



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

PARASITEMIA POR *TRYPANOSOMA*  
*CRUZI* Y NIVELES DE ISOTIPOS DE  
ANTICUERPOS IGG EN MUJERES QUE  
ASISTIERON AL HOSPITAL DE NIÑOS,  
SANTA CRUZ-BOLIVIA, 2017

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

CRISTIAN ROCA AVENDAÑO

LIMA, PERÚ  
2018



**ASESORES**

**ASESOR PRINCIPAL**

Javier Bustos Palomino, PhD(c)

**COASESOR**

Manuela Verastegui Pimentel, PhD

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia por su apoyo en mi vida profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue elaborado como parte de los trabajos realizados en la Maestría en Ciencias en Investigación Epidemiológica ofrecida conjuntamente con la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI).

El autor del presente trabajo agradece el apoyo y guía recibidos de los docentes y alumnos/as del programa.

Un agradecimiento al Dr. Robert H. Gilman por el apoyo, confianza, guía y por el entrenamiento brindado en todo el proceso de la realización de la tesis y la maestría.

También agradezco a mis amigos y compañeros de trabajo del Hospital de Niños "Mario Ortiz Suárez" de Bolivia y del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas, por el apoyo brindado.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La maestría es parte del programa 2D43 TW007393 "Consortio Internacional de Entrenamiento en Investigación Epidemiológica", auspiciado por el Centro Internacional Fogarty de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH/FIC).

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
2.1. Planteamiento del problema .....	3
2.2. Justificación.....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	6
3.1. Enfermedad de Chagas .....	6
3.2. Ciclo Biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
3.3. Fase aguda y Fase crónica de la enfermedad de Chagas .....	8
3.4. Diagnóstico.....	9
3.4.1. Prueba rápida para Chagas .....	10
3.4.2. ELISA recombinante para detección de <i>T. cruzi</i> .....	10
3.4.3. Inmunoblot para <i>T. cruzi</i> (TESA-Blot).....	11
3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para <i>T. cruzi</i> .....	12
3.5. Tratamiento .....	12
3.6. Inmunidad frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general .....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
5. METODOLOGÍA.....	15
5.1. Diseño del estudio .....	15
5.2. Población.....	15
5.3. Muestra.....	15
5.4. Operacionalización de variables.....	16
5.5. Procedimientos y técnicas efectuadas en el estudio previo.....	16
5.5.1. ELISA para detección de anticuerpos IgG1 .....	17
5.5.2. ELISA para detección de anticuerpos IgG2 .....	18
5.5.3. ELISA para detección de anticuerpos IgG3 .....	19
5.6. Consideraciones éticas .....	20
5.7. Plan de análisis .....	21

6. RESULTADOS .....	22
7. DISCUSIÓN.....	24
8. CONCLUSIONES.....	28
9. RECOMENDACIONES .....	29
10. REFERENCIAS.....	30
ANEXOS.....	37

## RESUMEN

**Objetivos:** Determinar la correlación entre la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* y niveles de isotipos de anticuerpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3), en pacientes seropositivas a Chagas.

**Métodos:** Se analizaron los datos de un estudio previo, realizado a mujeres de un hospital de Santa Cruz, Bolivia. La carga parasitaria se midió mediante la técnica de q-PCR y los niveles de isotipos de anticuerpos IgG fueron medidos por la técnica de ELISA. El análisis de datos se realizó utilizando la prueba de correlación de Spearman, t-student y ANOVA y regresión multivariada.

**Resultados:** 463 personas fueron incluidas en el análisis. La carga parasitaria no tiene correlación con los isotipos IgG2 e IgG3, pero con el isotipo IgG1 se evidencia una correlación negativa (Rho: -0.54, p=0.04). Luego de ajustar por estado socioeconómico y nivel educativo, entre las mujeres seropositivas, aquellas que tuvieron parásitos en sangre presentaron mayores niveles anticuerpos IgG1 comparado con las que no tuvieron parásitos en sangre (Coef.: 0.49, IC95%: 0.16 a 0.82, p<0.01).

**Conclusión:** No se evidencia un correlación directamente proporcional los niveles de isotipos IgG con la carga parasitaria por *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, la presencia de parásitos en la sangre, está asociada con mayores niveles de isotipos de anticuerpos IgG en personas seropositivas para Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, Anticuerpos, *Trypanosoma*.

## **ABSTRACT**

**Objectives:** Determine the correlation between the parasitic load of *Trypanosoma cruzi* and levels of IgG antibodies isotypes (IgG1, IgG2, IgG3), in Chagas seropositive patients.

**Methods:** Data from a previous study, conducted on women from a Hospital of Santa Cruz, Bolivia, were analyzed. The parasitic load was measured by the q-PCR test and the isotype levels of IgG antibodies were measured by the ELISA test. Data analysis was performed using the Spearman correlation test, student-t test, ANOVA and multivariate regression.

**Results:** 463 people were included in the analysis. The parasitic load has no correlation with the isotypes IgG2 and IgG3, but with the IgG1 isotype a negative correlation is shown (Rho: -0.54,  $p = 0.04$ ). After adjusting for socioeconomic status and educational level, among seropositive women, those who had presence of blood parasites had higher levels of IgG1 antibodies isotypes compared to those who did not have blood parasites (Coef.: 0.49, CI 95%: 0.16 a 0.82,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** There is no evidence of a proportional correlation between IgG isotype levels and the parasitic load by *Trypanosoma cruzi*. However, the presence of parasites in the blood per se is associated with higher levels of IgG antibody isotypes in Chagas-seropositive patients.

**Keywords:** Chagas disease, Antibodies, *Trypanosoma*.

---



## 1. INTRODUCCIÓN

En el mundo, entre 6 – 7 millones de personas están infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas), encontrándose la mayoría de los casos en latinoamérica. La enfermedad de Chagas se transmite principalmente mediante un insecto triatomino (vector), el cual se encuentra en regiones rurales, suburbanas o urbanas insalubres. Se estima que hay aproximadamente 100.000 personas por región endémica que están en riesgo de contraer esta enfermedad.<sup>1</sup> La enfermedad de Chagas representa una importante causa de muerte prematura. Se ha logrado importantes avances en el tratamiento y control de la enfermedad en los últimos 5 años, sin embargo, la enfermedad continúa siendo endémica en muchas regiones.<sup>2</sup> Además de la transmisión por vía vectorial, existen otros modos de transmisión de la enfermedad de Chagas, entre ellos: la infección por vía vertical (de madres a hijos), mediante transfusiones de sangre contaminada, por vía oral e incluso la transmisión por vía sexual ha sido reportada.<sup>3-7</sup> Se ha demostrado que entre el 20-30% de los enfermos con Chagas, sufrirán de una enfermedad cardíaca conocida como Miocardiopatía Chagásica.<sup>8</sup>

En Bolivia la enfermedad de Chagas representa un serio problema para la salud pública. Actualmente, ciertas áreas rurales de Bolivia presentan las prevalencias más altas a nivel mundial de infección por *T.cruzi*. Se estima que alrededor del 70% de los casos de miocardiopatía en Bolivia son atribuibles a la enfermedad de Chagas.<sup>9</sup> Las prevalencias de Chagas en mujeres embarazadas de distintas poblaciones son desde 1% hasta 54% según la población estudiada. En áreas

rurales de Bolivia se ha reportado un 42% de seroprevalencia y en áreas urbanas se ha encontrado un 29%.<sup>10</sup> Entre 6-7% de las mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi*, transmiten la enfermedad de Chagas a sus hijos.<sup>11</sup> Además, estudios reportan que mayores niveles de parasitemia en mujeres embarazadas están asociados a mayor probabilidad de transmisión de la enfermedad de Chagas por vía congénita.<sup>12</sup> La infección congénita por *T. cruzi* (vertical), puede llevar consigo serias complicaciones para el feto y para el recién nacido, estas complicaciones pueden colocarse en tres categorías clínicas: enfermedad severa con gran probabilidad de muerte neonatal, nacimiento aparentemente sano con progresión sintomática en las primeras semanas a meses de nacido y enfermedad asintomática con riesgos de paso a fase crónica de Chagas años más tarde.<sup>13,14</sup>

Los fármacos utilizados contra la enfermedad de Chagas son reducidos, costosos y producen muchos efectos adversos.<sup>15,16</sup> Estos fármacos son especialmente eficaces en la fase aguda de la enfermedad obteniendo una reducción de la parasitemia de hasta un 90%,<sup>17</sup> estos tratamientos son mucho menos efectivos en la fase crónica de la enfermedad, por este motivo es importante el control de la enfermedad cuando aún está en fase aguda, es decir, recién nacidos que han adquirido la enfermedad por vía congénita.<sup>18</sup> Se han descrito diversas pruebas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas, entre ellas están las pruebas que nos permiten detectar parasitemia, como el micro-hematocrito y las pruebas de biología molecular. Las pruebas con mayor sensibilidad para evidenciar los niveles de parasitemia de una mujer embarazada, son las pruebas de biología molecular, siendo su uso restringido para muchas zonas endémicas de países en vías de desarrollo, debido a que son pruebas de alto costo que necesitan una infraestructura compleja y personal altamente capacitado.<sup>19,20</sup> La enfermedad de

Chagas está asociado a pobreza, siendo las zonas rurales de clima tropical las más afectadas por esta enfermedad.<sup>21</sup> Entonces es necesario desarrollar nuevas pruebas para lograr predecir la enfermedad de Chagas congénito, que requieran de menor infraestructura, capacitación de personal para realizarlas, por ende, que sean de menor costo en comparación con las pruebas de biología molecular, para que de esta manera se logre mejorar el diagnóstico en las poblaciones más afectadas y también sea posible dar un tratamiento temprano a las personas enfermas, evitando complicaciones futuras.

