cuando se analizaron muestras de plasma y orina. Aunque el número de muestras negativas a serología y qPCR fue muy bajo (n=3), ninguna de estas muestras fue positiva en la prueba de ELISA-Ag, lo que significa que la prueba es específica y que no existen antígenos que reaccionen inespecíficamente con los anticuerpos empleados en esta prueba. Es posible, que en aquellas muestras positivas serológicamente y negativas mediante qPCR con resultado positivo a la prueba de ELISA-Ag, que exista antígeno circulante que provenga de parásitos presentes en los tejidos con ausencia de parásitos (tripomastigotes) en sangre. Es posible que estos pacientes estén en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, donde no se encuentran tripomastigotes en sangre, o en

etapas iniciales de la infección con VIH, en las que su sistema inmune aún es capaz de contener la proliferación desmedida de los parásitos de *T. cruzi*.

La evaluación de reacción cruzada de la prueba ELISA-Ag frente a otras enfermedades (leishmaniasis, toxoplasmosis y malaria) mostró que en ninguno de los casos hubo reacción cruzada. Sin embargo, sería necesario realizar esta evaluación con un mayor número de muestras, especialmente de pacientes infectados con diferentes especies del género *Leishmania*. Esto debido a que las áreas endémicas en Latinoamérica se superponen para la infección por *T. cruzi* y *Leishmania sp*, además sus agentes etiológicos poseen una filogenia común muy cercana y se podría asumir que, al menos, compartan una significativa cantidad de características antigénicas. Por ello se necesita de un buen diagnóstico, porque pacientes con alguna o ambas enfermedades pueden resultar mal diagnosticados debido a reacciones serológicas cruzadas (Gil et al., 2011)

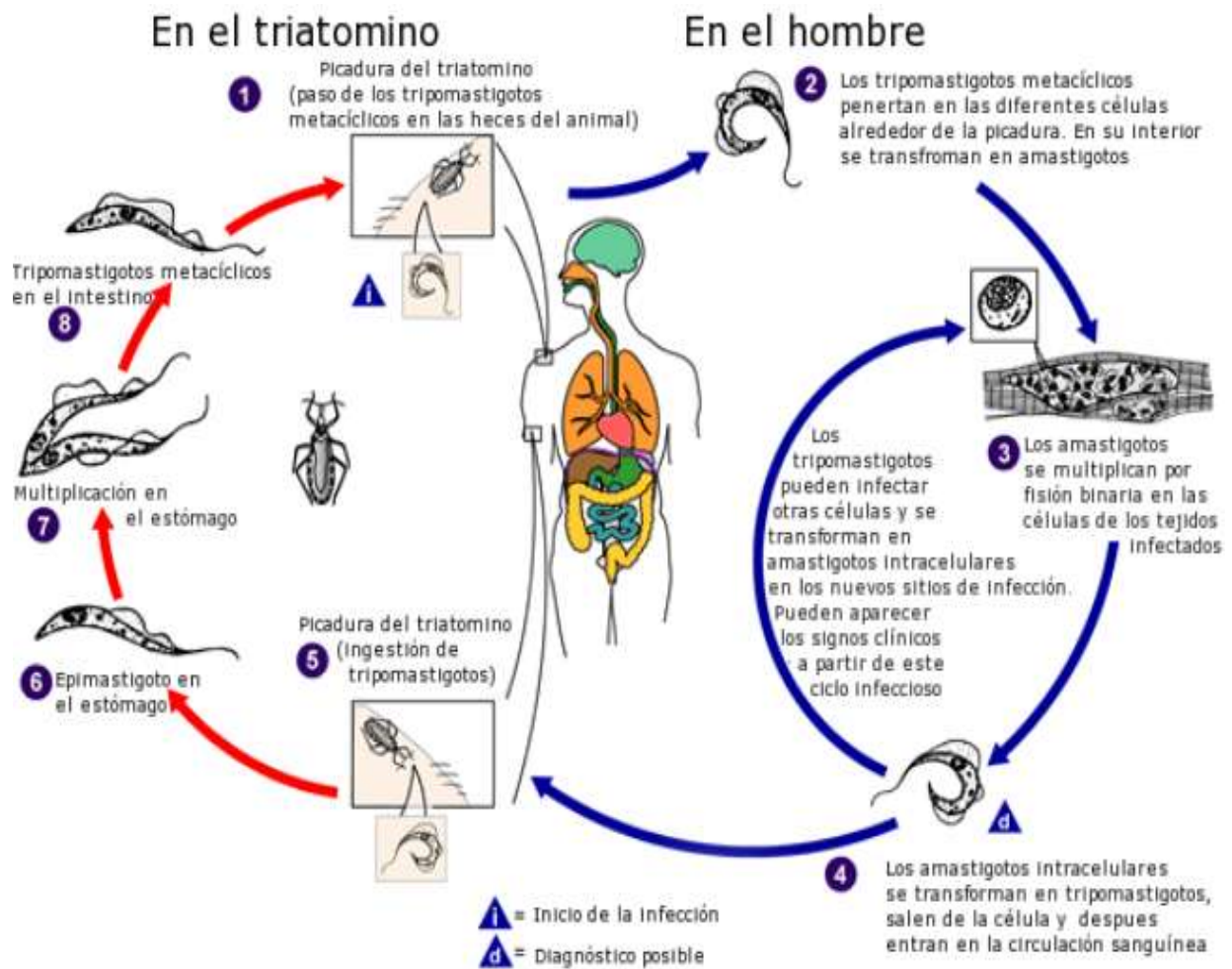
Utilizando una técnica de ELISA simple, con anticuerpos policlonales se pudo lograr la captura de antígenos circulantes en muestras de suero, plasma y orina de pacientes VIH positivos que viven en zonas endémicas a Chagas. La técnica descrita es una metodología prometedora para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, además su elaboración es económica y mucho más simple que las estrategias actuales orientadas a la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orina.

## CONCLUSIONES

- Los anticuerpos policlonales IgY anti-PM de gallina e IgG anti-TESA de alpaca son capaces de reconocer epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- Se desarrolló una prueba de ELISA para la captura de antígenos de *T. cruzi* circulantes en pacientes con coinfección VIH-Chagas.
- La prueba ELISA-Ag presentó una mayor sensibilidad y especificidad en la muestra de plasma frente a las pruebas serológicas (IFI, HAI, TESA-blot)
- La prueba ELISA-Ag presentó una mayor sensibilidad y especificidad en las muestras de orina y plasma frente a la prueba molecular de qPCR,
- Existe una baja correlación entre los valores Ct provenientes del qPCR y los OD del ELISA-Ag para todas las muestras (suero, plasma y orina). Sin embargo, la muestra de plasma presentó el mayor valor en el índice de correlación.
- La prueba ELISA-Ag no presentó reacción cruzada frente a las muestras de leishmaniasis, toxoplasmosis y malaria.

