



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ESTANDARIZACIÓN DE ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EMPLEANDO PEPTIDOS SINTÉTICOS

Línea de Investigación:

Enfermedades infecciosas y no infecciosas tropicales

Tesis para optar por el Título profesional de Biología

Autor:

Flores Bancayan, Carlos Alonso

Asesores:

Salas Asencios, Ramsés
ORCID: 0000-0002-4075-1736

Valencia Ayala, Edward
ORCID: 0000-0002-5318-5526

Jurado:

Sáez Flores, Gloria María

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima – Perú

2022

DEDICATORIA

A mi madre, Rosario Bancayan, que me cuida y guía desde lo alto, a mi padre, Carlos Flores, quien es para mí ejemplo de perseverancia, a mi hermana, Carolina, quien con su inteligencia siempre me ha apoyado. A mi tía, Teresa, quien ha sido una segunda madre para mí, a Diana, por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Maritza Calderón, quien ha sido una excelente mentora y por su apoyo al brindarme un espacio en el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia donde pude desarrollar nuevos conocimientos y habilidades para ser mejor profesional, además por ser el nexo entre el Dr. Edward Valencia y yo.

Agradezco al Dr. Edward Valencia, quien fue gestor principal de esta investigación, por haberme asesorado en el desarrollo de experimentos, escritura de la tesis y darme la oportunidad de perfeccionar mis habilidades en el Centro de Investigación en Inmunología e Infectología del Instituto de Investigación de la Universidad de San Martín de Porres (CENINI-USMP) y el Centro de Investigación en Virología de la misma universidad (CIV-USMP). Expreso de igual manera mis agradecimientos a mis compañeros de laboratorio Ángela Vidal y Jorge Mantilla quienes han sido fuente de apoyo en la realización de esta investigación.

Agradezco a ProCIENCIA/Concytec y al Banco Mundial, entidades que financiaron este proyecto de investigación mediante código de proyecto: E10012019020, titulado: “Uso de Virus Like Particle (VLP), exhibiendo péptidos de la superficie proteica de *T. cruzi*, como herramienta para el diagnóstico y la inmunoterapia de la enfermedad de Chagas”.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1.	Descripción y formulación del problema.....	7
1.2.	Antecedentes	10
1.3.	Objetivos	12
1.4.	Justificación.....	13
1.5.	Hipótesis.....	14
II.	MARCO TEORICO.....	15
2.1.	Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	15
III.	METODO	29
3.1.	Tipo de investigación	29
3.2.	Ámbito temporal y espacial.....	29
3.3.	Variables.....	30
3.4.	Población y muestra	30
3.5.	Instrumentos	31
3.6.	Procedimientos	31
3.7.	Análisis de datos.....	39
3.8.	Consideraciones éticas	40
IV.	RESULTADOS.....	41
4.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i>	41
4.2.	Obtención de muestras de plasma	42
4.3.	Selección de Péptidos Superficiales Sintéticos	43
4.4.	Cuantificación de antígeno lisado total y péptidos sintéticos	45
4.5.	Estandarización de ELISA indirecto	46
4.6.	Establecimiento de Punto de Corte	57
4.7.	Cálculo de la sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto	62
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	65
VI.	CONCLUSIONES	74
VII.	RECOMENDACIONES.....	75
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
IX.	ANEXOS	91

RESUMEN

El Mal de Chagas es una de las principales enfermedades desatendidas en la región de las Américas, incluido el Perú, donde la población afectada se ubica en regiones de escasos recursos económicos donde los niveles de pobreza extrema oscilan entre el 0.1 % hasta el 24.5 % y el acceso a establecimientos de salud para lograr un diagnóstico oportuno es limitado. Actualmente las pruebas diagnósticas para la fase aguda y crónica de la enfermedad presentan porcentajes de sensibilidad y especificidad heterogéneos y por lo general por debajo del 90 %. El presente trabajo de investigación busca optimizar el diagnóstico serológico de ELISA convencional mediante la estandarización de la técnica de ELISA indirecto empleando péptidos superficiales sintéticos de la proteína trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* evaluados en modelo murino BALB/c. Se estableció un grado elevado de concordancia de Kappa de Cohen entre los exámenes de referencia para la detección de anticuerpos IgM (1.00, IC95%: 0.58 – 1.00) y detección de anticuerpos IgG (0.77, IC95%: 0.47 – 1.00), además se logró una capacidad diagnóstica del 100 % de sensibilidad y 100 % de especificidad empleando el péptido ED02 para la detección de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi*.

Palabras clave: Mal de Chagas, ELISA, péptidos sintéticos

ABSTRACT

Chagas disease is one of the main neglected diseases in the region of the Americas, including Peru, where the affected population is located in low-income regions where extreme poverty levels range from 0.1% to 24.5% and access to health facilities for timely diagnosis is limited. Currently, diagnostic tests for the acute and chronic phases of the disease have heterogeneous percentages of sensitivity and specificity, generally below 90%. The present research work seeks to optimize the conventional ELISA serological diagnosis by standardizing the indirect ELISA technique using synthetic surface peptides of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase protein evaluated in a BALB/c murine model. A high degree of Cohen's Kappa concordance was established between the reference tests for the detection of IgM antibodies (1.00, 95%CI: 0.58 - 1.00) and IgG antibodies (0.77, 95%CI: 0.47 - 1.00), and a diagnostic capacity of 100% sensitivity and 100% specificity was achieved using the ED02 peptide for the detection of IgM and IgG antibodies against *T. cruzi*.

Key words: Chagas disease, ELISA, synthetic peptides

I. INTRODUCCIÓN

El Mal de Chagas es una de las principales enfermedades desatendidas en la región de las Américas, incluido el Perú, donde la población afectada se ubica en regiones de escasos recursos económicos donde los niveles de pobreza extrema oscilan entre el 0.1 % hasta el 24.5 %, entre ellos se encuentran las regiones de Ica, Arequipa, Piura, Ayacucho, Amazonas, Apurímac y Cajamarca respectivamente. Las características de vivienda son determinantes para el establecimiento de la enfermedad, el 47 % presenta paredes de adobe/quincha, 15 % de tapia y 20 % de ladrillo en comparación del 60.9 % de los no pobres. Para enfrentar esta enfermedad infecciosa desatendida se requieren: (i) disponibilidad de medicamentos eficaces y asequibles, (ii) disponibilidad de test diagnósticos descentralizados, rápidos y con porcentajes óptimos de sensibilidad y especificidad. Ambas condiciones presentan problemas acentuados por la falta de desarrollo de fármacos y test diagnósticos oportunos. Por este motivo el presente trabajo de investigación busca optimizar el diagnóstico serológico de la enfermedad de Mal de Chagas (EC) mediante la técnica de ELISA indirecto empleando péptidos superficiales sintéticos altamente inmunogénicos para la detección rápida y oportuna de anticuerpos IgM e IgG contra *Trypanosoma cruzi* en muestras de plasma.

1.1. Descripción y formulación del problema

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis es una infección causada por el parásito *T. cruzi*, y transmitido vectorialmente por los insectos de la familia Reduviidae, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* (presente en países del cono sur del continente americano), *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (presentes en países de América Central) las cuales son las especies mejor adaptadas a los domicilios (Moncayo & Silveira, 2009). La Organización Mundial de la Salud estima que entre 6 a 8 millones de personas se encuentran infectadas en el mundo ((OMS),

2020). Cada año se reportan 30 mil nuevos casos donde un gran porcentaje se encuentra en América Latina (Lidani et al., 2019). Respecto a la mortalidad, en la región de las Américas, la EC causa el deceso de 12 mil personas anualmente debido a complicaciones cardíacas. El costo anual mundial de atención médica sería de US\$ 627,46 millones, por persona US\$ 4,660 al año y la pérdida total de años de vida sumaría 806,170 años de vida justificados por discapacidad (AVAD) (Lee et al., 2013).