En el presente estudio se utilizó datos de carga parasitaria de *T. cruzi* medido a través de la técnica de q-PCR (prueba de biología molecular), y también datos de isotipos de anticuerpos IgG medidos por ELISA para lograr determinar la correlación entre la carga parasitaria y los isotipos de anticuerpos IgG, de esta manera se analiza un grupo de pruebas de ELISA para establecer una prueba alternativa que nos permita predecir la transmisión congénita de Chagas con la misma eficacia de las pruebas moleculares.

## **2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1. Planteamiento del problema**

Estudios han determinado los niveles de parasitemia o carga parasitaria en mujeres embarazadas mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR), en dichos estudios se ha demostrado que la mayor carga parasitaria está asociada a la transmisión congénita de Chagas.<sup>22</sup> Esto nos da a conocer que la parasitemia juega un rol fundamental al tratar de entender más acerca de la enfermedad de Chagas y sus modos de transmisión.

Las técnicas moleculares no son accesibles en las áreas rurales de países en vías de desarrollo y pueden no ser realizadas de manera óptima.<sup>23</sup> Si bien, los métodos moleculares como el q-PCR tienen una mayor sensibilidad que los métodos de observación microscópica (micro-hematocrito), sin embargo, el acceso a la prueba de q-PCR está limitado por el costo de la prueba, el equipamiento que se necesita para ser realizada y la alta capacitación que el personal técnico debe tener. Además, existe una reducida cantidad de pruebas que pueden ser utilizadas para predecir la transmisión congénita de enfermedad de Chagas.

La asociación que existe entre la enfermedad de Chagas y la pobreza (siendo las zonas empobrecidas, las más afectadas por Chagas), nos sugiere que en muchos lugares con alta prevalencia de Chagas, las personas no pueden acceder a los métodos de diagnóstico moleculares de la enfermedad de Chagas, por ende, las mujeres no pueden realizarse la prueba (q-PCR) para estimar probabilidad de transmitir o no transmitir la enfermedad de Chagas por vía congénita hacia sus niños. Esto puede provocar un sub-diagnóstico de la enfermedad de Chagas en los niños, ya que en los países en vías de desarrollo no es rutinario realizar pruebas específicas (q-PCR) sin evidencia clínica que sustente dicho gasto (solo se realizan pruebas con baja sensibilidad), para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en los niños.

Esto hace que haya niños con la enfermedad de Chagas transmitidos por vía congénita, que no han sido diagnosticados con dicha enfermedad, y solo algunos son alertados de la enfermedad de Chagas cuando empiezan los síntomas, es decir, cuando se presentan las complicaciones de la misma enfermedad.

## **2.2. Justificación**

Los métodos de diagnóstico molecular (PCR cuantitativo), nos permiten cuantificar la carga parasitaria y con esto aproximarnos a predecir una transmisión congénita de Chagas.<sup>11</sup> La desventaja de estos métodos es que no son aplicables en zonas endémicas, dado que tienen elevados costos y es necesario capacitación explícita para desarrollar estas técnicas.<sup>24,25</sup> Por este motivo, se plantea desarrollar una prueba de bajo costo que nos permita predecir la transmisión congénita de Chagas con la misma eficacia que la prueba de q-PCR. De esta manera, se pretende ampliar la cantidad de pruebas que pueden ser utilizadas para predecir la transmisión congénita de Chagas.

En muchos estudios se ha analizado los niveles de parasitemia y la progresión de la enfermedad mediante modelos experimentales. Aunque nombran a los anticuerpos que intervienen en la respuesta inmune, no muestran un panorama claro acerca del comportamiento de los isotipos de anticuerpos (isoformas o subclases). Esto es debido a que los modelos experimentales usados pueden no reflejar con exactitud la situación de isotipos en humanos.<sup>26</sup>

Otros estudios han intentado mostrar la relación que existe entre el nivel de los isotipos de anticuerpos IgG y la infección por *Trypanosoma cruzi*, mostrando un predominio de IgG3, pero en este contexto no se ha explorado la posibilidad de que el nivel de parasitemia esté correlacionado directamente con el nivel de isotipos encontrado.<sup>27</sup>

La existencia de correlación entre el nivel de un determinado isotipo de anticuerpo y la parasitemia por *T. cruzi* nos ayudaría a estimar el nivel de parasitemia a través de una simple prueba de ELISA para isotipos anticuerpos, esto reduciría los costos de detección de carga parasitaria y sería igualmente

efectivo para determinar el riesgo de transmisión congénita de Chagas mediado por niveles altos carga parasitaria.

El presente estudio fue realizado para determinar la correlación entre la carga parasitaria por *Trypanosoma cruzi* y los niveles de isotipos de anticuerpos IgG en una población de mujeres que asistieron a un hospital pediátrico a cuidar a sus niños enfermos, en la ciudad de Santa Cruz-Bolivia, 2017.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1909 por un investigador de Brasil llamado Carlos Chagas.<sup>28</sup> La enfermedad de Chagas ha cambiado de ser una enfermedad enzootia, es decir, reducida a un determinado territorio, ahora es una zoonosis parasitaria bien conocida que ha podido extenderse en muchos territorios, debido a que las personas han expandido geográficamente su hábitat, tomando parte de las zonas selváticas donde naturalmente se encontraba.<sup>29</sup> El parásito es transmitido al humano principalmente por vía vectorial, en la cual se produce cuando las heces del vector (Triatomino), entran en contacto con el sitio de alimentación del insecto. Sin embargo, además de la transmisión vectorial, también la transmisión puede darse por transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y vía congénita. Además, existe la transmisión por vía oral y modelos experimentales citan una posible transmisión sexual.<sup>30,31</sup>

#### **3.2. Ciclo Biológico de *Trypanosoma cruzi***

El vector de la enfermedad de Chagas es un insecto de la subfamilia *Triatominae*. Éste es un insecto hematófago, inicia el complejo ciclo biológico alimentándose de un animal o humano que contiene parásitos circulantes en la sangre, los parásitos que el vector absorbe están en la forma de trypomastigote, al ingresar los parásitos en el vector, se transforman en epimastigotes, esta forma está únicamente asociada a los estadios dentro del vector (dado que no hay evidencia suficiente para creer que existe esta forma en los humanos), los epimastigotes atraviesan el intestino medio del triatomo, en la forma de epimastigote el parásito es capaz de reproducirse al formar conglomerados llamados rosetas y en amastigotes. Luego el parásito migra hacia la porción intestinal posterior donde se transforma en trypomastigote metacíclico, en este punto ya se encuentran grandes cantidades del parásito (en su forma infectante), en las heces del vector. De esta manera finalizan las transformaciones en el vector.<sup>32,33</sup>

Los estadios en el humano tienen su inicio cuando el vector infectado se alimenta de la sangre del humano, al alimentarse, el vector defeca, este proceso produce un ligero prurito en el humano, por ende, el humano tiende a frotar rápidamente esa área y de esa manera contamina el sitio donde el vector se alimentó, con las deposiciones del mismo, esto hace que los trypomastigotes logren ingresar al torrente sanguíneo humano.<sup>34</sup> Cuando los trypomastigotes se encuentran en la circulación sanguínea humana, son capaces de ingresar en todas las células nucleadas (todas las células del sistema inmune que intentan fagocitar a los parásitos), al ingresar en las células los trypomastigotes se transforman en amastigotes, para evitar que los mecanismos fagocíticos celulares logren destruirlo. La forma de amastigote es la principal forma de reproducción,

entonces dentro de la célula los amastigotes se reproducen de manera exponencial y al mismo tiempo evitan que la célula los destruya, luego de haberse reproducido, los amastigotes se transforman nuevamente en trypomastigotes, en este punto los trypomastigotes segregan sustancias que producen un debilitamiento de la membrana celular, entonces de esta manera, los trypomastigotes son capaces de lisar la célula y ser liberados al torrente sanguíneo, donde nuevamente podrán ingresar en otras células, reproducirse como amastigotes, lisar la célula como trypomastigotes y volver al torrente sanguíneo. El vector se alimenta de la sangre la sangre humana con trypomastigotes y los absorbe, de este modo se cumple el ciclo biológico.<sup>35</sup> (Figura 1)

### **3.3. Fase aguda y Fase crónica de la enfermedad de Chagas**

En la enfermedad de Chagas se pueden observar dos fases de la enfermedad, la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda comienza de 1–2 semanas después de la infección inicial con el parásito, es una fase caracterizada por la presencia de parásitos en sangre con fácil identificación a través de observación microscópica de la sangre, pruebas serológicas o moleculares, esta fase es definida por la presencia de anticuerpos de tipo IgM en la sangre de las personas infectadas, el 95% de los casos de Chagas en fase aguda son asintomáticos, pero en el 5% de los casos puede presentar uno o más de los siguientes síntomas: fiebre, malestar, somnolencia, dolor muscular y articular, miocarditis, meningoencefalitis, hepatomegalia, signo de Romaña y el nódulo Chagoma.<sup>36</sup> Usualmente la fase aguda de Chagas cede de manera espontánea y las complicaciones en esta fase,



no son comunes, tiene una mortalidad estimada de 1:2500 a 1:5000 que se da en pacientes con miocarditis o meningoencefalitis.<sup>37</sup> La fase crónica de la enfermedad de Chagas comienza mucho tiempo después de la infección inicial, en esta fase los parásitos pueden estar circulando en sangre de las personas infectadas en bajas cantidades o pueden estar localizados en algún órgano específico, comprende afecciones cardiacas como la miocardiopatía, y afecciones digestivas como megacolon, estas son consideradas como complicaciones de la enfermedad de Chagas. La miocardiopatía chagásica está presente en alrededor de 30% de los individuos que son seropositivos para Chagas. El megacolon está presente en aproximadamente el 10% de los individuos seropositivos para Chagas siendo los síntomas principales: constipación y disfagia.<sup>38,39</sup> Cuando el individuo seropositivo permanece asintomático después de la fase aguda, se le puede considerar como un paciente en fase indeterminada.<sup>2</sup>