## **LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES**

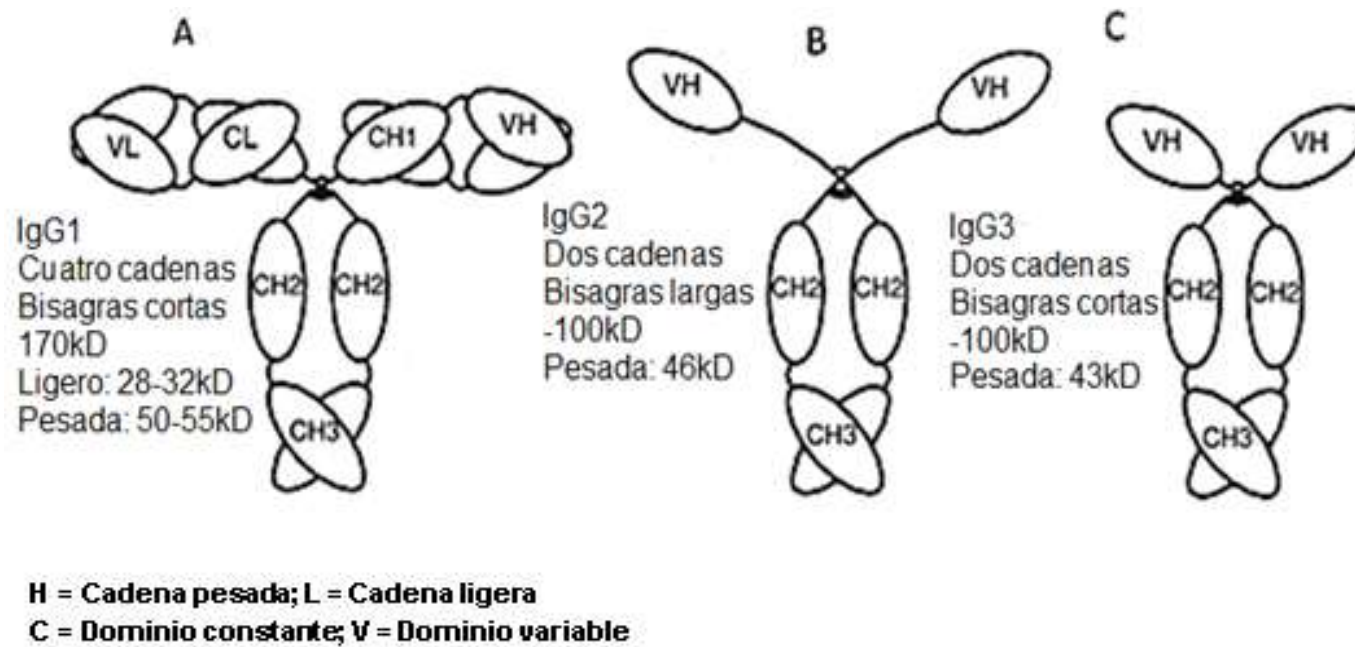
- A fin de corroborar los resultados obtenidos en el presente estudio y validar la utilidad de la prueba de ELISA-Ag se recomienda hacer uso de un mayor número de muestras.
- Se espera iniciar con la evaluación de la prueba ELISA-Ag en recién nacidos, con la finalidad de obtener un diagnóstico inmediato e iniciar con el tratamiento.
- Para realizar una comparación adecuada entre las muestras de suero, plasma y orina se recomienda tener un igual número de muestras para cada grupo.
- Se recomienda probar otros agentes o técnicas de bloqueo para disminuir el punto de corte.
- Para un próximo estudio se debería tener en cuenta la fase de infección por VIH en la que se encuentran los pacientes.
- Además, se debería realizar una evaluación de la técnica ELISA-Ag frente a otras especies de parásitos que causen leishmaniasis, malaria, toxoplasmosis, entre otras enfermedades.



**Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

Ciclo en el hombre (flechas azules) y en los insectos triatominos (flechas rojas).

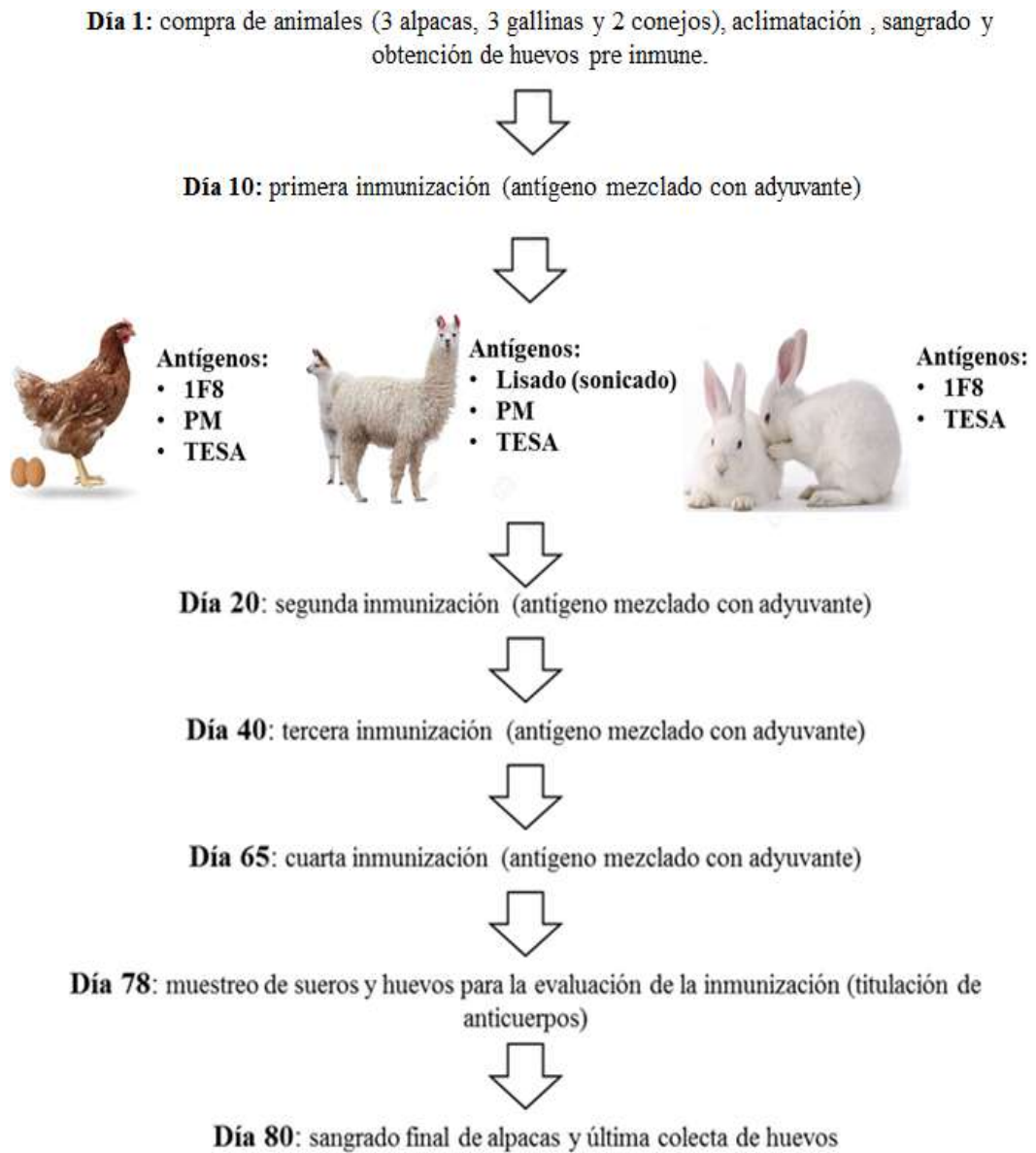
Fuente: Adaptada del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>