La EC es endémica de 21 países del continente americano, desde el sur de Estados Unidos (EE. UU) al norte de Argentina y Chile. La transmisión del agente patógeno se ha limitado tradicionalmente a zonas rurales pobres de América Central y Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio (Pérez-Molina & Molina, 2018). En el Perú, esta enfermedad es un problema de salud pública que afecta a 15 regiones. Se han establecido tres áreas para orientar mejor el trabajo de vigilancia, prevención y control de la enfermedad donde los pobladores de las regiones de la zona sudoccidental (Ica, Arequipa, Tacna, Moquegua, valles interandinos de Ayacucho y Apurímac) y nororiental (Cajamarca, Amazonas, San Martín) tienen el mayor impacto en la salud debido a la presencia de los vectores que transmiten el parásito con una distribución domiciliar y silvestre. En la región norte (Libertad, Lambayeque, Piura y Tumbes) hay escasa información sobre la magnitud de la infección (Náquira & Cabrera, 2009). Se estima que en el Perú existen entre 650 mil a 680 mil infectados por *T. cruzi*. Con una población de riesgo entre 5 a 6.5 millones de habitantes en la región norte, con una seroprevalencia estimada de 1 y 2 % habría 67 mil a 134 mil infectados. De este número de personas, el 20 % vive en zonas de riesgo, lo que se puede inferir entonces que el problema en la región norte es acentuado (Cuba Cuba et al., 2002).

La EC presenta 3 formas clínicas: fase aguda, crónica indeterminada y crónica determinada (Pérez-Molina & Molina, 2018). El diagnóstico para cada forma clínica es diferente y muestra dificultades en cuanto a costos, tiempo oportuno de resultado y adecuados porcentajes de sensibilidad y especificidad. Durante la fase aguda y congénita (periodo de incubación de 1 a 2 semanas) el diagnóstico se realiza de manera directa por visualización de tripomastigotes en sangre, incluyendo otros fluidos como el líquido cerebroespinal, sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es muy variable entre el 34 a 85 % aunque métodos de concentración como el microhematocrito aumentan este valor a 95 % pero no en todos los casos. Otras técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son mucho más sensibles (Bua et al., 2013) y han representado una gran ayuda en el diagnóstico congénito, sin embargo, el costo de su realización no permite que se de en todos los centros de salud. La parasitemia es intermitente durante la fase crónica por este motivo los métodos directos, incluyendo la PCR no son adecuados, por este motivo el empleo del diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* es recomendado, estos se basan en antígenos totales del parásito (método convencional) y antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (método no convencional), las técnicas generalmente empleadas son la fluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Flores-Chávez et al., 2010). Los estudios de imágenes, como electro cardiograma (ECG), rayos X y ultrasonido abdominal también son realizados en presencia de afecciones cardiacas (cardiomiopatías), digestivas y cardiodigestivas (Álvarez-Hernández et al., 2021).

Dado que no se dispone de una prueba de referencia estándar (*gold estándar*), el diagnóstico para la fase crónica debe basarse en la presencia de anticuerpos IgG contra diversos antígenos del parásito mediante el uso de al menos dos ensayos serológicos, sin embargo,

empleando técnicas convencionales los resultados serológicos empleando diferentes antígenos pueden ser discordantes teniendo muestras con resultados no concluyentes persistentes (J. R. Coura et al., 2002). Se insta el empleo de un tercer ensayo diagnóstico para lograr identificar el estado de la infección, las reacciones cruzadas con antígenos de *Leishmania sp* generan un problema a este nivel dado que en países endémicos los resultados pueden dar falsos positivos a EC por la presencia de infección por *Leishmania sp* (Brasil et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018).

1.2. Antecedentes

La EC fue nombrada así en honor a su descubridor, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, quien nació en Brasil en 1878, se licenció en medicina en 1903; dentro de su trayectoria fue ministro de salud pública e higiene en Brasil, donde trabajo por primera vez con el control del vector de malaria debido a su exitoso trabajo, fue nombrado miembro de la Academia Nacional de Medicina de Brasil y recibió muchos premios y títulos (Lidani et al., 2019). En el Perú, el primer reporte de la presencia del *Triatoma infestans*, fue realizado por Escomel en 1917 en el valle Vítor, Arequipa. Entre los años 1944 y 1969 los estudios en el vector, reservorios humanos y otros mamíferos en el valle de Vítor reportaron una progresión de la enfermedad en relación al proceso de urbanización de Arequipa por las migraciones de pobladores rurales a ciudad. Los controles de la enfermedad en el país surgieron en 1970, cuando se crea el Programa de Control de la enfermedad de Chagas (Náquira, 2014).

Respecto al diagnóstico, en 1912 se demuestra que *T. cruzi* penetra a través de la mucosa ocular a los macacos; sin embargo, se desconocía el mecanismo de ingreso del parásito. Más adelante se logra descifrar este interrogante, demostrando que el patógeno ingresa a los vertebrados por las deyecciones de los triatominos (Herrer & Ayulo, 1944). En 1913 se observó que la técnica

indirecta de desviación del complemento mostró buenos resultados en muestras de suero, sin embargo, era necesario poder demostrar la presencia del patógeno en las muestras de pacientes, es así que en 1914 se implementó el xenodiagnóstico, que tiene como objetivo recuperar tripomastigotes en infección crónica durante la exacerbación y periodo febril con el uso de ninfas del cuarto estadio de *T. infestans* o *T. dimidiata*, las cuales son colocadas en el antebrazo del paciente para que absorban sangre presuntamente infectada con tripomastigotes. El proceso culmina de 30 a 60 días, analizando las heces del vector o el intestino disectado. Una alternativa a esta técnica es el hemocultivo, que es menos complejo, pero con una duración de 45 días para otorgar un resultado (Cedillos et al., 1982).

Las técnicas serológicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) brindan información sobre la cinética de anticuerpos producidos por el paciente y sobre la evolución clínica de la enfermedad. Actualmente, la técnica de PCR no es usada durante el diagnóstico clínico para la fase crónica de la enfermedad debido a la sensibilidad variada entre 50 y 90 % condicionada por factores como el nivel de parasitemia, volumen de la muestra de sangre, genes diana, fase de la infección y estado de inmunodepresión, actualmente no existen test comerciales para este propósito (Brasil et al., 2010). La identificación de regiones inmunodominantes (epitopes) en las proteínas (antígenos) de *T. cruzi* ha permitido la optimización de las técnicas serológicas (Burns et al., 1992; Da Silveira et al., 2001; Houghton et al., 2000; Mucci et al., 2017; Rivera et al., 2022). Burns y colaboradores (1992) identificaron una repetición de 10 aminoácidos presentes en proteínas de alto peso molecular de cepas aisladas de tripomastigotes de *T. cruzi*, remarcablemente, más del 95 % de sueros infectados (fase aguda y crónica) presentaron elevados niveles de anticuerpos empleando una repetición de 15 aminoácidos presentes en un péptido sintético. Posteriormente, Houghton y colaboradores (2000) realizaron la

síntesis de un péptido sintético empleando una combinación de 4 regiones inmunodominantes repetitivas de epitopes (denominado 2/D/E/Lo1.2), este péptido fue evaluado en la técnica de ELISA comparándolo con un lisado de proteínas totales de *T. cruzi*, un test comercial (Gull Chagas), el péptido sintético demostró una sensibilidad del 100 % (54/54 muestras con OD > 1.0, en un estudio de casos y controles con n = 291). Asimismo, Mucci y colaboradores (2017) evaluaron una combinación de 7 péptidos sintéticos mediante ELISA en 199 muestras de suero de pacientes con EC y sueros positivos para Leishmaniosis) mostrando una sensibilidad del 96.3 % y especificidad del 99.15 %, mostrando una reactividad nula frente a pacientes con leishmaniosis. Este contexto posiciona a los péptidos sintéticos como una alternativa adecuada para ser empleados en el diagnóstico serológico de la EC.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo Principal

Estandarizar la técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas mediante el uso de péptidos superficiales sintéticos de *T. cruzi* empleando muestras de plasma de ratones BALB/c.

1.3.2. Objetivos Específicos

Obtener antígeno lisado total (ALT) a partir del cultivo *in vitro* del estadio epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* de las cepas CLBrenner y Arequipa.

Obtener muestras de plasma de ratones de cepa BALB/c infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* en intervalos de 8, 15, 22, 29, 36, 49 y 60 días pos infección (dpi) y muestras de plasma de ratones no infectados.