### **3.4. Diagnóstico**

El diagnóstico para la enfermedad de Chagas se realiza mediante diversas pruebas, entre ellas están las pruebas serológicas, pruebas de biología molecular y pruebas microscópicas.<sup>12</sup> Las pruebas utilizadas como estándar de oro para diagnosticar la enfermedad de Chagas en niños (transmitida por vía congénita), es la prueba de micro-hematocrito y también el PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) ya que la enfermedad se encuentra en fase aguda y por este motivo los parásitos son fácilmente detectados en la sangre de los individuos infectados, sin embargo para diagnosticar la enfermedad de Chagas en adultos el estándar de

oro son las pruebas serológicas, debido a que la detección de parásitos en sangre no es muy efectiva, esto se debe a que el parásito ya no es encontrado en grandes cantidades en la sangre (ver 3.3. Fase aguda y Fase crónica), entonces la prueba de PCR no es la opción con mayor sensibilidad.<sup>40</sup> Las pruebas serológicas miden los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* presentes en el suero de los individuos infectados, las norma internacionales estipulan que es necesario al menos 2 de 3 pruebas serológicas positivas para dar un diagnóstico positivo de Chagas. Entre las pruebas serológicas podemos citar: Prueba rápida para Chagas, Hemaglutinación indirecta (HAI), ELISA, IFI, TESA-Blot, RIA.<sup>41</sup>

#### **3.4.1. Prueba rápida para Chagas**

Es una prueba inmunocromatográfica rápida realizada en tiras de nitrocelulosa, que nos permite llevar a cabo la detección cualitativa de anticuerpos IgG humanos anti-*Trypanosoma cruzi*. Esta prueba puede realizarse en sangre total o también en suero obteniendo resultados similares. La prueba desarrollada con sangre o suero, solo utiliza 5 ul de muestra, después se añade 1 gota de buffer de proteína A “Gold solution”, se espera 5 minutos y finalmente se coloca el Chase buffer que nos revelará la reacción pasados los 15 minutos de interacción. Esta metodología de trabajo ha sido estandarizada, el kit utilizado ha sido evaluado en estudios anteriores y se ha demostrado que es uno de los mejores kits de prueba rápida para Chagas existentes en el mercado con una sensibilidad y especificidad de 99.3% y 96.9% respectivamente.<sup>42,43</sup>

#### **3.4.2. ELISA recombinante para detección de *T. cruzi***

Es una prueba cuantitativa para detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* humanos, primeramente se realiza una dilución 1/200 de la muestra de cada individuo en el soporte de 96 pocillos donde se encuentran inmovilizados los antígenos recombinantes, estos han sido obtenidos mediante recombinación de proteínas específicas de epimastigotes y trypomastigotes. Si la muestra contiene anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, entonces se formará un complejo con los antígenos y se quedará unidos al soporte, de otra manera, todos los anticuerpos no específicos serán removidos por los lavados con buffer de lavado. Si hubiese reacción en la primer etapa, entonces el conjugado (un anticuerpo específico contra los anticuerpos anti-*T. cruzi* humano) podrá unirse, y al entrar en contacto con el sustrato enzimático, desarrollará una reacción de color celeste, esta reacción cambiará a color amarillo al ser detenida con ácido sulfúrico 2M. Esta prueba tiene una sensibilidad de 99.3% y especificidad de 98.7%.<sup>44</sup>

### **3.4.3. Inmunoblot para *T. cruzi* (TESA-Blot)**

Es una técnica confirmatoria de la infección por *T. cruzi*, que utiliza el antígeno excretorio/secretorio de trypomastigotes (TESA), para lograr capturar anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* que están presentes en las personas infectadas por el mencionado parásito. Estas proteínas antigénicas son colocadas en un gel de poliacrilamida mediante la técnica de electroforesis de proteínas, para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa por inmuno-electro-transferencia de proteínas. Se recorta la membrana de nitrocelulosa en forma de tiras y luego se pone en contacto con el suero del paciente sospechoso de la

enfermedad de Chagas. Se añade un conjugado anti-IgG humana La reacción con DAB es detenida con abundante agua destilada. El diagnóstico se interpreta como positivo al observarse una banda de peso molecular aproximado de 150-160 K.D., correspondiente a la banda TESA.<sup>45</sup>

#### **3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para *T. cruzi***

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR) es una prueba de biología molecular en la cual se extrae el material genético del parásito que se encuentra en la sangre de los individuos con Chagas, se amplifica el ADN del parásito utilizando enzimas de replicación además de otros componentes necesarios como nucleótidos y moléculas cebadores, obteniendo múltiples copias del ADN y haciendo posible la detección de la enfermedad de Chagas al comparar con una curva estándar que nos dirá el número de parásitos por ml de muestra dado el ADN encontrado, este procedimiento se realiza en un equipo llamado termociclador.<sup>46</sup> Se han desarrollado muchas pruebas de q-PCR para lograr mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, también se han realizado comparaciones entre las pruebas de diagnóstico de uso habitual y el q-PCR, obteniendo mejores resultados del q-PCR en la fase aguda de la enfermedad.<sup>47</sup>

### **3.5. Tratamiento**

Existe una gran variedad de tratamientos antiparasitarios, pero solo unos pocos fármacos son efectivos contra el parásito *T. cruzi*. Los fármacos utilizados en el tratamiento para la enfermedad de Chagas, son el benznidazol y el nifurtimox, ambos tratamientos son muy efectivos en la fase aguda de la enfermedad, pero poco efectivos en la fase crónica de la enfermedad, además, son considerados altamente tóxicos.<sup>48,49</sup> En diversos estudios se ha demostrado que el tratamiento con benznidazol no reduce el riesgo de muerte en personas con miocardiopatía Chagásica.<sup>18</sup>

### **3.6. Inmunidad frente a *Trypanosoma cruzi***

La respuesta del organismo ante la infección por *T. cruzi*, es innata y adaptativa. Esta respuesta es desencadenada en etapas tempranas de la infección e incluye un gran número de células, tales como: macrófagos, monocitos, células dendríticas, células natural killer, linfocitos T y B.<sup>50</sup> Si bien la respuesta innata es la primera en actuar frente a la infección, esta respuesta parece no ser suficiente para lograr eliminar al parásito, por este motivo es que los pacientes pueden llegar a la fase crónica de Chagas.<sup>51</sup> La respuesta adaptativa del organismo es mediada por los linfocitos T y B principalmente, se ha demostrado que la respuesta mediada por linfocitos T es inhibida por acción de *T. cruzi*, esto puede deberse a una baja expresión de IL-2 inducida por el parásito.<sup>52</sup> La respuesta mediada por linfocitos B incluye la producción de diversos tipos de anticuerpos, con diferentes funciones y tiempos de aparición en las enfermedades infecciosas. Entre los anticuerpos producidos se encuentran, IgM apareciendo en la fase aguda de la enfermedad, IgG que se encuentra en la fase

crónica de la enfermedad, IgA asociada a la enfermedad digestiva de Chagas, y aunque también se producen la IgE e IgD, no se ha demostrado la importancia de estos anticuerpos en la enfermedad de Chagas.<sup>53</sup>

Los anticuerpos de tipo IgG son de mucha utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, siendo su detección, la más importante en las pruebas de diagnóstico actuales para la enfermedad crónica de Chagas (ver 3.4. Diagnóstico). Existe diferentes isotipos o subclases de anticuerpos IgG, entre ellos podemos citar: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4; estos isotipos de anticuerpos son encontrados en diferentes proporciones según la fases o etapas de las enfermedades, se han realizado diferentes estudios intentado definir cuáles son las proporciones de isotipos de anticuerpos presentes en la enfermedad de Chagas, sin embargo, los resultados de dichos estudios son diversos y no concluyentes.<sup>53,54</sup>

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar la correlación entre la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* y los niveles de isotipos de anticuerpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3) en mujeres que asistieron al Hospital de niños de Santa Cruz-Bolivia en el 2017.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar la correlación entre la carga parasitaria y los niveles de isotipos de anticuerpos.

- Determinar la asociación entre variables demográficas y los niveles de anticuerpos.
- Establecer la relación de los isotipos de anticuerpos en el diagnóstico de Chagas.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Diseño del estudio**

El presente, es un estudio de base de datos secundaria que tiene un diseño transversal, en el cual se comparó los datos de niveles de isotipos de anticuerpos IgG evaluados por ELISA, los niveles de parasitemia evaluados por q-PCR y factores demográficos de las personas enroladas en un estudio previo.

### **5.2. Población**

La población de estudio es un grupo de madres que acudieron al Hospital niños “Mario Ortiz Suárez” de Santa Cruz, Bolivia en el año 2017, a visitar a sus niños enfermos e internados (por cualquier patología diferente de Chagas). Estas personas se encontraron en la fase indeterminada de Chagas debido a que son personas adultas sin ningún síntoma asociado a la etapa crónica de Chagas.

### **5.3. Muestra**

Se seleccionó una muestra de 463 madres enroladas en un estudio previo. Las participantes son madres que asistieron al hospital de niños de Santa Cruz, Bolivia entre el mes de diciembre del año 2016 y el mes de octubre del año

2017. Estos datos fueron otorgados por los investigadores del estudio previo, para desarrollar el presente estudio.

#### **5.4. Operacionalización de variables**

Las variables utilizadas para realizar los análisis del presente estudio corresponden a datos de la encuesta epidemiológica y análisis de laboratorio realizados a los sujetos durante su participación en un estudio previo, del cual fueron extraídos los datos para ser utilizados en el presente estudio. (Ver anexo 1)

#### **5.5. Procedimientos y técnicas efectuadas en el estudio previo**

Las muestras de sangre fueron tomadas mediante punción venosa por un personal entrenado en el procedimiento. Y dichas muestras fueron separadas en suero-coágulo mediante centrifugación a 2500 rpm. Durante 10 minutos, almacenadas a temperatura de -20 grados centígrados y enviadas a UPCH manteniendo la cadena de frío correspondiente.