**Figura 2: Representación estructural de las IgG de camélidos:**

Immunoglobulina G convencional: (A) IgG1 e inmunoglobulina de cadena pesada: (B) IgG2 e (C) IgG3 Fuente: adaptada Wernery, 2001





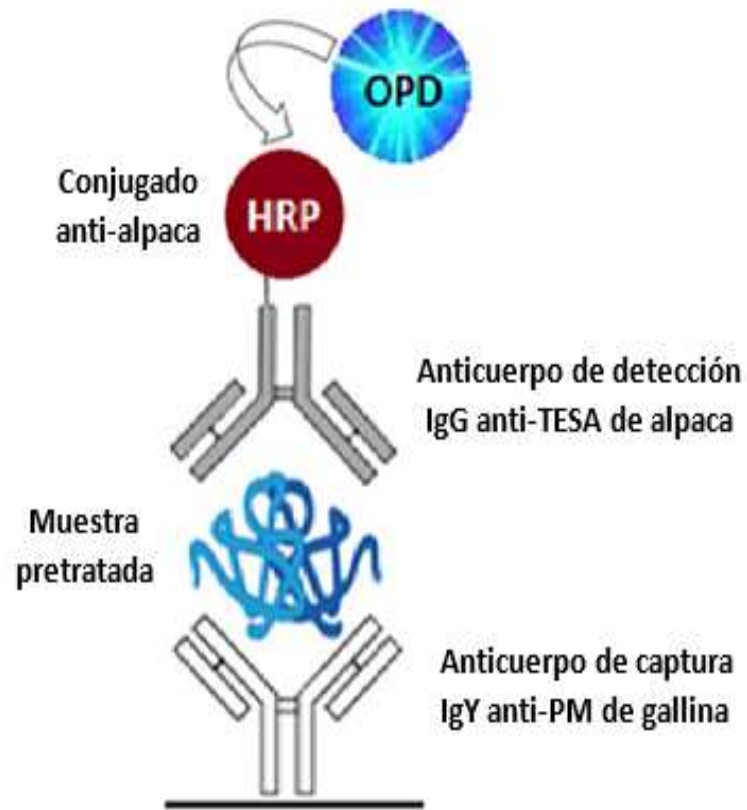
**Figura 3: Flujograma general de la inmunización de alpacas, gallinas y conejos.**

Fuente: adaptada de Lovon-Luque, 2016

**Tabla 1: Modificaciones al protocolo original del Elisa-Ag**

	<b>Protocolo I</b>	<b>Protocolo II</b>	<b>Protocolo Original (Lovon-Luque, 2016)</b>
<b>Concentración del anticuerpo de captura</b>	4 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml
<b>Concentración del anticuerpo de detección</b>	4 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml
<b>Bloqueo</b>	PBST*, leche 6%, BSA** 2%	PBST, leche 6%	PBST, leche 6%
<b>Dilución de la muestra, conjugado y anticuerpo de detección</b>	PBST, leche 1%, BSA 1%	PBST, leche 1%	PBST, leche 1%