Estandarizar la concentración óptima de péptido superficial sintético para la sensibilización de microplacas de ELISA, diluciones óptimas de anticuerpo primario y anticuerpo secundario para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *T. cruzi*.

Establecer el punto de corte para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *T. cruzi* empleando péptidos superficiales sintéticos.

1.4. Justificación

La evaluación de péptidos superficiales sintéticos como herramienta para la optimización de la técnica serológica ELISA representa una aproximación relevante para la detección oportuna del parásito *T. cruzi* en las diferentes poblaciones de riesgo como pacientes inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, donadores/receptores de órganos y diferentes sectores con niveles de pobreza elevados. Dado el contexto actual, para establecer un resultado positivo en fase aguda, es necesario que el paciente de positivo a exámenes directos, los cuales son extensos (examen microscópico, xenodiagnóstico) o costosos (PCR), además de no presentar resultados concluyentes entre laboratorios por tener un rango de sensibilidad muy variado (50 – 90 %) (Brasil et al., 2010). El resultado positivo en fase crónica se encuentra condicionado a su positividad en dos pruebas serológicas y es necesario realizar un ensayo adicional que establezca el estado de infección, el prolongar la entrega del resultado puede complicar el tratamiento del paciente, y este problema se acentúa en las poblaciones de riesgo. En diversos estudios la técnica serológica de ELISA ha demostrado una gran ventaja para el diagnóstico en fase crónica por presentar porcentajes de sensibilidad y especificidad mayores al 90 %, el uso de péptidos sintéticos ha incrementado estos valores hasta el 100 % posicionando la técnica como una posible técnica de oro para el diagnóstico de la EC (Betônico et al., 1999; Duarte et al., 2014; Houghton et al., 2000; Mucci et al., 2017; Rivera et al., 2022). Finalmente, el empleo de péptidos sintéticos representa

una ventaja en comparación al uso de antígenos lisados totales por su facilidad para establecer un control de calidad, fácil producción a gran escala, altamente puros, económicos en comparación a la producción de antígenos recombinantes *in vitro* y finalmente son químicamente estables con una duración estable de muchos años en un estado liofilizado (Mucci et al., 2017).

El presente estudio de investigación propone establecer el uso de péptidos superficiales sintéticos como herramienta para la optimización de la técnica de ELISA convencional con la finalidad de: (1) Detectar la fase aguda de la EC (1 – 2 semanas) por la presencia de anticuerpos IgM contra *T. cruzi*. (2) Detectar la fase crónica de la EC por la presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. (3) Establecer porcentajes de sensibilidad y especificidad mayores al 95 % y (4) Obtener resultados óptimos en un periodo máximo de 4 horas.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula (H_0)

Los péptidos superficiales sintéticos de *T. cruzi*, no presentan un porcentaje mayor de sensibilidad o especificidad que el antígeno lisado total para la detección de anticuerpos IgM o IgG empleando la técnica de ELISA indirecto.

1.5.2. Hipótesis Alterna (H_1)

Los péptidos superficiales sintéticos de *T. cruzi*, presentan un porcentaje mayor de sensibilidad o especificidad que el antígeno lisado total para la detección de anticuerpos IgM o IgG empleando la técnica de ELISA indirecto.

II. MARCO TEORICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Enfermedad de Chagas (EC): Epidemiología*

La EC en términos clínicos es una patología crónica humana causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, clasificado dentro del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae (Levine et al., 1980) que se transmite de manera vectorial y se replica en el intestino de los insectos de la familia Reduviidae, distribuidos en 15 géneros que habitan típicamente en rincones y grietas de las paredes y techos de viviendas construidas en zonas rurales (Mills, 2020). Estos insectos hemípteros, heterópteros, hematófagos pertenecen a tres géneros principalmente: *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* con una metamorfosis incompleta; es decir, las hembras ponen huevos de los que eclosionan ninfas ápteras que deben pasar por 5 estadios (Werner et al., 2008).

La variabilidad de *T. cruzi* es compleja, con un amplio grupo de cepas distribuidas en diferentes especies de vectores y hospederos mamíferos domésticos o silvestres. Debido a la gran variedad de trabajos desarrollados abordando las características de sus subpoblaciones y realizar una clasificación genética, surge la necesidad de llegar a un consenso para poder determinar los grupos de cepas de *T. cruzi*. De esta manera, se adopta la siguiente división del parásito en siete Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) TcI – TcVI, los cuales tienen distribución geográfica y ecológica dispersa por América Latina (Macedo et al., 2004; Machado et al., 2006). Los DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI están más relacionados con las enfermedades humanas, en comparación con los DTUs TcIII y TcIV que tienen distribución silvestre. Recientemente un estudio de Chagas Congénito reportó la presencia del DTU TcV en recién nacidos de la población de Santa Cruz, Bolivia, las madres transmisoras (50 %) y no transmisoras (38.2 %) reconocieron mediante un ensayo de ELISA el epitopo TSSA común a los linajes DTU TcII, TcV y TcVI (Sánchez, 2018).

En Perú, *Triatoma infestans*, es el vector biológico más importante encontrado de manera intradomiciliaria, está distribuido en la zona suroccidental del país, principalmente los departamentos de Tacna, Moquegua y Arequipa y en menor proporción en Ica, Ayacucho y Apurímac (Rojas de Arias et al., 2012). Los linajes ancestrales de *T. cruzi* fueron introducidos en América del Sur probablemente mediante murciélagos hace 7 – 10 millones de años (Hamilton et al., 2012). La evidencia más antigua de la existencia de la infección por *T. cruzi* proviene del ADN del parásito encontrado en una momia de Chinchorro de 9000 años de antigüedad en la costa del desierto de Atacama, adicionalmente encuentros históricos sugieren que muchas culturas prehispánicas tenían un contacto cercano con los insectos vectores triatominos en sus viviendas antes de la llegada de los conquistadores europeos a América del Sur y Central (Aufderheide et al., 2004).

La distribución exacta de la EC y su epidemiología en América ha sido difícil de determinar dada la escasez de atención en salud pública y limitaciones de los sistemas de vigilancia. La OMS estimó que 17.4 millones de personas estaban infectadas en 18 países en 1985 con 100 millones (25% de la población total) en riesgo de infección; sin embargo, la prevalencia se vio reducida a 8 – 10 millones en el 2005, y en el presente año (2020) se estima que en el mundo hay entre 6 – 8 millones de personas infectadas, la mayoría en América Latina (J. R. Coura et al., 2002). En el Perú el área Chagásica más importante se encuentra en la vertiente suroccidental del Pacífico, comprendida entre los 13 y los 19 grados de latitud sur y los 10 a 3075 m.s.n.m. En esta área se encuentra el vector *Triatoma infestans* intradomiciliario, y ha sido notificado en 21 provincias y de 90 a 125 distritos, el índice Trypo-triatomino oscila entre 0 – 30 % y la seroprevalencia entre 0.7 – 12 %. La tasa de prevalencia nacional se estima en 0.01 – 0.02 por 100 000 habitantes y una tasa acumulada de 7.29 por 100 000. Se han reportado 43 170 casos de infección por *T. cruzi* en

áreas endémicas, de las cuales 1209 corresponden a casos agudos y 22 962 a casos crónicos, siendo 3142 niños menores de 5 años (Náquira, 2014).

Además de la transmisión vectorial, la EC también puede ser transmitida de manera congénita, es así que se estima una prevalencia mundial del 9 % en mujeres embarazadas, existiendo una alta prevalencia en países de América del Sur (12 %) y una baja prevalencia las de origen en América del Norte (2 %) (Santana et al., 2020). Recientemente, un estudio en 300 mujeres embarazadas en la región de la Amazonia peruana ha reportado una prevalencia baja (0.33 %) empleando un tamizaje con el kit Chagatest ELISA recombinant v4.0, en la mayoría de los casos el resultado para cada mujer embarazada no fue concluyente (Ramos-Rincón et al., 2020).