Las pruebas biológicas fueron procesadas en el Laboratorio de Investigación de Enfermedad Infecciosas (LID-UPCH) siguiendo con los protocolos para pruebas de diagnóstico de Chagas; Inbios Chagas Detect Plus, TESA-Blot, y ELISA recombinante V3.0 Wiener, estas pruebas ya han sido anteriormente validadas y utilizadas en diversos estudios.<sup>55</sup> Al momento de procesar las muestras, se consideró como Chagas Positivo, aquellas muestras que tuvieron 2 de 3 pruebas positivas (criterio internacionalmente aceptado).<sup>40</sup>



Las pruebas de ELISA para isotipos de anticuerpos IgG fueron estandarizadas en el laboratorio de investigación de enfermedades infecciosas, por el equipo de investigación del área de inmunología, utilizando diferentes concentraciones de antígeno TESA obtenido mediante cultivos celulares de trypomastigotes, también se utilizaron diversas diluciones de pools de sueros positivos y negativos para la enfermedad de Chagas obtenidos de un bio-repositorio de muestras, finalmente se probaron diferentes diluciones de anticuerpos secundarios específicos para cada isotipo de anticuerpo (Mouse anti-human IgG1 Fc, Secondary antibody, HRP-Thermofisher; Mouse anti-human IgG2, HRP-Conjugate, Invitrogen; Mouse anti-human IgG3 Heavy chain Secondary antibody, HRP-Thermofisher).

Para validar las pruebas de ELISA se procesaron un total de 45 muestras de manera independiente por dos investigadores especializados obteniendo un promedio de coeficiente de variación de 8%. Los procedimientos de cada ELISA para isotipos de anticuerpos IgG fueron realizados en el estudio primario, pero al no estar publicados, se describirá a detalle estos procedimientos.

### **5.5.1. ELISA para detección de anticuerpos IgG1**

El procedimiento para la detección de anticuerpos IgG1 fue realizado en placas de ELISA de tipo Immulon 1B, se colocó 100ul de antígeno TESA con dilución de 0.5ug/ml en buffer bicarbonato para cada pocillo de la placa y se dejó en movimiento rotatorio durante toda la noche (13–15 horas), luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de buffer fosfato salino con 0.05% de Tween 20 (solución de lavado), al terminar estos lavados se procedió a bloquear

las proteínas inespecíficas colocando 200ul/pocillo de solución de lavado suplementada con 5% de leche descremada (solución de bloqueo), esto fue incubado 1 hora a 37 grados centígrados, luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul de solución de lavado para luego proceder a colocar 100ul de la muestra de cada individuo por pocillo, en una dilución 1/100 con solución de lavado suplementada con 1% de leche descremada (solución diluyente), para este procedimiento se incubó la muestra durante 1 hora y 30 minutos a 37 grados centígrados, después se procedió a lavar la placa 5 veces con 200ul/pocillo de solución de lavado, luego se añadió 100ul/pocillo de dilución 1/1000 de conjugado anti-IgG1 humana en solución diluyente, se dejó incubando por 1 hora a 37 grados centígrados, luego se realizaron por última vez 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, finalmente se procedió a revelar la reacción con 100ul/pocillo de TMB-peróxido y después de 20 minutos se detuvo la reacción con 50ul/pocillo de ácido sulfúrico 2M.

Los resultados fueron evidenciados en un lector de ELISA a 450nm de longitud de onda y 22-24 grados centígrados de temperatura.

### **5.5.2. ELISA para detección de anticuerpos IgG2**

El procedimiento para la detección de anticuerpos IgG2 fue realizado en placas de ELISA de tipo Immulon 1B, se colocó 100ul de antígeno TESA con dilución de 1.0ug/ml en buffer bicarbonato para cada pocillo de la placa y se dejó en movimiento rotatorio durante toda la noche (13–15 horas), luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, al terminar estos lavados se procedió a bloquear las proteínas inespecíficas colocando

200ul/pocillo de solución de bloqueo, esto fue incubado 1 hora a 37 grados centígrados, luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul de solución de lavado para luego proceder a colocar 100ul de la muestra de cada individuo por pocillo, en una dilución 1/100 con solución diluyente, para este procedimiento se incubó la muestra durante 1 hora a 37 grados centígrados, después se procedió a lavar la placa 5 veces con 200ul/pocillo de solución de lavado, luego se añadió 100ul/pocillo de dilución 1/1000 de anticuerpo secundario, anti-IgG2 humana en solución diluyente, se dejó incubando por 1 hora a 37 grados centígrados, después se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, finalmente se procedió a revelar la reacción con 100ul/pocillo de TMB-peróxido y después de 20 minutos se detuvo la reacción con 50ul/pocillo de ácido sulfúrico 2M.

Los resultados fueron evidenciados en un lector de placas de ELISA a 450nm de longitud de onda y 22-24 grados centígrados de temperatura.

### **5.5.3. ELISA para detección de anticuerpos IgG3**

El procedimiento para la detección de anticuerpos IgG3 fue realizado en placas de ELISA de tipo Immulon 1B, se colocó 100ul de antígeno TESA con dilución de 2.0ug/ml en buffer bicarbonato para cada pocillo de la placa y se dejó en movimiento rotatorio durante toda la noche (13–15 horas), luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, al terminar estos lavados se procedió a bloquear las proteínas inespecíficas colocando 200ul/pocillo de solución de bloqueo, esto fue incubado 1 hora a 37 grados centígrados, luego se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul de solución

de lavado para luego proceder a colocar 100ul de la muestra de cada individuo por pocillo, en una dilución 1/100 con solución diluyente, para este procedimiento se incubó la muestra durante 1 hora y 30 minutos a 37 grados centígrados, después se procedió a lavar la placa 5 veces con 200ul/pocillo de solución de lavado, luego se añadió 100ul/pocillo de dilución 1/1000 de anticuerpo secundario conjugado anti-IgG3 humana con biotina en solución diluyente, se dejó incubando por 1 hora a 37 grados centígrados, después se realizaron 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, se procedió a colocar un conjugado de estrepto-avidina con dilución 1/500 en solución diluyente y se dejó incubando 1 hora a 37 grados centígrados, luego se procedió a realizar 5 lavados de toda la placa con 200ul/pocillo de solución de lavado, finalmente se procedió a revelar la reacción con 100ul/pocillo de TMB-peróxido y después de 5 minutos se detuvo la reacción con 50ul/pocillo de ácido sulfúrico 2M.

Los resultados fueron evidenciados en un lector de placas de ELISA a 450nm de longitud de onda y 22-24 grados centígrados de temperatura.

## **5.6. Consideraciones éticas**

El presente estudio es un análisis secundario de datos, por lo que no se tuvo contacto alguno con sujetos humanos. En tal sentido, los posibles riesgos para los sujetos del análisis son mínimos, y están relacionados principalmente a una brecha en la confidencialidad.

Este protocolo se registró en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de

Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución. Durante la implementación del estudio se respetó los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se siguió estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

### **5.7. Plan de análisis**

Previo al análisis estadístico se procedió a normalizar los datos de todos los isotipos de anticuerpos, llevando los datos de densidad óptica (O.D.), hasta un ratio normalizado de absorbancia (N.A.R.), esto se realizó dividiendo el O.D. de cada individuo con el respectivo O.D. de la muestra utilizada como control negativo en cada placa, de esta manera se pretende reducir la variabilidad entre placas de ELISA realizadas. Este procedimiento, ya ha sido utilizado con éxito en estudios anteriores.<sup>56</sup>

En el análisis de datos, se procedió con la descripción de las variables en estudio para explicar la posible asociación entre las mismas. Antes de empezar a evaluar la asociación de las variables en un análisis bivariado, se decidió colapsar categorías de la variable de nivel de educación, determinando que la mejor forma de representar las diferencias entre la educación de los participantes es tomando en cuenta si completaron o no, la educación secundaria. Además fue necesario agrupar las categorías de las variables de nivel socioeconómico en número de artículos que posee cada participante, para que de esta manera la variable que represente mejor el estado socioeconómico de los participantes. La edad de las participantes, fue dividida en tres categorías utilizadas en estudios anteriores para mostrar el efecto de la edad sobre las variables en estudio.<sup>12</sup>

En el análisis bivariado se evaluó la asociación de las variables mediante pruebas estadísticas como correlación de Spearman entre las variables numéricas, un análisis estratificado, prueba t-Student y ANOVA de una vía, también se procedió a evaluar la posible significancia de las variables que funcionan como confusores pero finalmente se decidió ajustar por las variables con asociación teórica a las variables principales, se utilizó un análisis de regresión multivariada para numerosos desenlaces correlacionados y de esta manera lograr cuantificar la diferencia del nivel de los isotipos de anticuerpos entre los grupos de resultado de q-PCR, además se realizó un análisis ROC para observar cuál de los ELISA para isotipos de anticuerpos es el que más se aproxima a poder diagnosticar la enfermedad de Chagas de la misma manera que lo hacen 2 de 3 pruebas de diagnóstico (prueba estándar), estas pruebas estadísticas fueron realizadas usando el programa estadístico Stata V.14.0. (College Station, TX)

## **6. RESULTADOS**

Dentro de las características principales de la población en estudio (ver tabla 1), se puede observar que a pesar de que el 69.96% de las madres responden que han tenido contacto con el vector de la enfermedad de Chagas en algún momento de su vida, sin embargo, se puede evidenciar que solo el 14.25% son seropositivas a Chagas. Al analizar las variables de laboratorio se encuentra que el qPCR para Chagas tuvo únicamente 3.46% de positividad en los individuos analizados, estos son valores muy inferiores a los encontrados en las pruebas serológicas. Se utilizó una transformación logarítmica de la carga parasitaria

para lograr compactar la distribución de los datos, ya que los valores se encontraban muy dispersos, esta transformación de la carga parasitaria ya ha sido utilizada con éxito en estudios anteriores.<sup>49</sup>

Al explorar asociación en el análisis bivariado, solo se seleccionó a las personas que tuvieron diagnóstico serológico positivo (ver tabla 2), en el análisis se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de IgG1, entre las personas que tuvieron q-PCR positivo respecto a las personas que tuvieron q-PCR negativo ( $p < 0.01$ ), también se logra evidenciar una asociación significativa de los isotipos IgG2, IgG3 de anticuerpos en las personas que reportan haber sido diagnosticadas con Chagas en el pasado comparado con las que reportan no haber sido diagnosticadas en el pasado ( $p < 0.05$ ), además estos mismos isotipos (IgG2, IgG3) se encuentran asociados a las personas que reportan tener un familiar que padece la enfermedad de Chagas ( $p < 0.05$ ).