\*PBST: PBS Tween 0,3% \*\*BSA: Albúmina de Suero Bovino



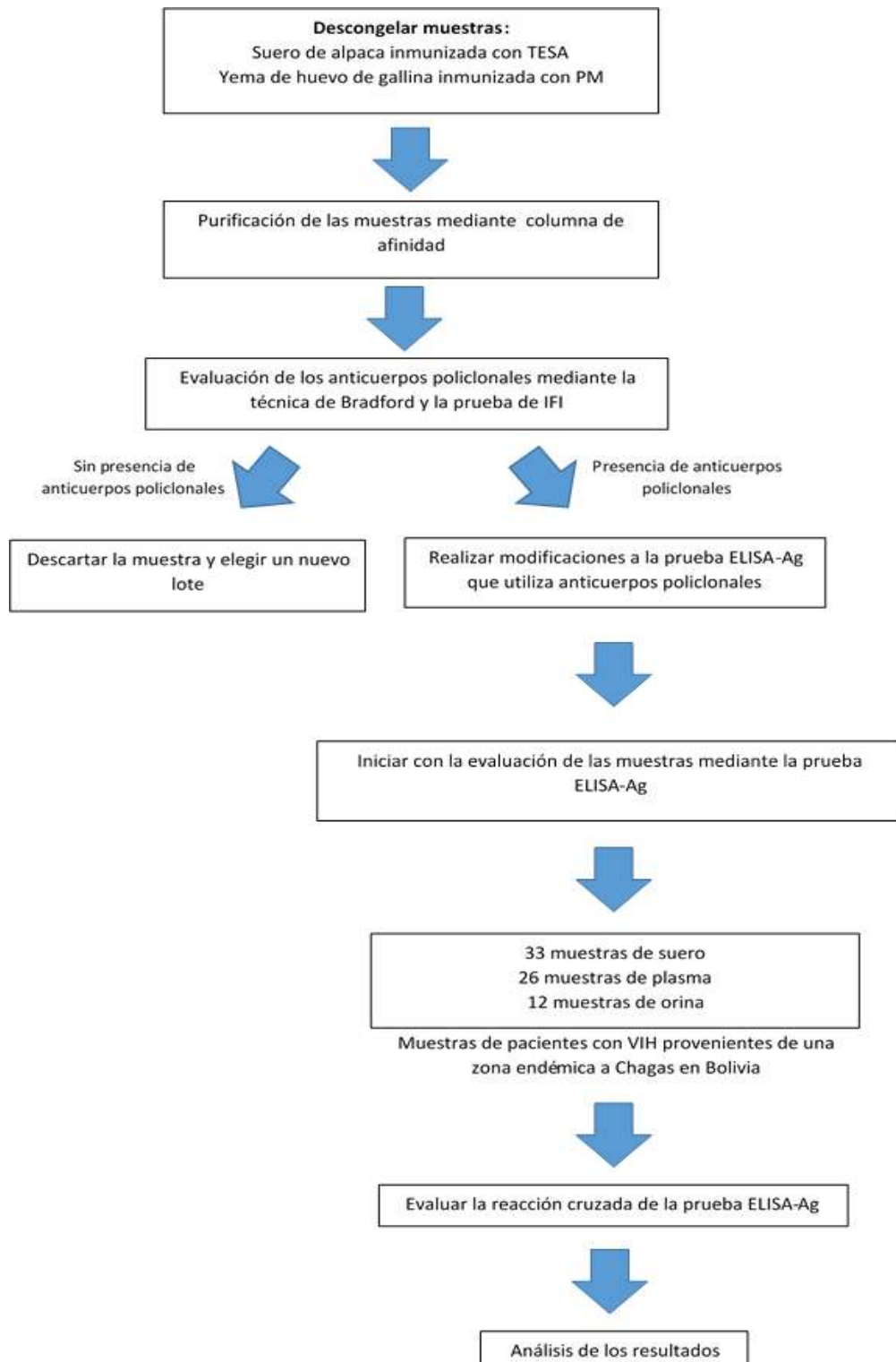
**Figura 4: Esquema del ELISA-Ag**

HRP: enzima peroxidasa de rábano. OPD: tabletas de dihidrocloruro de o-fenilendiamina

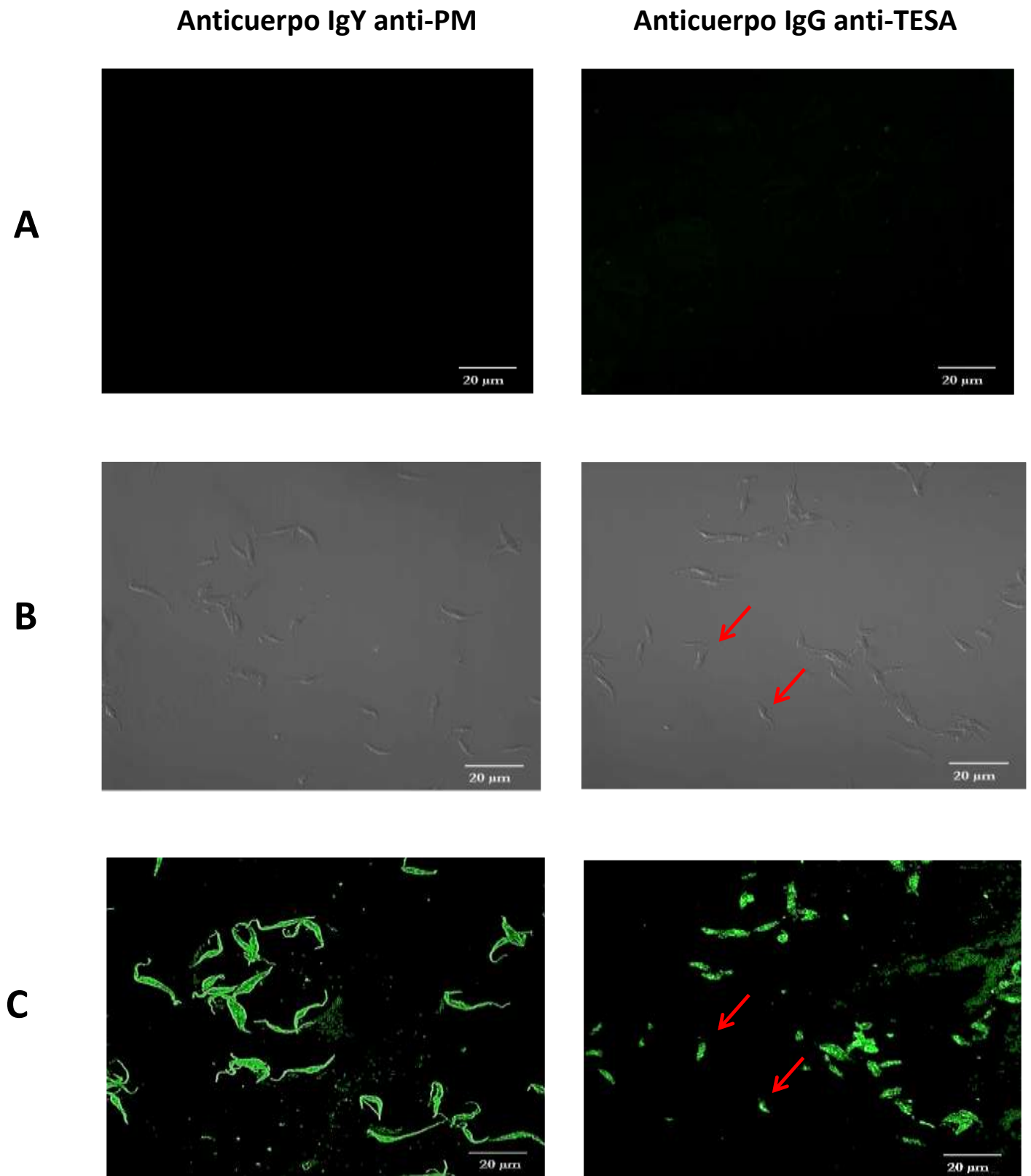
**Tabla 2: Ejemplo de la tabla de cuatro casillas**

		Pruebas Serológicas/qPCR			VPP	VPN
		Positiva	Negativa	Total		
ELISA-Ag	Positivos	A	B	A+B	A/A+B	-
	Negativos	C	D	C+D	-	D/C+D
	Total	A+C	B+D	A+B+C+D		
	Sensibilidad	A/A+C	-			
	Especificidad	-	D/B+D			

Interpretación de la sensibilidad ( $A/A+C$ ), especificidad ( $D/B+D$ ), VPP: valor predictivo positivo ( $A/A+B$ ) y VPN: valor predictivo negativo ( $D/C+D$ )



**Figura 5: Flujograma del estudio “Detección de antígeno circulante de Trypanosoma cruzi en pacientes con VIH de una población endémica en Bolivia”**



**Figura 6: Inmunofluorescencia indirecta del anticuerpo de gallina IgY anti-PM y el IgG anti-TESA de alpaca.**

A. Controles, B. presencia de epimastigotes, C. reacción entre los anticuerpos policlonales y el parásito *T. cruzi* observados mediante un microscopio confocal a 1000X. Flecha roja: fluorescencia en el núcleo y kinetoplasto del parásito.