2.1.2. Ciclo de vida: Agente etiológico, vector y hospederos

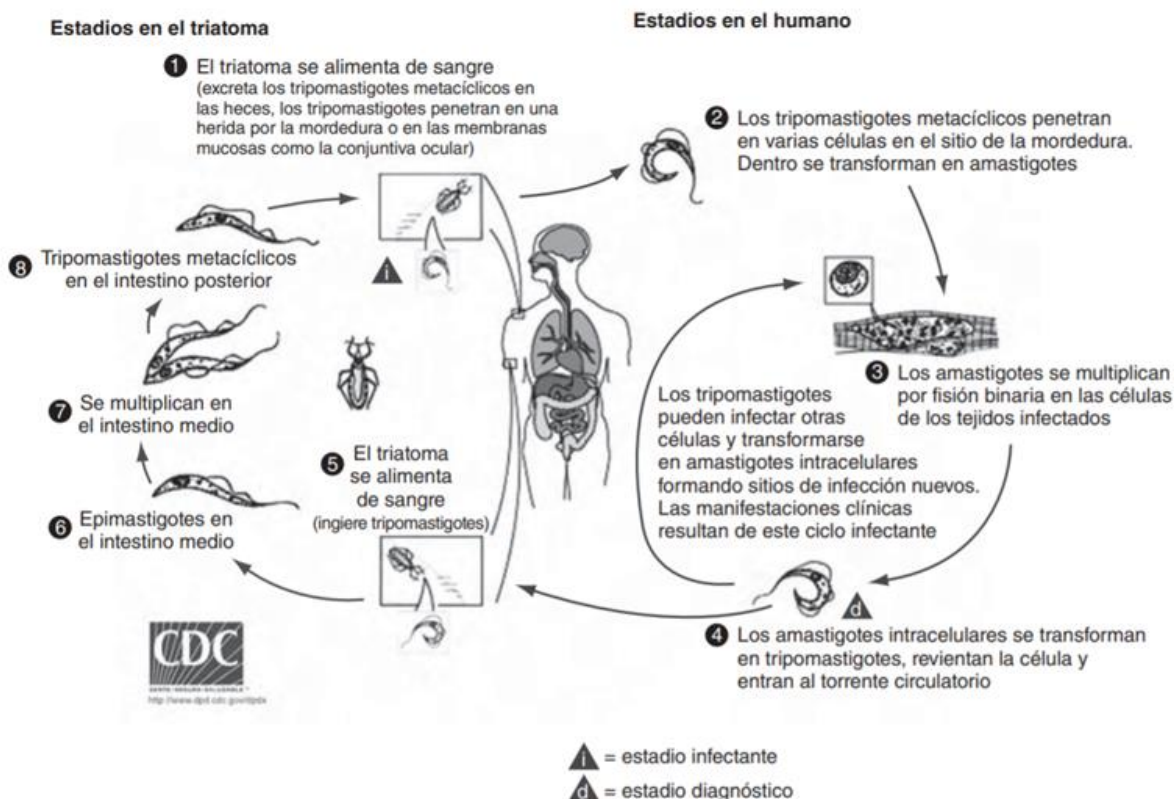
Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* atraviesa por 3 estadios definidos: (1) amastigote (forma proliferativa dentro de células de hospederos vertebrados), (2) epimastigote (forma proliferativa en intestino de hospederos vertebrados) y (3) tripomastigote (forma infectiva originada de amastigote y epimastigote) (Lidani et al., 2019). La infección humana inicia cuando formas de tripomastigote meta cíclico invaden cualquier célula nucleada a través de la circulación sanguínea, en el citoplasma de la célula parasitada estos se transforman en amastigotes, y el parásito inicia una sucesión de divisiones binarias (De Souza, 2002)

Luego de que la célula infectada presente una gran cantidad de amastigotes, estos se diferencian a tripomastigotes, lisando la célula hospederas y liberándose al medio extracelular, de esta manera pueden viajar por la corriente sanguínea diseminándose por el organismo o infectar células vecinas. El ciclo sigue cuando los tripomastigotes son ingeridos por triatominos durante la succión de sangre del humano infectado, en el intestino medio del insecto, se transforman en epimastigotes y tienen una división binaria longitudinal (Garcia & Azambuja, 1991).

Posteriormente se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior o recto y son liberados mediante las heces del insecto cuando este se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado (Minning et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1

Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi



Nota. El triatómico toma sangre del hospedero vertebrado (humano), durante el proceso, libera mediante heces tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva (i)) (1). En el hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos se diferencian en amastigotes dentro de las células infectadas (2) – (3). Cuando las células están repletas de amastigotes estos se diferencian en tripomastigotes (forma diagnóstica (d)) y son liberados al medio extracelular lisando la célula hospedera (4). El vector biológico (triatómico) ingiere tripomastigotes mediante la succión de sangre del hospedero

vertebrado, donde se diferencian en el intestino medio en epimastigotes y en el intestino posterior o recto en tripomastigotes metacíclicos (5 – 6 – 7 – 8). Tomado de (Murcia et al., 2013).

2.1.3. Proteínas de Superficie Involucradas en la Interacción con la Célula Hospedera

El proceso de interacción con la célula hospedera se divide en 3 fases: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión. El proceso de adhesión involucra moléculas presentes en la superficie del parásito como en la célula hospedera (Figura 2), incluyendo algunas secretadas por el parásito. Los 3 estadios de *T. cruzi* expresan en su superficie diferentes moléculas, el tripomastigote dentro de los mamíferos logra invadir las células removiendo los azúcares por moléculas con actividad glucosidasa, la internalización se logra por una regulación negativa de la señalización del Ca^{2+} en la célula hospedera ocasionada por la proteína gp90, esto genera que se active la movilización de Ca^{2+} necesaria para la internalización del parásito. Una glicoproteína de 85 kDa denominada Tc85 fue caracterizada como parte de la familia de las gp85/transialidasas, la misma presenta motivos comunes con las neuroaminidasas bacterianas, sin embargo, los miembros de esta superfamilia contienen una secuencia conservada (VTVXNVFLYNR) ausente en las neuroaminidasas bacterianas. Estas glicoproteínas se ubican en la superficie, su concentración es estadio-específica y presentan interacciones con receptores de las células hospederas como citokeratina 18, fibronectina y laminina (De Souza et al., 2010; Yoshida et al., 1990).

La invasión a la célula ocurre por la fosforilación de una tirosina en el receptor de la proteína gp82, junto a la fosfolipasa C e IP3 se genera la cascada de señalizaciones para efectuar la movilización de Ca^{2+} necesaria para la internalización (Favoreto et al., 1998). Las transialidasas (TS) son un grupo de moléculas presentes en la superficie del parásito con actividad enzimática que en lugar de liberar ácido siálico, tiene la capacidad de transferirlo desde los sialoglicoconjugados de la célula hospedera hacia las β -galactosas terminales de los