También se realizó un análisis de datos para comprobar posibles efectos de factores confusores mediante una regresión multivariada para desenlaces correlacionados (ver tabla 3) en la cual se observa que la diferencia de los isotipos IgG1 en personas con q-PCR positivo y los isotipos IgG1 en personas con q-PCR negativo es 0.52 unidades N.A.R., esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ), en los isotipos IgG2, IgG3 no se encuentra diferencia entre los valores encontrados en las personas q-PCR positivo respecto a las personas q-PCR negativo ( $p > 0.05$ ). Estos resultados muestran las diferencias que existen entre los isotipos de anticuerpos de personas seropositivas pero con diferentes resultados de q-PCR (ver Figura 2).

Se analizó mediante el área bajo la curva (AUC) del análisis ROC (Receiver Operating Characteristic), para estimar cuál de los isotipos de anticuerpos IgG, es que mejor representa el diagnóstico de Chagas realizado por 2 de 3 pruebas serológicas, en este sentido, se obtuvo los siguientes resultados: i) para el isotipo IgG1, AUC: 0.98 (IC95%: 0.95 – 1.00), ii) para el isotipo IgG2, AUC: 0.88 (IC95%: 0.83 – 0.94), iii) para el isotipo IgG3, AUC: 0.78 (IC95%: 0.70 – 0.86); se comprobó que todos los isotipos de anticuerpos analizados tuvieron áreas bajo la curva estadísticamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ), además los resultados sugieren que el isotipo IgG1 es el que mejor se relaciona con el diagnóstico serológico de Chagas entre los isotipos IgG analizados (ver Figura 3).

En los resultados de correlación de la carga parasitaria con los isotipos de anticuerpos IgG, se obtuvieron los siguientes resultados: i) en los niveles de IgG1, se evidencia correlación monótonica negativa con el logaritmo de la carga parasitaria ( $\rho = -0.54$ ,  $p = 0.04$ ). ii) con los niveles de IgG2, no se encontró correlación monótonica estadísticamente significativa con el logaritmo de la carga parasitaria ( $\rho = -0.21$ ,  $p = 0.45$ ), iii) con respecto al isotipo IgG3, no se observa correlación monótonica estadísticamente significativa ( $\rho = 0.14$ ,  $p = 0.63$ ).

## **7. DISCUSIÓN**

Al analizar a las personas que reportan haber tenido contacto con el vector, se observó que únicamente el 18.71% de las mismas resultaron seropositivas a Chagas, en este sentido, la alta proporción de personas que reporta haber tenido contacto con el vector, podría deberse a que los individuos en estudio confunden



al vector de la enfermedad de Chagas con otro insecto de características similares, esto pudo ocasionar que el auto-reporte de contacto con el vector se haya visto sobrestimado. Se sugiere esta falla en el auto-reporte debido a que en estudios previos se ha observado poblaciones similares que reportan haber estado expuestos al vector de Chagas, más de 50% de las personas resultaron seropositivas.<sup>57</sup>

Este estudio demuestra que la respuesta inmune mediada por los isotipos de anticuerpos, se incrementa de manera significativa al tener parásitos en la sangre, pero no es directamente proporcional los niveles de anticuerpos con la cantidad de parásitos en sangre. Sin embargo, el isotipo IgG1 presentó una débil correlación negativa con la carga parasitaria del participante, eso sugiere que las mujeres que tienen respuesta inmune reducida debido a tratamientos farmacológicos, exposición a radiación o embarazo, podrían tener un aumento de parásitos en la sangre, lo cual a su vez aumentaría la probabilidad de transmisión congénita de Chagas. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios observando mujeres con la respuesta inmune reducida para entender mejor la relación entre la carga parasitaria y los isotipos de anticuerpos IgG. Debe entenderse que los datos obtenidos en el estudio son pocos (n=463), también esos datos son fuertemente reducidos por la baja prevalencia de Chagas (14.25%) comparado con estudios anteriores realizados en poblaciones similares, y los datos fueron aún más reducidos por la sensibilidad que ha tenido la prueba utilizada para medir carga parasitaria (q-PCR, S=24.28% con respecto a Serología para Chagas), esto hace que el cálculo de correlación de Spearman no hayan sido efectuados con alta potencia estadística. En estudios anteriores ha

sido realizado el análisis de correlación con baja potencia estadística, sin afectar en gran manera a los resultados observados.<sup>58</sup>

Se observa que la diferencia entre los valores de IgG2 de personas que reportan tener un familiar con Chagas menos los valores de IgG2 en las personas que reportan no tenerlo, es 0.57 unidades N.A.R. ( $p=0.03$ ), y para el isotipo IgG3 esta diferencia es de 1.08 ( $p=0.03$ ). Empero, al realizar un ajuste por nivel de educación y estatus socioeconómico (considerados como factores confusores) esta asociación desaparece ( $p>0.05$ ), esto nos dice que la asociación entre tener un familiar con Chagas y los niveles de IgG2 se debía a un efecto confusor mediado por otras variables. En estudios anteriores también se ha observado el efecto confusor que pueden producir las variables de educación y estatus socioeconómico.<sup>59</sup>

Después de realizar el ajuste por confusores en la regresión multivariada, se observa que desaparece la asociación existente entre el nivel de IgG3 y el reporte de diagnóstico anterior de Chagas, sin embargo, la asociación entre el nivel de IgG2 y el reporte de diagnóstico anterior de Chagas, se mantiene incluso después del ajuste, entonces es posible afirmar que la diferencia real entre los valores de IgG2 en personas que fueron anteriormente diagnosticadas con Chagas menos los valores de IgG2 en personas que no recibieron diagnóstico de Chagas, es 0.79 unidades N.A.R. ( $p<0.05$ ), esto nos sugiere que las personas que han tenido la enfermedad por un largo periodo de tiempo, tienen valores incrementados de anticuerpos de tipos IgG2 en comparación con las personas que han tenido una infección reciente, esto podría sugerir que la respuesta inmune frente a una infección antigua por *T. cruzi*, puede estar siendo mediada principalmente por anticuerpos de tipo IgG2. No obstante, es necesario realizar estudios

longitudinales que evalúen la progresión de los isotipos de anticuerpos en personas infectadas con Chagas.

El análisis de curvas ROC que se utilizó para medir el área bajo la curva de las distintos isotipos de anticuerpos (valores de ratio de absorbancia normalizado), fue realizado tomando la Serología para Chagas como “Estandar de oro”, se decidió trabajar con curvas ROC debido a que nos permite comparar la relación de cada isotipo de anticuerpo IgG con la serología de Chagas, que en este caso nos representa la totalidad de los anticuerpos IgG, esto permitió estimar cuál isotipo de anticuerpo es el que tiene una mayor participación en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Estos resultados sugieren que el isotipo IgG1 es el que guarda mayor relación con el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Entonces es necesario realizar más estudios para explorar el ELISA para isotipos IgG1 como una alternativa a las 2 de 3 pruebas de diagnóstico utilizadas como prueba de oro. Estudios anteriores realizados en patologías diferentes, demuestran que los isotipos de anticuerpos IgG tienen diferente participación en el diagnóstico serológico de una determinada enfermedad.<sup>60</sup>

### **Limitaciones**

El presente estudio está limitado por el uso únicamente de mujeres como población de estudio, esta limitación no afecta en gran manera a los resultados, debido a que estudios anteriores no encuentran diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres con Chagas.<sup>61</sup> También el estudio se encuentra limitado por haber sido realizado únicamente dentro de un hospital, esto reducirá la generalización de los resultados hasta que los mismos solo representen la realidad de la población que asiste a dicho hospital. Además el

estudio está limitado por el tamaño de muestra y también por la prevalencia de Chagas ya que esta fue menor de la esperada, en otros estudios realizados en la misma región pero en años anteriores, se observa mayores prevalencias de la enfermedad de Chagas,<sup>22</sup> entonces es necesario pensar en un sesgo de participación, pero también es necesario considerar que la prevalencia de Chagas en la región mencionada, ha decrecido a través de los años debido a las campañas de prevención y control del programa nacional de Chagas de Bolivia.<sup>62</sup>

Además, el estudio se ve afectado por la limitación de recuerdo, debido a que se les pidió a los participantes que recuerden si alguna vez en su vida han visto al vector de Chagas, esto implica que muchos participantes no hayan podido recordar el suceso aun habiéndolo vivido o que hayan confundido el suceso con otro parecido. También es necesario considerar un sesgo de medición no diferencial de todas las variables de auto-reporte, debido a que las personas pueden mentir o elegir no responder, esto solo afecta a la magnitud de la asociación encontrada en dichas variables, pero no afecta a la dirección de la asociación.