**Tabla 3: Resultado de la estandarización de la prueba de ELISA –Ag**

	Protocolo I		Protocolo II		Protocolo Original (Lovon-Luque, 2016)	
	Pool Positivo	Pool Negativo	Pool Positivo	Pool Positivo	Pool Positivo	Pool Negativo
Suero Humano	1,767 ± 0,002	0,386 ± 0,008	1,006 ± 0,021	0.663 ± 0,02	0,626 ± 0,003	0,223 ± 0,002
Plasma Humano	1,895 ± 0,002	0,316 ± 0,008	1,085 ± 0,018	0.581 ± 0,012	0,841 ± 0,019	0,301 ± 0,014
Orina Humana	1,756 ± 0,003	0,268 ± 0,004	0,934 ± 0,02	0.528 ± 0,12	0,823 ± 0,01	0,311 ± 0,01
Orina de <i>C. porcellus</i> *	1,291 ± 0,009	0,316 ± 0,002	1,892 ± 0,004	0.602 ± 0,14	1,089 ± 0,005	0,318 ± 0,003

Se utilizaron muestras (suero, plasma y orina) de individuos sanos como pool negativo y estas mismas contaminadas con lisado total (2 µg/ml) de tripomastigotes de *T. cruzi* como pool positivo.

\*Muestras obtenidas del estudio previo (Lovon - Luque, 2016)

**Tabla 4: Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de suero**

		Pruebas Serológicas			VPP	VPN
		Positiva	Negativa	Total		
ELISA-Ag	Positivos	13	0	13	100%	-
	Negativos	7	13	20	-	65%
	Total	20	13	33		
Sensibilidad		65%	-			
Especificidad		-	100%			

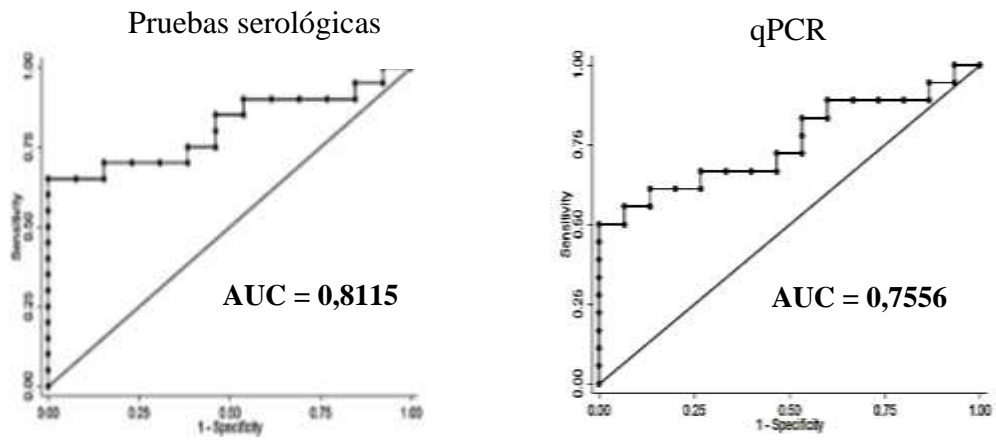
  

		qPCR			VPP	VPN
		Positiva	Negativa	Total		
ELISA-Ag	Positivos	11	2	13	84,6%	-
	Negativos	7	13	20	-	65%
	Total	18	15	33		
Sensibilidad		61,1%	-			
Especificidad		-	86,6%			

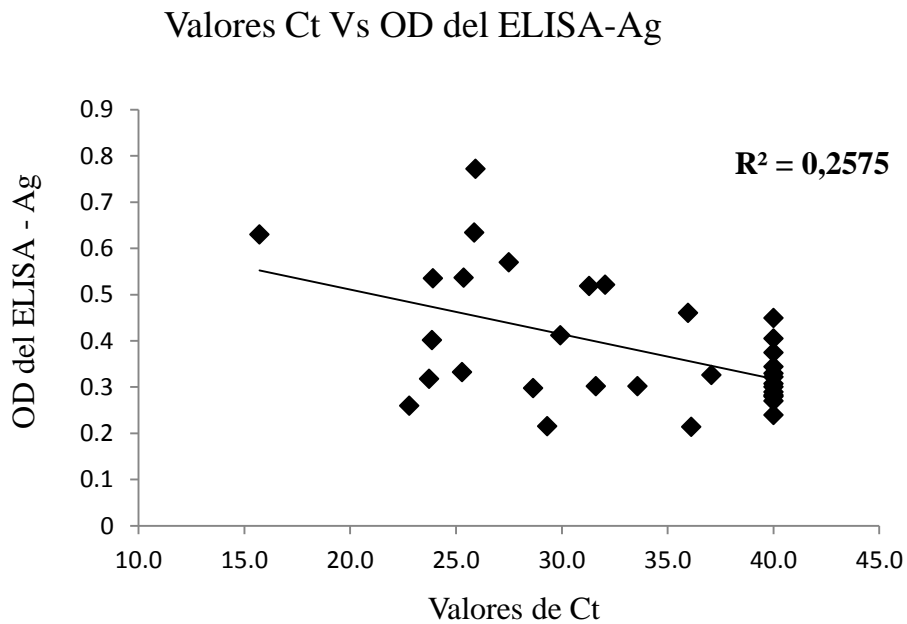
Se utilizaron 33 muestras de suero de pacientes VIH provenientes de una población endémica a Chagas de Bolivia. **A.** Pruebas Serológicas (HAI, IFI y TESA-blot) vs.

ELISA-Ag. **B.** Prueba molecular qPCR vs. ELISA-Ag





**Figura 7: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de suero.** Se utilizaron como pruebas de referencia las Pruebas Serológicas (HAI, IFI y Tesa-blot) y la prueba molecular qPCR. AUC: área bajo la curva.



**Figura 8: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de suero**

OD: densidad óptica.  $R^2$ : índice de correlación. Valores Ct: valores del ciclo

**Tabla 5: Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de plasma**

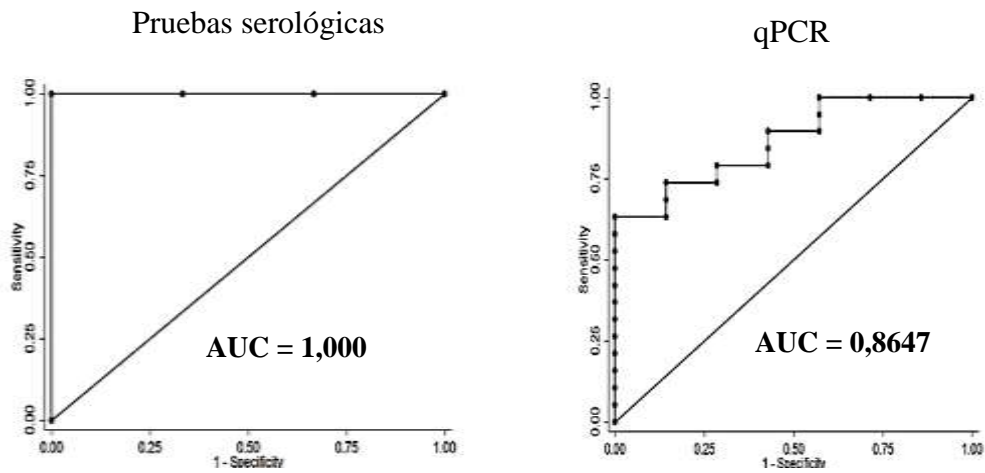
**A**

		Pruebas Serológicas			VPP	VPN
		Positiva	Negativa	Total		
ELISA-Ag	Positivos	23	0	23	100%	-
	Negativos	0	3	3	-	100%
	Total	23	3	26		
Sensibilidad		100%	-			
Especificidad		-	100%			