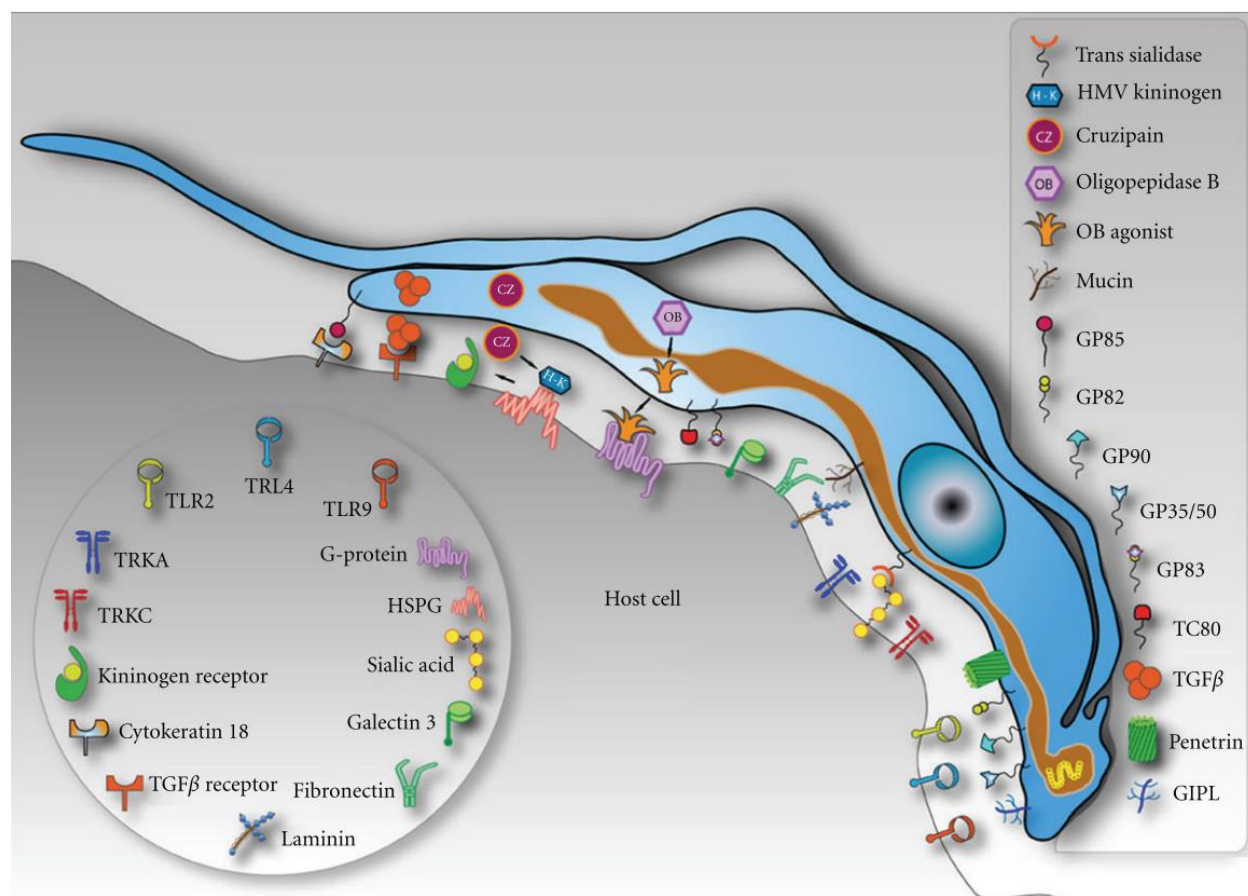
glucoconjugados del parásito, debido a que este es incapaz de producir dicha molécula (Freire-De-Lima et al., 2015; Previato et al., 1985). Estructuralmente presenta dos regiones principales, una región catalítica (N-terminal) y una extensión (C-terminal) que repite 12 aminoácidos en tándem, denominados región SAPA, reportada como altamente inmunogénica (Cazzulo & Frasch, 1992; Frasch, 1994). El proceso de sialización en *T. cruzi* se ha relacionado con la adquisición de una mayor resistencia al sistema complemento de la respuesta inmune innata, siendo un prerrequisito para lograr la infección. Algunas proteasas se encuentran involucradas en el proceso de infección como la cruzipaina, oligopeptidasa B y Tc80. La cisteína proteasa, cruzipaina, fue identificada en el reservosoma (endosoma-lisosoma) del estadio epimastigote, sin embargo, es expresada en la superficie, esta enzima presenta interacciones con los macrófagos rompiendo el quininogeno de alto peso molecular para generar quininas que se unen al receptor bradiquinina para estimular el lanzamiento de Ca^{2+} mediado por IP3 (Scharfstein et al., 2000). Las proteínas de superficie del estadio amastigote que participan en la invasión celular aún no han sido descritas, sin embargo, se conoce una proteína de 21 kDa secretada involucrada en este proceso (da Silva et al., 2009).

El proceso de invasión celular es complejo y existen muchas moléculas en la célula hospedera que pueden funcionar como potenciales patrones de reconocimiento, en macrófagos se encuentran la citocalasina B y concavalina A, por otro lado, los receptores *Toll like* 4 y 9 logran reconocer a *T. cruzi*, se conoce que la ceramida GIPL aislada de epimastigotes interactúa con el receptor *TLR-4* mientras que las islas CpG metiladas de ADN del parásito son reconocidas por *TLR-9* ((Henriquez et al., 1981; Kipnis et al., 1979) citados en (De Souza et al., 2010)). Actualmente existen 3 mecanismos de entrada de *T. cruzi* a la célula hospedera: (1) la vía dependiente de lisosomas inicia por la exocitosis dirigida por lisosomas y regulada por Ca^{2+} en la membrana plasmática. (2) la vía dependiente de actina, los tripomastigotes ingresan debido a la

expansión de su membrana plasmática. (3) la vía independiente de lisosomas, los parásitos ingresan a las células a través de invaginaciones en la membrana plasmática de la célula hospedera que acumulan PIP3, internamente establecen una vacuola formada por su membrana plasmática, pasando finalmente al estadio amastigote (Figura 3).

Figura 2

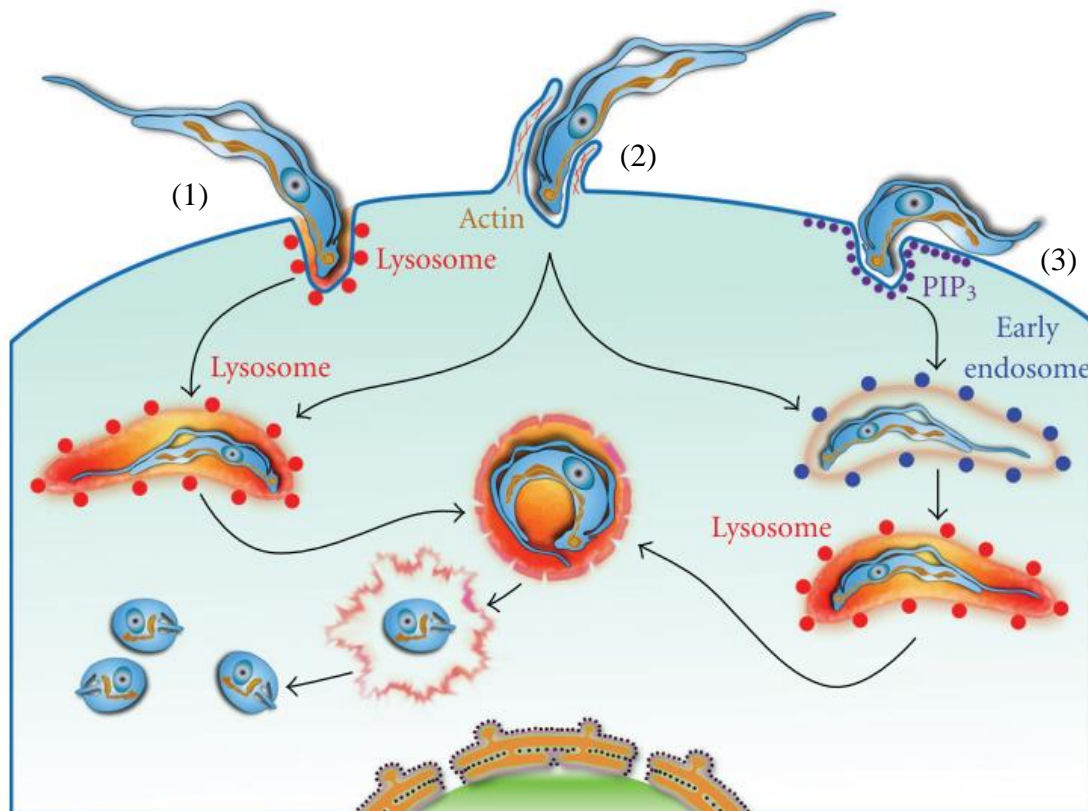
Proteínas involucradas en la interacción de T. cruzi con la célula hospedera



Nota. Esquematización de las principales proteínas involucradas en el proceso de adhesión e invasión a la célula hospedera del estadio tripomastigote de *T. cruzi*. Tomado de (De Souza et al., 2010).

Figura 3

Mecanismos de invasión celular de T. cruzi



Nota. (1) Vía dependiente de lisosomas, (2) Vía dependiente de actina y (3) Vía independiente de lisosomas. Tomado de (De Souza et al., 2010).