## **8. CONCLUSIONES**

El presente estudio pone en evidencia que en las personas seropositivas a Chagas que se encuentran en fase indeterminada, la presencia de parásitos en sangre está asociada con mayores niveles de anticuerpos de tipo IgG1. Sin embargo, en las personas que presentan parásitos en la sangre, la cantidad de parásitos es inversamente proporcional a los niveles de anticuerpos IgG1, no obstante, se

necesitan estudios con mayor tamaño de muestra y que realicen ajustes por nivel nutricional de las personas, para lograr aclarar la asociación encontrada.

Se observó que las personas que han recibido diagnóstico de Chagas en el pasado, tienen mayores niveles de IgG2, esto sugiere que la infección por *T. cruzi*, con el paso del tiempo, puede estar siendo mediada en mayor proporción por anticuerpos de tipo IgG2. Además se ha logrado evidenciar que el isotipo IgG1 es el que guarda mayor relación con el diagnóstico serológico de Chagas. De esta manera se concluye que realizando un ELISA para detección de anticuerpos IgG1 es posible obtener un resultado igual de bueno al que se obtiene mediante las 2 de 3 pruebas de diagnóstico (prueba de oro).

La prueba de q-PCR utilizada para predecir una transmisión congénita de Chagas, no puede ser reemplazada por un ELISA para detección de isotipos de anticuerpos, debido a que no se evidencia correlación significativa y en algunos casos por su negativa correlación.

## **9. RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar estudios con un muestreo por conveniencia en personas seropositivas para Chagas para evaluar la carga parasitaria y medir diferentes pruebas de diagnóstico serológico que incluyan los isotipos de anticuerpos que estimen con mayor potencia estadística la correlación entre los mismos.

También sería conveniente comparar la sensibilidad y especificidad de las mismas pruebas, de manera individual y conjunta, con el diagnóstico serológico para la enfermedad de Chagas en adultos (estándar de oro actual),

esto podría ayudar a establecer un nuevo estándar de oro para el diagnóstico de Chagas en personas adultos, incrementando la eficiencia del mismo.

También se recomienda desarrollar estudios longitudinales que midan el tiempo de infección de las personas, estimen los niveles de isotipos de anticuerpos a través del tiempo y determinen si los niveles de anticuerpos pueden servir para estimar el tiempo de infección de una persona.

## 10. REFERENCIAS

1. WHO. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis) Factsheet. *WHO* (2008).
2. Longo, D. L. & Bern, C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* **373**, 456–466 (2015).
3. Nguyen, T. & Waseem, M. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. *StatPearls* (2017).
4. Jackson, Y. *et al.* Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of chagas disease among latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
5. Services, H. & States, U. Chagas disease after organ transplantation--Los Angeles, California, 2006. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **55**, 798–800 (2006).
6. Shikanai-Yasuda, M. A. & Carvalho, N. B. Oral transmission of chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 845–852 (2012).
7. Ribeiro, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp. Parasitol.* **162**, 1–6 (2016).
8. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological

- update based on 2010 estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 33–44 (2015).  
doi:10.2147/IBPC.S70402
9. Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388–1402 (2010).
  10. Bern, C., Martin, D. L. & Gilman, R. H. *Acute and Congenital Chagas Disease. Advances in Parasitology* **75**, (Elsevier Ltd., 2011).
  11. Bern, C. *et al.* Congenital Trypanosoma cruzi transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* **49**, 1667–1674 (2009).
  12. Kaplinski, M. *et al.* Sustained Domestic Vector Exposure Is Associated With Increased Chagas Cardiomyopathy Risk but Decreased Parasitemia and Congenital Transmission Risk Among Young Women in Bolivia. *Clin Infect Dis* (2015). doi:10.1093/cid/civ446
  13. Bern, C. & Montgomery, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* **49**, e52-4 (2009).
  14. Torrico, F. *et al.* Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 201–209 (2004).
  15. Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L. & Segovia, M. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev. española Quimioter. publicación Of. la Soc. Española Quimioter.* **24**, 123–6 (2011).
  16. Viotti, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**, 157–163 (2009).
  17. de Andrade, A. L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. *Lancet (London, England)* **348**,

- 1407–13 (1996).
18. Morillo, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1295–1306 (2015).
  19. Diez, C. N., Manattini, S., Zanuttini, J. C., Bottasso, O. & Marcipar, I. Short report: The value of molecular studies for the diagnosis of congenital chagas disease in northeastern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**, 624–627 (2008).
  20. Balouz, V., Buscaglia, C. A. & Aires, B. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv. Parasitol.* 1–45 (2017).  
doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001.Chagas
  21. Bonfante-Cabarcas, R. *et al.* Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi y factores asociados en un área endémica de Venezuela. *Cad. Saude Publica* **27**, 1917–1929 (2011).
  22. Rendell, V. R. *et al.* Trypanosoma cruzi-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: Implications for congenital transmission risk. *PLoS One* **10**, (2015).
  23. Mora, M. C. *et al.* Early diagnosis of congenital Trypanosoma cruzi infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J. Parasitol.* **91**, 1468–1473 (2005).
  24. Kirchhoff, L. V., Votava, J. R., Ochs, D. E. & Moser, D. R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting Trypanosoma cruzi. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1171–1175 (1996).
  25. Duffy, T. *et al.* Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of Trypanosoma cruzi Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
  26. Takehara, H. A., Perini, A., da Silva, M. H. & Mota, I. Trypanosoma cruzi: Role



- of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* **52**, 137–146 (1981).
27. Santos, L. D. S. *et al.* In-house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **45**, 35–44 (2012).
  28. Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**, 159–218 (1909).
  29. Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102 Suppl**, 113–122 (2007).
  30. Messenger, L. A., Miles, M. A. & Bern, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 995–1029 (2015).
  31. de Noya, B. A. *et al.* Description of an oral chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **112**, 569–571 (2017).
  32. Brener, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo* **13**, 171–178 (1971).
  33. Garcia, E. S., Gonzalez, M. S. & Azambuja, P. Biological Factors Involving *Trypanosoma cruzi* Life Cycle in the Invertebrate Vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 213–216 (1999).
  34. Tyler, K. M. & Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **31**, 472–481 (2001).
  35. De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. & Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma*

- cruzi: Host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, (2010).
36. Article, R. Chagas' Disease. (2015). doi:10.1056/NEJMra1410150
  37. Teixeira, A. R. L., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C. & Santos-Buch, C. A. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.* **82**, 788–798 (2006).
  38. Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G. & Espinal, M. South-south cooperation for Chagas disease. *The Lancet* **382**, 395–396 (2013).
  39. Pérez-Molina, J. A. & Molina, I. Chagas disease. *Lancet* **6736**, 1–13 (2017).
  40. CDC. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). *Cent. Dis. Control Prev.* (2014).
  41. Duarte, L. F., Flórez, O., Rincón, G. & González, C. I. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb. médica (Cali, Colomb.* **45**, 61–6 (2014).
  42. Detect, T. C. & Test, P. R. Rapid Test. (2016).
  43. Shah, V. *et al.* Field evaluation of the InBios Chagas detect plus rapid test in serum and whole-blood specimens in Bolivia. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 1645–1649 (2014).
  44. Cétola, V. (Wiener L. /Argentina. recombinante v.3.0. 1–4 (2000). Available at: <http://www.wiener-lab.com.ar>.
  45. Junqueira, A. C. *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital , acute , and chronic Chagas disease . Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital , Acute , . **34**, 2143–2147 (1996).
  46. Avila, H. A. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast

- minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2421–2426 (1993).
47. Seiringer, P. *et al.* Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **88**, 225–232 (2017).
  48. Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., Garcia-Bournissen, F. & Freilij, H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* **127**, e212–e218 (2011).
  49. Martins, T. A. F. *et al.* Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
  50. Dos-Santos, A. L. A., Carvalho-Kelly, L. F., Dick, C. F. & Meyer-Fernandes, J. R. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Experimental Parasitology* **167**, 67–75 (2016).
  51. Albareda, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int. Immunol.* **18**, 465–471 (2006).
  52. Tozetto-Mendoza, T. *et al.* Role of *T. cruzi* exposure in the pattern of T cell cytokines among chronically infected HIV and Chagas disease patients. *Clinics* **72**, 652–660 (2017).
  53. Hernández-Becerril, N., Nava, A., Reyes, P. A. & Monteón, V. M. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch. Cardiol. Mex.* **71**, 199–205 (2001).
  54. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front. Immunol.* **5**, 1–17 (2014).

55. Vercauteren, G. *Anti-trypanosoma cruzi assays: operational characteristics*. World Health Organization (2010).
56. Ramanakumar, A. V. *et al.* Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 791–796 (2010).
57. Salles, N. A. *et al.* Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion* **36**, 969–973 (1996).
58. Vazquez, B. P. *et al.* Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasit. Vectors* **8**, 206 (2015).
59. Lima-Costa, M. F. *et al.* A population-based study of the association between *Trypanosoma cruzi* infection and cognitive impairment in old age (the Bambuí study). *Neuroepidemiology* **32**, 122–128 (2009).
60. Grimm, F., Maly, F. E., Lü, J. & Llano, R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 613–6 (1998).
61. Medrano-Mercado, N. *et al.* Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 423–430 (2008).
62. Alonso-Vega, C., Billot, C. & Torrico, F. Achievements and Challenges upon the Implementation of a Program for National Control of Congenital Chagas in Bolivia: Results 2004-2009. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).