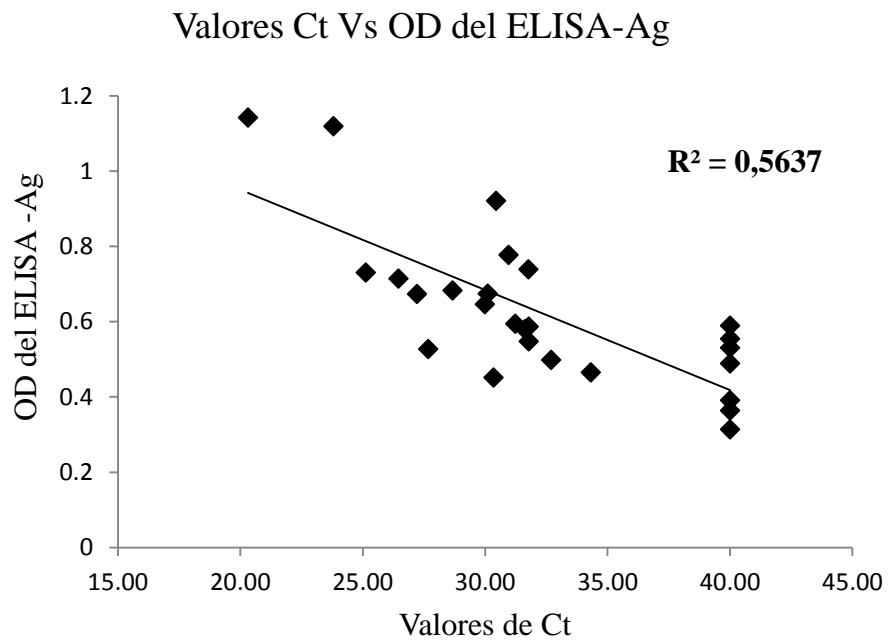
**B**

		qPCR			VPP	VPN
		Positiva	Positiva	Positiva		
ELISA-Ag	Positivos	19	4	23	82,6%	-
	Negativos	0	3	3	-	100%
	Total	19	7	26		
Sensibilidad		100%	-			
Especificidad		-	42,8%			

Se utilizaron 26 muestras de plasma de pacientes VIH provenientes de una población endémica a Chagas de Bolivia. **A.** Pruebas Serológicas (HAI, IFI y TESA-blot) vs. ELISA-Ag. **B.** Prueba molecular qPCR vs. ELISA-Ag



**Figura 9: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de plasma**  
 Se utilizaron como pruebas de referencia las Pruebas Serológicas (HAI, IFI y Tesa-blot) y la prueba molecular qPCR. AUC: área bajo la curva



**Figura 10: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de plasma**

OD: densidad óptica. R<sup>2</sup>: índice de correlación. Valores Ct: valores del ciclo

**Tabla 6: Análisis entre las pruebas serológicas y la prueba molecular qPCR frente al Elisa-Ag en muestras de orina**

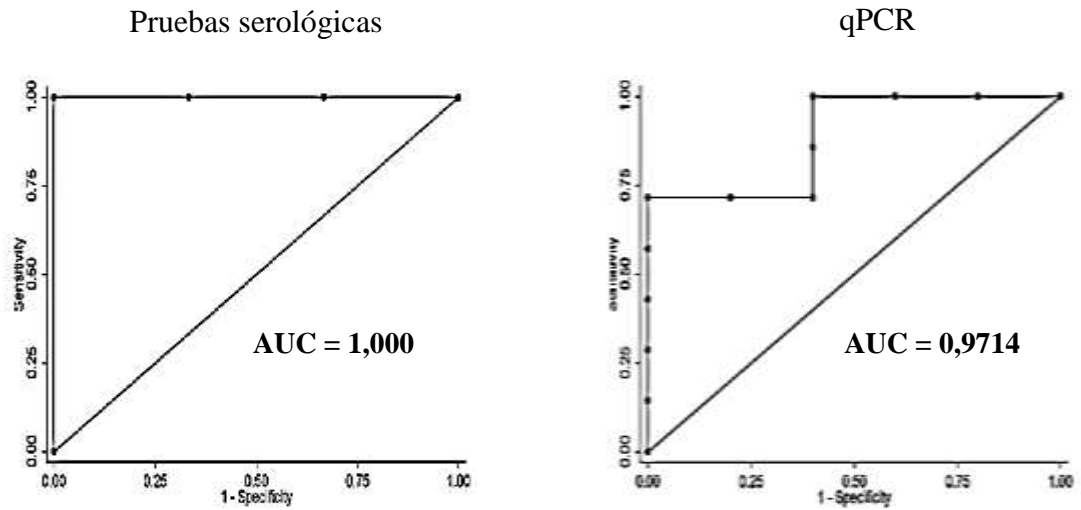
**A**

		Pruebas Serológicas			VPP	VPN
		Positiva	Positiva	Positiva		
ELISA-Ag	Positivos	7	0	7	100%	-
	Negativos	2	3	5	-	60%
	Total	9	3	12		
Sensibilidad		77,8 %	-			
Especificidad		-	100%			

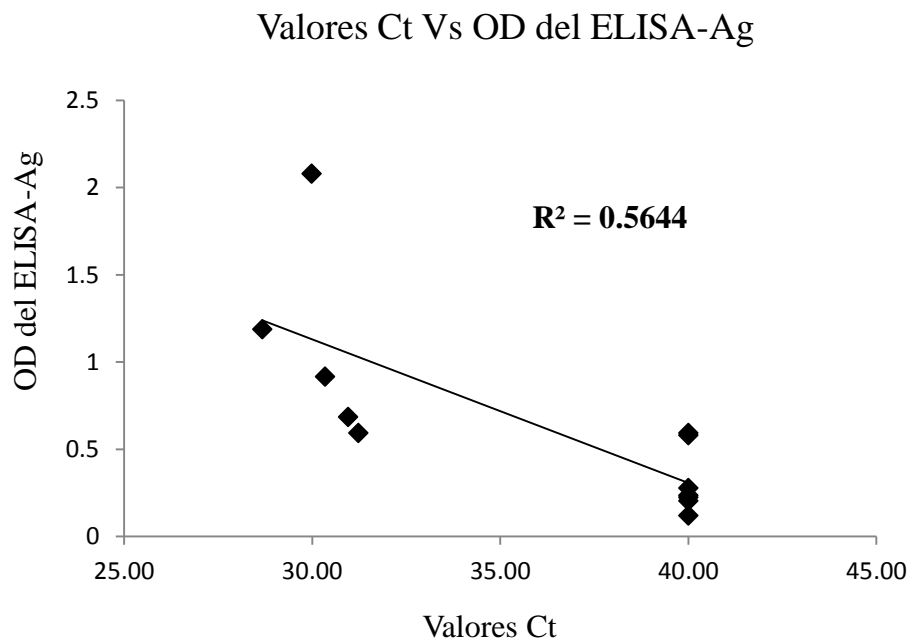
**B**

		qPCR			VPP	VPN
		Positiva	Positiva	Positiva		
ELISA-Ag	Positivos	5	2	7	71,42%	-
	Negativos	0	5	5	-	100%
	Total	5	7	12		
Sensibilidad		100%	-			
Especificidad		-	71,42%			