2.1.4. Respuesta Inmune de la Enfermedad de Chagas

La respuesta inmune por parte del organismo infectado ocurre para poder controlar la replicación del parásito, las células fagocíticas, como los monocitos/macrófagos, neutrófilos y células dendríticas son la primera línea de defensa contra los patógenos, durante el proceso de invasión celular, existen patrones moleculares (PAMPs) pertenecientes a *T. cruzi* que serán reconocidos por los diferentes receptores celulares así como moléculas asociadas al daño celular

(DAMPs) que inducen la respuesta inmune. Durante el proceso de adhesión e invasión celular, estas células se encargan de la respuesta inmune innata, con la producción de citoquinas proinflamatorias como: Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Las citoquinas IL-12 y TNF- α son producidas por macrófagos y células dendríticas e inducen la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T activados y células natural killer (NK). De esta manera el IFN- γ actúa en sinergia con el TNF- α induciendo la expresión de enzimas óxido nítrico sintasa inducibles (iNOS) que cataliza la síntesis de óxido nítrico en los macrófagos infectados, buscando la eliminación del parásito (Gutierrez et al., 2009; Paiva et al., 2009).

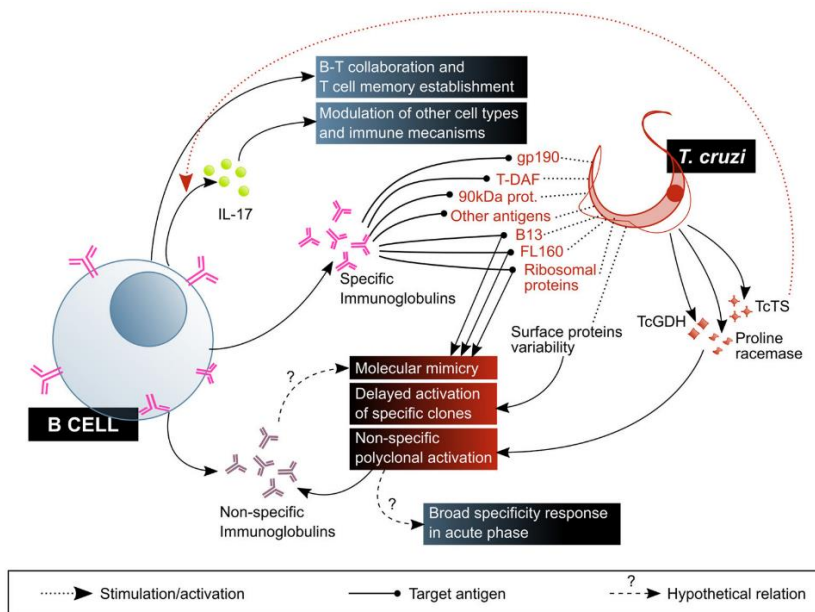
Además de la fagocitosis y la eliminación del parásito por neutrófilos en el contexto de la respuesta inmune innata, las células fagocíticas tienen la capacidad de generar una red fibrosa de ADN, histonas, elastasa y proteínas granulares llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET) con la finalidad de generar la muerte del parásito por netosis. Recientemente se ha identificado que los tripomastigotes y algunos antígenos de *T. cruzi* inducen la formación de NETs, aunque no tienen la capacidad de eliminar al parásito son capaces de reducir la tasa de invasión celular debido a que inducen la diferenciación de tripomastigote hacia amastigote en el medio extracelular (Sousa-Rocha et al., 2015).

Las células T y B son las encargadas de la respuesta inmune adaptativa, los estudios en anticuerpos producidos por las células B han permitido identificar un total de 2×10^3 epitopes que presentan interacciones específicas con anticuerpos presentes en el suero humano y modelos animales (ratones BALB/c y C57BL/6). Existen dos poblaciones de anticuerpos generados de acuerdo a los antígenos expuestos por *T. cruzi*, la primera se denomina anticuerpos líticos y son inducidos por antígenos como gp190, T-DAF, p90 kDa y muchas proteínas de superficie ancladas

a GPI, estos anticuerpos se encuentran asociados al sistema complemento, por otro lado, los anticuerpos no líticos son inducidos por mucinas (TcMUC), proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs), trans-sialidasas, proteínas de superficie de amastigote (ASPs), gp82, entre otras (Acevedo et al., 2018). La producción de anticuerpos no logra eliminar al parásito posiblemente por 3 factores: el primero se refiere a la variabilidad antigénica y a la gran cantidad de antígenos expresados al mismo tiempo, en segundo lugar, existe una reducción considerable de anticuerpos inmaduros en la médula ósea por una tasa de apoptosis elevada y tercero es la activación no específica de células B policlonales (Acosta Rodriguez et al., 2007; Buscaglia et al., 2006; Pitcovsky et al., 2002; Zuniga et al., 2005) (Figura 4). Los linfocitos T CD4+ activados o linfocitos T helper 1 (Th1) actúan en la eliminación intracelular del patógeno mediante la producción de IFN- γ y median la activación de linfocitos CD8+, que tienen una función limitada de reconocer células infectadas y matarlas a través de mecanismos citotóxicos.

Figura 4

Respuesta inmune adaptativa por parte de las células B y anticuerpos.



Nota. Existen factores beneficiosos para el hospedero (recuadros azules) y factores perjudiciales para el hospedero (recuadros rojos). T-DAF: factor de aceleración del decaimiento de los tripomastigotes; TcTs: transialidasa de *T. cruzi* y TcGDH: glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi*. Tomado de (Acevedo et al., 2018).

2.1.5. Manifestaciones Clínicas

La enfermedad presenta 3 periodos clínicos bien definidos: fase aguda, fase crónica indeterminada o latente y fase crónica determinada. El periodo de incubación en la fase aguda es de 4 a 10 días y de menor duración cuando la forma de transmisión es transfusional. La etapa aguda generalmente es asintomática, más frecuente en personas menores de 40 años. Existe una alta parasitemia con signos y síntomas, este periodo abarca de 1 a 2 semanas y puede extenderse hasta los 4 meses, solo el 1 a 2 % de los casos de EC se diagnostican en esta etapa. Los pacientes agudos sintomáticos presentan, fiebre, edema, chagomas de inoculación, adenopatías satélites

hepatomegalia y esplenomegalia (Werner et al., 2008). Dentro de la etapa aguda se presenta una manifestación congénita; sin embargo, es frecuentemente asintomática. Los signos y síntomas son inespecíficos, pudiendo manifestarse incluso antes del nacimiento (abortos y muerte fetal), en el momento del nacimiento (bajo peso al nacer, bajo índice de Apgar y prematuridad) o en las horas o días que siguen al alumbramiento (fiebre, hepatoesplenomegalia, síndrome torácico agudo, grave afectación del estado general, etc.) (Murcia et al., 2013).

En la etapa crónica indeterminada, el diagnóstico de laboratorio es muy importante, considerando la baja carga de parásitos circulantes en sangre y la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*; en esta etapa la mayoría de síntomas son inespecíficos, incluso inexistentes (Hasslocher-Moreno et al., 2021). Este periodo puede durar más de 30 años en donde alrededor del 25 % de pacientes desarrollan la etapa crónica determinada con lesiones graves e irreversibles (Storino, 2010). Los pacientes que desarrollan la forma cardíaca o determinada de la enfermedad presentan manifestaciones variadas, que pueden incluir arritmias, síntomas de insuficiencia cardíaca hasta provocar la muerte súbita. Esta es la etapa considerada responsable de la mayor cantidad de muertes por la EC; en su inicio los pacientes refieren palpitaciones, disnea, lipotimia y raramente se encuentran soplos cardíacos. Se presentan cuatro mecanismos patogénicos en la cardiomiopatía por EC: lesión directa del miocardio, mecanismos inmunológicos, disautonomía y alteraciones microvasculares. (José Rodrigues Coura & Borges-Pereira, 2011; Rassi et al., 2010).

2.1.6. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la EC varía de acuerdo con la etapa en la que se encuentra el paciente. La primera fase de la enfermedad, aguda, se caracteriza por una parasitemia elevada, detectable por medios parasitológicos directos o técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). La fase crónica, debido a la disminución de la carga parasitaria

circulante es difícilmente detectable; sin embargo, existe un incremento de anticuerpos específicos tipo inmunoglobulinas G (IgG) que son detectables por medio de técnicas serológicas (Murcia et al., 2013).

El diagnóstico parasitológico de manera general consiste en la observación del parásito mediante microscopía directa de sangre periférica en fresco debido a sus movimientos rápidos entre las células sanguíneas. Las extensiones de sangre periférica y la gota gruesa, adecuadamente teñidas, permiten observar las características morfológicas del parásito. Otras formas de diagnóstico directo es el xenodiagnóstico y el hemocultivo, cuya sensibilidad depende del grado de parasitemia del paciente. Cuando el nivel de parasitemia es bajo incluso en fase aguda, es necesario usar técnicas de concentración como el método de Strout o el microhematocrito en los recién nacidos (Rodea et al., 2018).