# **ANEXOS**

## Anexo 1. Operacionalización de variables

Variable	Definición	Valores posibles	Criterios de medición	Escala de medición	Tipo de variable
	Conceptual	Operacional			
<b>Nivel de isotipo de anticuerpo IgG1</b>	Es el resultado de las pruebas de laboratorio realizadas para estimar el nivel de los anticuerpos en estudio	El nivel del isotipo IgG1 es el resultado de la prueba de ELISA en Densidad Óptica (OD).	Los valores son desde 0.00 a 5.00 OD.	Variable numérica continua	La variable es dependiente.
<b>Nivel de isotipo de anticuerpo IgG2</b>	Es el resultado de las pruebas de laboratorio realizadas para estimar el nivel de los anticuerpos en estudio	El nivel del isotipo IgG2 es el resultado de la prueba de ELISA en Densidad Óptica (OD).	Los valores son desde 0.00 a 5.00 OD.	Variable numérica continua	La variable es dependiente.
<b>Nivel de isotipo de anticuerpo IgG3</b>	Es el resultado de las pruebas de laboratorio realizadas para estimar el nivel de los anticuerpos en estudio	El nivel del isotipo IgG3 es el resultado de la prueba de ELISA en Densidad Óptica (OD).	Los valores son desde 0.00 a 5.00 OD.	Variable numérica continua	La variable es dependiente.
<b>Parasitemia por Trypanosoma cruzi</b>	Es el resultado de las pruebas de laboratorio realizadas para estimar el nivel de parasitemia por T. cruzi	La parasitemia (carga parasitaria) por T. cruzi es determinada por el resultado de la prueba de q-PCR.	Los valores podrán ser 0 – 10 <sup>6</sup> parasitos/ml de muestra	Variable numérica continua	La variable es independiente
<b>Edad</b>	Es la edad que tiene el participante al momento de ingresar en el estudio.	Se pregunta al individuo su fecha de nacimiento y desde ahí se calcula la edad.	13-46 años de edad	Variable numérica continua	La variable es independiente
<b>Estatus económico</b>	Es el grado de pobreza del individuo.	Se realiza unas preguntas al individuo y se obtendrá como respuesta artículos que posee/o no posee el individuo.	Los resultados podrán ser: Tiene los 5/4/3/2/1 artículos en su hogar. (Electricidad, Tv., refrigerador, carro, pc.)	Variable categórica nominal	La variable es independiente
<b>Contacto con el vector</b>	Es el hecho de haber visto alguna vez en su vida al vector de Chagas.	Se realiza la pregunta si alguna vez en su vida ha visto en persona al vector	Los resultados podrán ser: Si/No	Variable categórica nominal	La variable es independiente

		de Chagas.			
<b>Nivel de educación</b>	Es el grado académico o de educación del individuo.	Se realiza una pregunta al individuo y se obtendrá como respuesta hasta qué nivel de instrucción académica ha recibido el individuo.	Los resultados podrán ser: primario completo/incompleto, secundario completo/incompleto, universidad, escuela técnica, ninguno.	Variable categórica nominal	La variable es independiente
<b>Miembro de su familia con Chagas</b>	Es el hecho de saber si un familiar suyo ha sido diagnosticado con Chagas.	Se realiza una pregunta al individuo y se obtendrá como respuesta si el participante del estudio tiene algún familiar con la enfermedad de Chagas.	Los resultados podrán ser: Si/No	Variable categórica nominal	La variable es independiente
<b>Chagas diagnosticado anteriormente</b>	Es el hecho de haber recibido un diagnóstico como positivo a Chagas en el pasado.	Se realiza unas preguntas al individuo y se obtendrá como respuesta si ha recibido diagnóstico positivo de Chagas en el pasado.	Los resultados podrán ser: Si/No	Variable categórica nominal	La variable es independiente

## Anexo 2.

**Tabla 1. Variables de estudio (n=463)**

Principales características de la población

Características	N (%)
<b>Variables demográficas</b>	
Contacto con el vector <sup>a</sup>	
Si	278 (69.96)
No	178 (39.04)
Estado socioeconómico**	
Tiene electricidad en casa	451 (97.41)
Tiene televisión en casa	436 (94.17)
Tiene refrigerador en casa	463 (100.00)
Tiene carro en casa	164 (64.58)
Tiene pc en casa	140 (30.24)
Chagas diagnosticado anteriormente <sup>b</sup>	
Si	65 (19.40)
No	270 (80.60)
Miembro de su Familia con Chagas <sup>c</sup>	
Si	193 (45.65)
No	229 (54.27)
Educación Secundaria completa	
Si	247 (53.35)
No	216 (46.65)
Edad (años)*	24 (20 - 30)
<b>Variables de laboratorio</b>	
Serología para Chagas	
Positivo	66 (14.25)
Negativo	397 (85.75)
qPCR para Chagas	
Positivo	16 (3.46)
Negativo	447 (96.54)
Carga parasitaria (log parasitos/ml) <sup>†</sup>	2,22 (1.00 - 2.93)
Nivel de IgG1 (NAR)*	0,92 (0.81 - 1.12)
Nivel de IgG2 (NAR)*	0,84 (0.67 - 1.17)
Nivel de IgG3 (NAR)*	0,69 (0.48 - 1.29)

\* Variable numérica, se presenta mediana (rango intercuartil)

\*\* Categorías de la variable no son excluyentes (cada una es al 100%).

<sup>a</sup> 7 Datos excluidos, personas que no recordaban.

<sup>b</sup> 128 Datos excluidos, personas que no recibieron diagnostico en el pasado.

<sup>c</sup> 41 Datos excluidos, personas que no tenían esa información.

<sup>†</sup> Datos faltantes menor al 5% del total de cada variable.



### Anexo 3.

**Tabla 2. Factores asociados a niveles de IgG1, IgG2, IgG3 en análisis bivariado. (n=66)**

<b>VARIABLES</b>	<b>Niveles de IgG1 (N.A.R.) mediana (rango intercuartil)</b>	<b>P</b>	<b>Niveles de IgG2 (N.A.R.) mediana (rango intercuartil)</b>	<b>P</b>	<b>Niveles de IgG3 (N.A.R.) mediana (rango intercuartil)</b>	<b>P</b>
<b>Contacto con el vector</b>		0,73		0,43		0,61
Si	3.38 (2.30 - 4.49)		3.89 (1.57 - 5.85)		4.61 (0.91 - 11.15)	
No	3.47 (2.49 - 4.81)		4.59 (3.59 - 6.25)		6.44 (1.23 - 9.78)	
<b>Estado socioeconómico</b>		0,38		0,09		0,97
Tiene 1 artículo en casa	2.89 (1.78 - 3.94)		2.71 (1.92 - 4.53)		3.08 (1.45 - 7.24)	
Tiene 2 artículo en casa	4.93 (3.38 - 6.24)		6.20 (6.13 - 7.19)		4.81 (4.60 - 10.37)	
Tiene 3 artículo en casa	2.90 (2.11 - 4.36)		4.50 (2.71 - 5.98)		2.61 (0.91 - 11.21)	
Tiene 4 artículo en casa	3.29 (2.41 - 3.77)		3.67 (1.57 - 4.29)		5.62 (1.65 - 10.51)	
Tiene 5 artículo en casa	3.97 (2.40 - 4.81)		4.05 (0.86 - 6.53)		7.38 (0.79 - 12.35)	
<b>Chagas diagnosticado anteriormente</b>		0,25		0,01		0,01
Si	3.37 (2.33 - 4.62)		4.63 (2.71 - 6.03)		6.89 (1.86 - 11.82)	
No	2.41 (1.47 - 3.96)		0.91 (0.77 - 3.81)		1.23 (0.44 - 4.47)	
<b>Miembro de su familia con Chagas</b>		0,38		0,03		0,04
Si	3.63 (2.40 - 4.54)		4.50 (1.92 - 5.98)		6.00 (1.86 - 10.51)	
No	2.89 (1.47 - 4.55)		1.65 (0.86 - 3.12)		1.55 (0.29 - 5.18)	
<b>Educación secundaria completa</b>		0,82		0,34		0,33
Si	3.44 (2.40 - 4.44)		3.71 (1.00 - 5.98)		3.13 (0.87 - 9.78)	
No	3.33 (2.12 - 4.74)		4.46 (2.71 - 6.03)		5.68 (1.45 - 11.15)	
<b>Edad (años)</b>		0,39		0,67		0,68
13 - 19	2.66 (2.09 - 3.77)		4.29 (0.74 - 4.69)		1.86 (0.29 - 11.21)	
20 - 29	3.64 (2.49 - 4.93)		3.82 (1.92 - 5.42)		5.12 (2.16 - 10.37)	
30 - 46	3.33 (1.93 - 4.31)		4.46 (1.73 - 6.17)		5.18 (1.23 - 11.15)	
<b>qPCR para Chagas</b>		<0.01		0,62		0,52
Positivo	4.55 (3.63 - 6.76)		4.50 (3.12 - 5.85)		4.60 (0.79 - 8.22)	
Negativo	3.10 (2.09 - 3.97)		3.90 (1.57 - 6.03)		5.39 (1.23 - 11.79)	
<b>Carga parasitaria (log parásitos/ml)*</b>	(-)0.54	0,04	(-)0.21	0,45	(+)0.14	0,63

\* rho y valor p correspondientes a una correlación de spearman (n=16)

Se utilizó las pruebas estadísticas de t-Student, ANOVA para estimar el valor p .

† Datos faltantes menor al 10% del total de cada variable.