Se utilizaron 12 muestras de orina de pacientes VIH provenientes de una población endémica a Chagas de Bolivia. **A.** Pruebas Serológicas (HAI, IFI y TESA-blot) vs. ELISA-Ag. **B.** Prueba molecular qPCR vs. ELISA-Ag



**Figura 11: Curva de ROC de la prueba ELISA-Ag en muestras de orina**  
 Se utilizaron como pruebas de referencia las Pruebas Serológicas (HAI, IFI y Tesa-blot) y la prueba molecular qPCR. AUC: área bajo la curva



**Figura 12: Correlación entre los valores Ct y OD del ELISA-Ag en muestras de orina**

OD: densidad óptica. R<sup>2</sup>: índice de correlación. Valores Ct: valores del ciclo umbral

**Tabla 7: Evaluación de la reacción cruzada de la prueba ELISA-Ag**

	Leishmania n=4	Malaria n=4	Toxoplasma n=4
Plasma n=2	0,1102 ± 0,0002	0,1160 ± 0,0024	0,1302 ± 0,0012
Suero n=2	0,2081 ± 0,0002	0,1044 ± 0,0071	0,2371 ± 0,0021

Se utilizaron 4 muestras (2 sueros y 2 plasmas) positivas a Leishmaniasis, Malaria y Toxoplasmosis provenientes de diferentes pacientes. La evaluación se realizó por duplicado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberti Amador, E., Alberto Fachado Carvajales, L., Ana Montalvo, L. M., Luis Izquierdo Pérez, L. A., & Fonte Galindo, L. (1998). Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. Cubana de Medicina Tropical*, 50(1).
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466.
- Bern, C., Verastegui, Manuela Gilman, R. H., LaFuente, C., Galdos Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Sterling, Charles and Maguire, J. H. f. (2009). Congenital *Trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis.*, 49(11), 1667–1674.
- Berrizbeitia, M., Concepcion, J. L., Carzola, V., Rodríguez, J., Cáceres, A., & Quiñones, W. (2012). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Canis familiaris* del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*, 33(2).
- Botero D & Restrepo M. (2012). *Parasitosis Humana*. (Corporación para investigaciones biológicas, Ed.) (5ta ed.). Medellín, Colombia.
- Brisse, S., Dujardin, J. C., & Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(1), 95–105.
- Cabezas-Sánchez, C. (2014). Enfermedades Infecciosas Desatendidas: Un Permanente Reto Para La Salud Pública Y La Equidad En El Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública.* , 31(2), 326–335.
- Casillas-iglesias, F. I., Bonilla-Lara, D., Murillo-Vázquez, J. D., Corona-Sánchez, E. G., Contreras-Moreno, M. G., Saldaña-Anguiano, J. M., & González-López, L. (2015). Anticuerpos antipéptido citrulinado cíclico (anti-CCP) en artritis reumatoide. *El Residente*, 10(1), 12–17.
- Cassab, J. R. A., Noireau, F., & Guillén, G. (1999). La Enfermedad de Chagas en

- Bolivia - Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002), (Ediciones Gráficas, Ed.) (1era ed). La paz, Bolivia
- Cecchini, D. M., Lespada, M. I., Riarte, A., & Rodriguez, C. G. (2009). Reactivación de la enfermedad de Chagas en el sistema nervioso central de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev. del Instituto de Seguridad Social del Neuquén (ISSN)*, 17(64), 52-59.
- Chalghoumi, R., Théwis, A., Portetelle, D., & Beckers, Y. (2008). Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. *Poultry Science*, 87(1), 32–40.
- Chanana, V., Kaur, K. J., & Salunke, D. M. (2004). Purification, identification and preliminary crystallographic characterization of a novel seed protein from *Vigna unguiculata*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(11), 2100–2103.
- Chirinos, S. V. C. N. V. (2005). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). *Guia*, 1(511), 104.
- Crisante, G., & Parada, H. (2007). Nuevos casos agudos de enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela. *Rev. de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo*, 11(1), 87-90.
- Da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., & Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, 17(6), 286–291.
- Daley, L. P., Gagliardo, L. F., Duffy, M. S., Smith, M. C., & Appleton, J. A. (2005). Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(3), 380–386.
- de Oliveira Santos, E., dos Reis Canela, J., Gomes Moncao, H. C., & Guedes Roque, M. J. (2002). Reactivation of Chagas' disease leading to the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 6(6),



317–321.

- de Souza, M. M., Andrade, S. G., Barbosa, A. A., Macedo Santos, R. T., Alves, V. A., & Andrade, Z. A. (1996). Trypanosoma cruzi strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(2), 217–224.
- de Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1, 1–21.
- Dolcini, G. L., Solana, M. E., Andreani, G., Celentano, A. M., Parodi, L. M., Donato, A. M., Peralta, L. M. (2008). Trypanosoma cruzi (Chagas' disease agent) reduces HIV-1 replication in human placenta. *Retrovirology*, 5, 1–13.
- Duffy, T. (2010). Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de Trypanosoma cruzi. . Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 163 p.
- Escamilla-Guerrero, G., Martínez-Gordillo, M. N., Riverón-Negrete, L., Aguilar-Escobar, D. V., Bravo-Lindoro, A., Cob-Sosa, C., & Ponce-Macotela, M. (2012). Trypanosoma cruzi: Seroprevalence detected in the blood bank of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, in the period 2004 through 2009. *Transfusion*, 52(3), 595–600.
- Funk, P. E., & Thompson, C. B. (1996). Current concepts in chicken B cell development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 212, 17–28.
- García-Escalante, M. G., Ehrenberg-Enriquez, J., & Puerto, F. I. (1996). Estudio del perfil antigénico de Trypanosoma cruzi a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de. *Rev. Biomed.*, 7(490), 133–145.
- García-jordán, N., Berrizbeitia, M., & Concepción, J. L. (2015). Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por Trypanosoma cruzi en la población rural del estado Sucre , Venezuela. *Biomedica*, 35, 247–257.
- Gil, J., Cimino, R., Quiroga, I. L., Cajal, S., Acosta, N., Juarez, M., Nasser, J. (2011). Reactividad del antígeno GST-SAPA de trypanosoma cruzi frente a sueros de