El diagnóstico serológico se emplea durante la fase crónica de la enfermedad. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda utilizar la combinación de dos pruebas serológicas, pues no existe una técnica de oro o “gold standard” que se emplee como referencia ((OMS), 2020). La técnica serológica de ELISA es una de las más empleadas, se basa en la sensibilización de una placa de poliestireno con antígenos de *T. cruzi*, donde los anticuerpos presentes en el suero del paciente reaccionarán mediante la adición de un anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de interés conjugada con un marcador enzimático, que suele ser la peroxidasa de rabanito picante (HRP) (Murcia et al., 2013; Velarde et al., 2001).

Uno factor que afecta la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas es el tipo de antígeno empleado durante la sensibilización de las microplacas, estos pueden ser homogenizados crudos de proteínas totales del parásito, proteínas excretadas y secretadas (TESA), proteínas recombinantes desarrolladas por biotecnología y actualmente péptidos sintéticos

(Berrizbeitia et al., 2015; Nonajulca C, 2019). Existen proteínas de la fase crónica caracterizadas por una banda en ensayos de inmuno Blot o Western Blot de 150 – 160 kDa, de la misma manera para la etapa aguda, componentes denominados “shed acute phase antigen” (SAPA) de 130 – 200 kDa que se visualizan luego de una separación de proteínas por electroforesis y transferencia a membranas de nitrocelulosa (Escalante et al., 2014). La región SAPA ha sido empleada para el diagnóstico temprano de Chagas congénito empleando la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos IgM, obteniendo un porcentaje de sensibilidad del 94.3 % en comparación con la técnica de qPCR con 97.1 % (Castro-Sesquen et al., 2021).

III. METODO

3.1. Tipo de investigación

El presente trabajo de tesis propone identificar en individuos expuestos y no expuestos a la Enfermedad de Chagas en un tiempo definido una correlación entre dos o más variables empleando una estadística de datos que parte de un problema, plantea objetivos claramente definidos y una hipótesis a ser aceptada o rechazada mediante pruebas empíricas. Por lo expuesto, este es un estudio de cohorte longitudinal, prospectivo y analítico.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Las muestras empleadas en este estudio se obtuvieron de ratones de cepa BALB/c obtenidos del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS) en el año 2020, estas se distribuyeron entre individuos no infectados e infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. La colecta de muestras de plasma se realizó en el transcurso de la enfermedad a los 8, 15, 22, 29, 36, 49 y 60 días post infección (dpi).

La infección, obtención de muestras y desarrollo de la técnica diagnóstica se realizaron en los laboratorios del Centro de Investigación en Inmunología e Infectología del Instituto de Investigación de la Universidad de San Martín de Porres (CENINI-IDI-USMP) en el periodo 2020 – 2021, la técnica de ELISA concluyó su estandarización en el Centro de Investigación en Virología de la misma universidad (CIV-USMP) en el periodo 2022. Este trabajo de tesis se encuentra dentro del proyecto con código: E10012019020, financiado por Fondecyt-Banco Mundial, titulado: “Uso de Virus Like Particle (VLP), exhibiendo péptidos de la superficie proteica de *T. cruzi*, como herramienta para el diagnóstico y la inmunoterapia de la enfermedad de Chagas”.

3.3. Variables

3.3.1. Variable dependiente

Anticuerpos IgM/IgG contra antígenos/epitopes de *Trypanosoma cruzi*. Variable de tipo continua con medición en escala de razón.

3.3.2. Variables independientes

Concentración de antígenos para la sensibilización de placas de ELISA (Antígeno lisado total, Péptidos superficiales sintéticos). Variable de tipo continua con medición en escala de razón.

Dilución de anticuerpo primario (plasma de ratones expuestos y no expuestos a la enfermedad de Chagas). Variable de tipo continua con medición en escala de razón.

Dilución de anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG/IgM de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito picante (HRP)). Variable de tipo continua con medición en escala de razón.

3.3.3. Variable Interviniente

Tiempo de reacción entre el anticuerpo detectado y el anticuerpo secundario con el sustrato específico. Variable Continua con medición en escala de intervalo.

3.3.4. Variables Cuantitativas

Densidad óptica obtenida de la detección de anticuerpos IgM/IgG contra *T. cruzi*. Variable de tipo continua con medición en escala de intervalo.

3.4. Población y muestra

El presente trabajo de tesis abarcó una población de 43 ratones de la cepa susceptible BALB/c. Se realizaron dos ciclos de infección en dos grupos (18 ratones para el grupo 1 y 15 ratones para el grupo 2), en total se infectaron 33/43 ratones. Cada grupo se clasificó de la siguiente

manera: 18/33 población aguda desde 8 – 22 dpi, 15/33 población crónica desde los 29 dpi hasta los 60 dpi y 10/43 población control negativo sin infección.

Adicionalmente se emplearon 18 sueros humanos para un ensayo de ELISA piloto empleando los péptidos superficiales sintéticos. Se agruparon de la siguiente manera: 16/18 sueros de pacientes positivos a 3 pruebas diagnósticas, 1/18 sueros de pacientes sin infección y 1/18 suero de paciente positivo a infección por *Leishmania sp.* Los sueros de humanos positivos y negativos a Mal de Chagas provienen de un estudio previo realizado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 64977) y presentan comité de ética aprobado, la muestra de positiva a *Lesihmania sp* fue otorgada por el Instituto Nacional de Salud del Perú.

3.5. Instrumentos

El presente proyecto empleó experimentos que otorgaron como resultados datos cuantitativos que permitieron su análisis, posteriormente el procedimiento del experimento con los resultados con mejor correlación y significancia estadística de las variables fue registrado en un protocolo para el diagnóstico de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi*.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Materiales

3.6.1.1. Material Biológico

Se emplearon 52 muestras de plasma de ratones BALB/c y 19 muestras de suero de humanos.

3.6.1.2. Materiales y Equipos de Laboratorio

Se emplearon, recipientes de cultivo de 25 y 75 cm², pipetas serológicas de 5, 10 y 25 ml, pipeteador automático, micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 µl, puntas para micropipeta de 10, 100, 200 y 1000 µl, tubos de 0.6, 1.5, 2.0, 15 y 50 ml, probetas de 100 y 500 ml, recipientes con

tapa de 250, 500 y 1000 ml, beaker de 50 ml, microplacas de ELISA Nunc MaxiSorp™ flat-bottom (Thermo Fisher), incubadora conectada a CO₂, incubadora sin conexión a CO₂, pHmetro, agitador magnético, balanza de precisión (0.0001 g) y Lectora de placas de ELISA iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad).

3.6.1.3. Reactivos de laboratorio

Se emplearon los siguientes reactivos de laboratorio para el cultivo *in vitro* de *T. cruzi*, obtención de proteínas y estandarización de la técnica de ELISA (Tabla 1)

3.6.2. Método

3.6.2.1. Cultivo *in vitro* de *T. cruzi*.

Cultivo de Tripomastigotes. - Se cultivaron 2×10^5 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Arequipa DTU Tc I y cepa CLBrenner en recipiente de cultivo de 75 cm² con una monocapa de células de fibroblastos de riñón de mono verde Rhesus (LLC MK2) confluentes al 80 % empleando medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB 10 %) y antibióticos a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. Posteriormente los tripomastigotes fueron colectados y/o almacenados a – 70 °C hasta su uso.

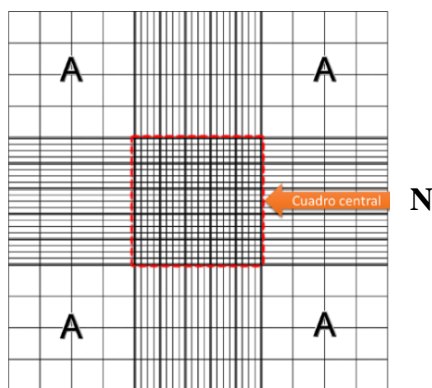
Cultivo de Epimastigotes. - En el sexto, séptimo y octavo día de crecimiento los tripomastigotes fueron colectados y dispensados en tubos de 15 ml con medio de cultivo RPMI, luego de 24 horas se colectará el sobrenadante en nuevos tubos de 15 ml, centrifugándolos posteriormente a 700 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado de parásitos se resuspendió con medio de cultivo LIT suplementado con 20 % de suero fetal bovino (SFB), finalmente fueron incubados a 28 °C.