#### Anexo 4.

**Tabla 3. Análisis multivariado para desenlaces correlacionados. (n=66)**

Comparación de modelos multivariados para desenlaces correlacionados

Variables	Nivel de IgG1 (N.A.R.)*			Nivel de IgG2 (N.A.R.)*			Nivel de IgG3 (N.A.R.)*		
	Coef.	IC95%	p	Coef.	IC95%	p	Coef.	IC95%	p
1. q-PCR para Chagas									
Negativo	Ref.			Ref.			Ref.		
Positivo	0,52	0.22 a 0.81	<0.01	0,12	-0.36 a 0.60	0,62	-0.14	-1.10 a 0.82	0,77
2. Chagas diagnosticado anteriormente									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,29	-0.12 a 0.69	0,16	0,80	0.26 a 1.33	<0.01	1,27	0.10 a 2.42	0,03
3. Miembro de su familia con Chagas									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,10	-0.24 a 0.45	0,55	0,57	0.07 a 1.08	0,03	1,08	0.10 a 2.06	0,03
4. q-PCR para Chagas									
Negativo	Ref.			Ref.			Ref.		
Positivo	0,49	0.16 a 0.82	<0.01	-0.01	-0.52 a 0.51	0,98	-0.32	-1.39 a 0.75	0,56
5. Chagas diagnosticado anteriormente									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,22	-0.20 a 0.64	0,29	0,79	0.25 a 1.34	<0.01	1,27	0.01 a 2.52	0,05
6. Miembro de su familia con Chagas									
No	Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0,06	-0.33 a 0.45	0,75	0,53	0.01 a 1.04	0,05	0,88	-1.16 a 1.92	0,09

Modelo 1, 2 y 3 son modelos sin ajustar

Modelo 4, 5 y 6 fueron ajustados por variables en la tabla, estado socioeconómico y educación secundaria completa.

Nota aclarativa: variables para el ajuste, fueron elegidas por criterio epidemiológico.

\* Niveles de isotipos IgG con transformación logarítmica.

Anexo 5. Figura 1

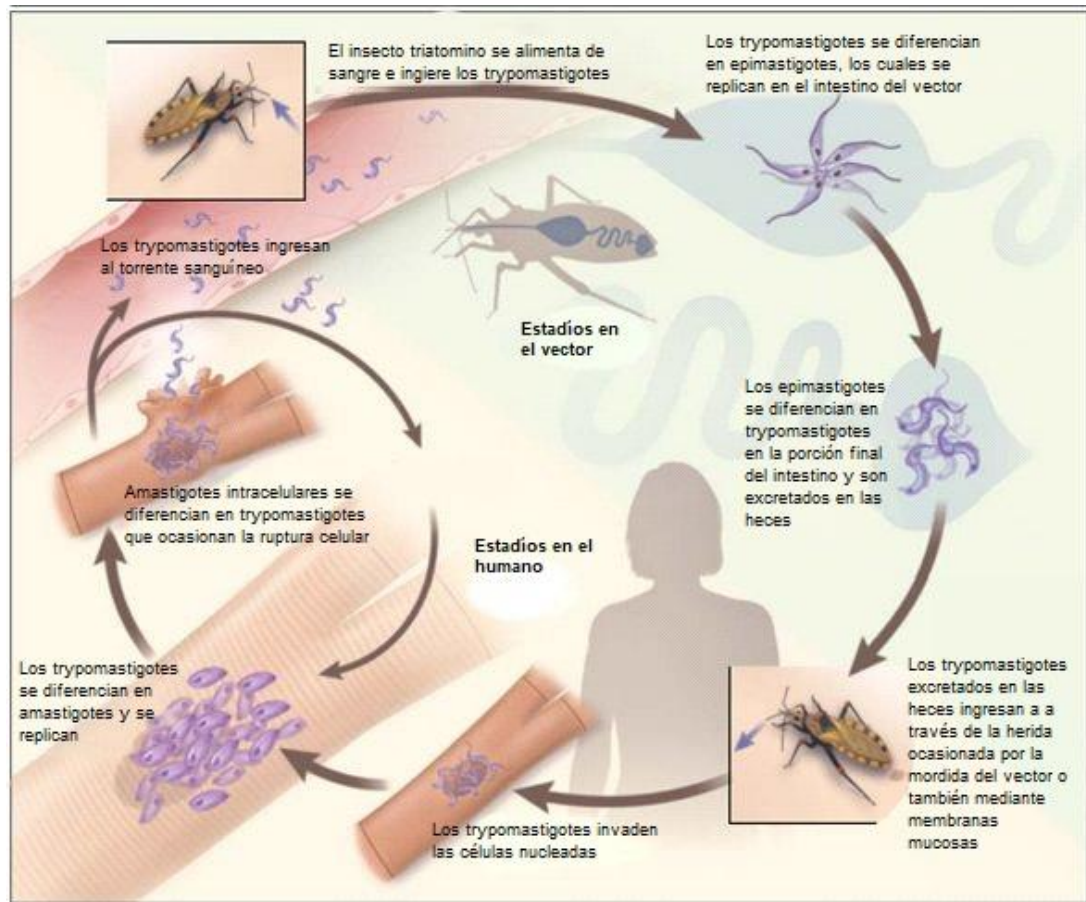


Figura 1. Esquema del ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi* adaptado de Bern 2015<sup>36</sup>

Anexo 6. Figura 2

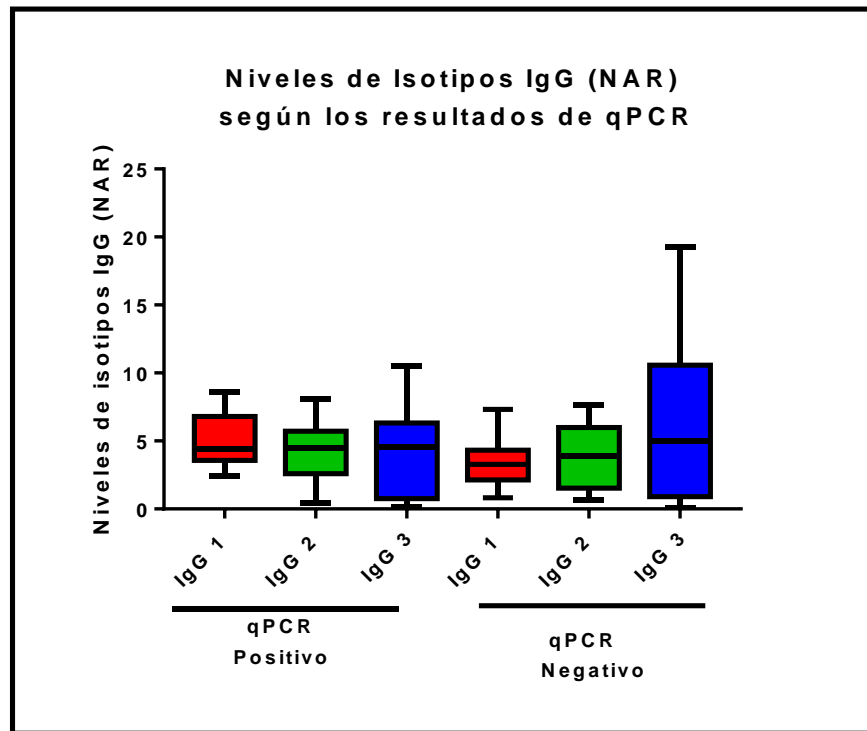


Figura 2. Análisis de cajas que compara los niveles de los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 (valores de ratio de absorbancias normalizado), según los resultados de q-PCR de los individuos en estudio que tuvieron Serología para Chagas positiva (n=61).

Se excluyeron 5 valores considerados como valores extremos.

Anexo 7. Figura 3

**Comparación de áreas bajo la curva de los isotipos de anticuerpos IgG utilizando el diagnóstico serológico de Chagas como “Estándar de oro”**

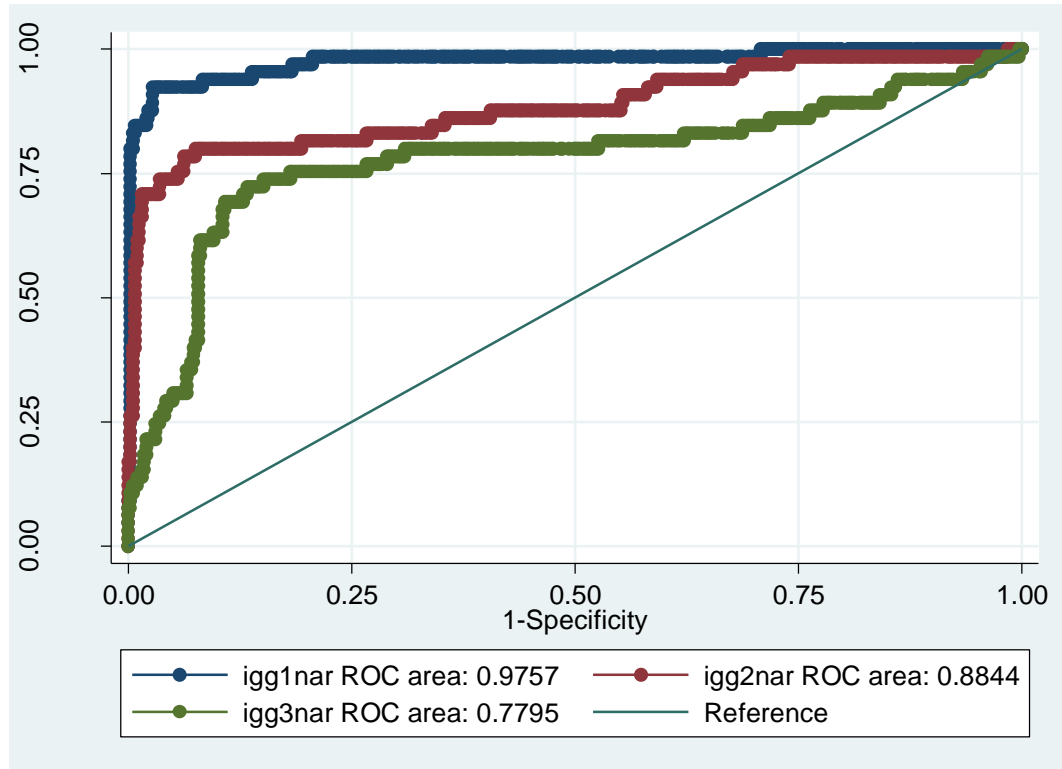


Figura 3. Análisis comparativo de curva ROC utilizando los niveles de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 (valores de ratio de absorbancias normalizado), comparados con el diagnóstico serológico para Chagas (tomado como “Estándar de oro”).