- pacientes con enfermedad de chagas y leishmaniasis. *Medicina*, 71(2), 113–119.
- Gonzalez, A., Lerner, T. J., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N., & Lizardi, P. M. (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 13(16), 5789–5804.
- Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., & Rosado-Barrera, M. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomédica* 10(3): 177-184.
- Haurum, J. S. (2006). Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? *Drug Discovery Today*, 11(13–14), 655–660.
- Hyde, T. M., & Miselis, R. R. (1984). Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 247(1), 173–182.
- Jazin, E. E., Luquetti, A. O., Rassi, A., & Frasch, A. C. C. (1991). Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 59(6), 2189–2191.
- Johnson, C. A., Kleshchenko, Y. Y., Ikejiani, A. O., Udoko, A. N., Cardenas, T. C. & Pratap, S. (2012). Thrombospondin-1 interacts with *Trypanosoma cruzi* surface calreticulin to enhance cellular infection. *PLoS ONE*, 7(7).
- Kirchhoff, L. V, Votava, J. R., & Ochs, D. E. (1996). Comparison of PCR and Microscopic Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*, *Journal of Clinical Microbiology* 34(5), 1171–1175.
- Kovacs-Nolan, J., & Mine, Y. (2012). Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 163–182.
- Kowalska, A., Kowalski, P., & Torres, M. Á. T. (2011). Chagas disease - American trypanosomiasis. *Polish Annals of Medicine*, 18(1), 156–167.
- Landfear, S. M., & Ignatushchenko, M. (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(1), 1–17.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159.

- Larsson, A., Karlsson-Parra, A., & Sjoquist, J. (1991). Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*, 37(3), 411–414.
- Lebacqz-Verheyden, A. M., Vaerman, J. P., & Heremans, J. F. (1974). Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology*, 27(4), 683–692.
- Lorca, M., Veloso, C., Munoz, P., Bahamonde, M. I., & Garcia, A. (1995). Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(6), 512–515.
- Lovon-Luque, C. J. (2016). Estandarización de la prueba de ELISA de captura para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas 119 p
- Machado-de-Assis, G. F., Silva, A. R., Do Bem, V. A. L., Bahia, M. T., Martins-Filho, O. A., Dias, J. C. P. & Lana, M. (2012). Posttherapeutic cure criteria in chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(8), 1283–1291.
- Mallimaci, M. C., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Sanchez, Z., Sijvarger, C., Alvarez, I. M., & Sugura, E. L. (2010). Short Report: Early diagnosis of congenital trypanosoma cruzi infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), 55–59.
- Martínez, I., Cervantes-Landín, A., & Espinoza, B. (2013). Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Gaceta Medica de Mexico*, 149(3), 363–365.
- Minion, J., Leung, E., Talbot, E., Dheda, K., Pai, M., & Menzies, D. (2011). Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: Systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 38(6), 1398–1405.

- Moretti, E. (2012). Chagas disease: A brief analysis of some of the factors influencing the disease's persistence. *Salud Colectiva*, 1(4), 33-36.
- Muyldermans, S., Baral, T. N., Retamozzo, V. C., De Baetselier, P., De Genst, E., Kinne, J., & Saerens, D. (2009). Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), 178-183.
- Ntakarutimana, V., Demedts, P., van Sande, M., & Scharpé, S. (1992). A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. *Journal of Immunological Methods*, 153(1-2), 133-140.
- Ohyama, K., Kawakami, H., & Inoue, M. (2017). Blood Pressure Elevation Associated with Topical Prostaglandin F2 $\alpha$  Analogs: An Analysis of the Different Spontaneous Adverse Event Report Databases. *Biol. Pharm. Bull*, 616(40), 616-620.
- Organización Mundial de la Salud (2009). Enfermedad de Chagas: control y eliminación. (Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/A62/A62\\_17-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_17-sp.pdf)).
- Palacios, X., Belli, A., & Espino, A. M. (2000). Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. *Pan American Journal of Public Health*, 8(6), 411-417.
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2017). Chagas disease. *The Lancet*, 391, 82-94.
- Petray P, Bonardello N, Clark R, Agranatti M, Corral R, G. S. (1992). Evaluation of an ELISA technique for detection of antigens and circulating immune complexes of *Trypanosoma cruzi* by a field study in an endemic zone of Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, 32(2), 141-147.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M. & Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103(3), 195-200.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*,

375(9723), 1388–1402.

- Rice, M. L., Buchanan, A. L., Siberry, G. K., Malee, K. M., Zeldow, B., Frederick, T., & Williams, P. L. (2011). Language Impairment in Children Perinatally Infected with HIV Compared With Children Exposed and Without Infection: *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 33(2): 112-123.
- Romero A. (2014). Producción de anticuerpo policlonales IgY en gallinas para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía. 74 p.
- Rose, M. E., & Orlans, E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Developmental and Comparative Immunology*, 5(1), 15–20.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A. & Leonhardt, H. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature Methods*, 3(11), 887–889.
- Sartori, A. M. C., Caiaffa-Filho, H. H., Bezerra, R. C., Guilherme, C. D. S., Lopes, M. H., & Aparecida Shikanai-Yasuda, M. (2002). Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(5), 521–523.
- Sartori, A. M. C., Ibrahim, K. Y., Nunes Westphalen, E. V., Braz, L. M. A., Oliveira, O. C., Gakiya, É. & Shikanai-Yasuda, M. A. (2007). Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(1), 31–50.
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 75–85.
- Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1–2), 14–21.
- Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 117–143.

- Souza, W. de. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1), 17–36.
- Stauffert, D., Silveira, M. F. da, Mesenburg, M. A., Manta, A. B., Dutra, A. da S., Bicca, G. L. de O., & Villela, M. M. (2017). Prevalence of *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(2), 180–184.
- Tassiopoulos, K., Moscicki, A.-B., Mellins, C., Kacanek, D., Malee, K., Allison, S., Seage, G. R. (2013). Sexual Risk Behavior Among Youth With Perinatal HIV Infection in the United States: Predictors and Implications for Intervention Development. *Clinical Infectious Diseases*, 56(2), 283–290.
- Teixeira, A. R. L., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5), 463–491.
- Teixeira de Freitas, V. L., Vicente da Silva, S., Sartori, A. M., Bezerra, R. C., Nunes Westphalen, E. V., Molina, T., & Texeira, A. R. (2011). Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4+ Level. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5(8): 137-143.
- Toso M, A., Vial U, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Médica de Chile*, 139(2), 258–266.
- Umezawa, E. S., & Franco Da Silveira, J. (1999). Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1), 285–288.
- Vainio, O., & Imhof, B. A. (1995). The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunology Today*, 16(8), 365–370.
- Vanina, A. (2010). Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 112 p.
- Wernery, U. (2001). Camelid immunoglobulins and their importance for the new born a

review. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 48(8), 561–568.

Wilber, H., & Gutierrez, M. (2009). Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos Importance of avian immunoglobulins and their immunoassay applications. *Teoría Y Praxis Investigativa*, 4(2), 19–26.