El décimo día se colectó el sobrenadante con epimastigotes, se procedió a contar en cámara de Neubauer y se adiciono medio de cultivo LIT para obtener una cantidad de 5×10^5 epimastigotes/ml y se incubó a 28°C . Posteriormente los epimastigotes fueron colectados y almacenados a -70°C hasta su uso.

Conteo de parásitos para infección. – Se colectaron en tubo de 15 ml tripomastigotes luego de 6 días de cultivo *in vitro*, se centrifugaron a $750 \times g$ por 5 minutos, el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de 15 ml y se centrifugó a $2000 \times g$ por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X filtrado, se dispensó $10 \mu\text{l}$ de homogenizado a la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de 1×10^4 tripomastigotes/ml empleando la siguiente formula: $(N) \times (10^4) \times (\text{Factor de Dilución})$ (Figura 5)

Figura 5

Cuadrante de cámara de Neubauer



Nota. La flecha naranja indica el cuadrante central empleado para el conteo de parásitos. N: indica el número de parásitos en los 25 cuadros centrales.

Tabla 1*Reactivos de laboratorio*

Descripción	Lote	Fecha de Vencimiento
Sodio cloruro, ACS	B17W53	3/01/2027
Sodio fosfato dibásico anhidro. ACS	A18C46	7/05/2021
Potasio fosfato monobásico ACS	A03C38	1/01/2026
Sodio fosfato monobásico monohidratado ACS	Y23C14	1/06/2025
Tetramethylbenzidine (TMB)	SLCC5061	31/08/2023
Quick Start™ Bradford Protein Assay, BSA standard	64383211	14/09/2025
Carbonato de sodio anhidro	A1456292	31/05/2024
Bicarbonato de Sodio	K52580129	31/07/2025
Tampón blocker BSA 10%	WB318180	-
Inhibidor de proteasas y fosfatasa liofilizado	SLCD8672	-
Tween 20, SIGMA	SLBZ56589	-
Sodio fosfato dibásico, MERCK	1.06586.0500	31/07/2011
Buffer fosfato salino (PBS) tabletas c/u para 200ml, SIGMA	SLBZ3711	-
Anti-Human IgG (Fc specific)-Peroxidase antibody produced in goat, SIGMA	058M4810V	-
Anti-Human (H+L)-Peroxidase antibody produced in goat, KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIS	50425	-
Anticuerpo secundario HRP Goat anti-mouse IgM INVITROGEN	WA3184545	-
Anticuerpo secundario HRP Goat anti-mouse IgG INVITROGEN	VK316101	-
Medio de Cultivo Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)		-
HEPES	-	-
Hemina	-	-
Glucosa	-	-
Amoniácidos Escenciales	-	-

3.6.2.2. Obtención de Antígenos de *T. cruzi*.

Se realizaron colectas sucesivas de tripomastigotes y epimastigotes luego de 6 - 8 días y 10 – 15 días post-infección respectivamente a partir de dos recipientes de cultivo de 75 cm² y 3 tubos de 15 ml, se realizaron centrifugaciones sucesivas de 750 x g por 5 minutos y 2000 x g por 15 minutos, el precipitado fue resuspendido con 1 ml de solución tampón salino (1X), posteriormente se realizarán 3 lavados sucesivos con la misma solución a 5000 x g por 10 minutos, almacenando el precipitado a - 70 °C hasta su uso. Los precipitados en congelación se descongelaron y resuspendieron con 1 ml de solución tampón salino (1X), El pool de parásitos fue sonicado 2 veces a 4 MHz en 3 oportunidades durante 30 segundos y con intervalos de 1 minuto. Finalmente, se añadieron inhibidores de proteasas, Pepstatin (1/1000) y Pefabloc (1/100) a los antígenos de tripomastigotes y epimastigotes. Finalmente fueron almacenados a – 70 °C hasta su uso.

3.6.2.3. Selección de péptidos sintéticos de *T. cruzi*

Las secuencias de los péptidos sintéticos corresponden a proteínas trans-sialidasas del grupo I (TSGI) obtenidas de la base de datos de TriTrypDB (<http://TriTrypDB.org>). Para obtener estas secuencias, se diseñó una estrategia de selección secuencial a partir del análisis de perfil filogenético que incluye ortología, predicción de péptido señal y análisis de los dominios con actividad sialidasa. Posteriormente estas secuencias fueron sometidas a un alineamiento múltiple utilizando la plataforma Jalview (<http://www.jalview.org>), con la finalidad de obtener secuencias consenso.

Se establecieron 2 secuencias peptídicas consenso (TSGL.1 y TSGL.2) y se analizaron mediante el predictor de epitopos lineales de células B Bedipred versión 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) con un punto de corte de 0.5 para seleccionar

epitopes potencialmente conservados entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, que incluyen: Brasil A4, CL-Brener, Esmeraldo like, Non-Esmeraldo like, Sylvio X10/1, TCC, YC6 y Arequipa. La conservación antigénica de los epítomos en las diferentes cepas seleccionadas se realizó a través del “Epitope Conservancy Analysis” presente en el IEDB server (<http://tools.iedb.org/conservancy/>). Los péptidos seleccionados se analizaron con búsquedas BLASTP contra el proteoma predicho de *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. major*, aquellos que mostraron más del 70 % de similitud fueron descartados con la finalidad de evitar reacciones cruzadas. Las cualidades antigénicas se analizaron mediante: (i) Koloaskar-Tongankar antigenicity, (ii) ABCPred y (iii) Vajixen, la accesibilidad al epitope se analizó mediante: (iv) Emini surface accessibility prediction, la estructura de hojas beta mediante: (v) ChouFas y la hidrofiliidad de la secuencia mediante: (vi) Parker, teniendo de esta manera 6 análisis bioinformáticos para las secuencias de péptidos superficiales a sintetizar.

3.6.2.4. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Se elaboró una curva estándar con albumina sérica bovina (BSA) para la cuantificación por el método de Bradford, partiendo de una solución stock de 10 mg/ml la cual se diluyó 1/10 (100 μ l de stock + 900 μ l de agua destilada) teniendo una concentración de 1 mg/ml para la curva estándar la cual está en un rango de 0 – 200 μ g de tal manera que el volumen final sea 500 μ l.

Se dispuso de una microplaca de 96 pocillos, en cada pocillo se colocaron 20 μ l del antígeno lisado total y de curva estándar por duplicado, luego se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford previamente diluido 1/5 con agua destilada. Finalmente se realizó la lectura en espectrofotómetro a 595 nm (Bradford, 1976).

Los péptidos superficiales sintetizados se obtuvieron de manera liofilizada e indicaban su peso molecular en gramos/mol (g/mol), se resuspendieron en cabina de flujo laminar con agua grado molecular, se realizó el cálculo de molaridad con la siguiente formula:

$$g = PM \times M \times V \dots \text{Donde: } g: \text{gramos, } PM: \text{peso molecular, } M: \text{molaridad y } V: \text{volumen}$$

3.6.2.5. Estandarización de ELISA indirecto

Selección de antígeno control. – Se emplearon microplacas de 96 pocillos de fondo plano para ELISA (NUNC® MaxiSorp /Thermo Fisher Scientific) sensibilizándose con 0.05 µg/pozo (1.5 µg/ml) de antígeno lisado total (ALT) de tripomastigotes y epimastigotes de las cepas CLBrener (DTU Tc VI) y Arequipa (DTU Tc I) en un volumen de 50 µl por pozo. Las concentraciones tomadas para evaluar el antígeno control fueron de 1:100 para el anticuerpo primario, 1:5000 para el anticuerpo secundario IgG anti-*T. cruzi* y 1:3000 para el anticuerpo IgM anti-*T. cruzi*.

Estandarización de concentración de péptido sintético. – Los péptidos superficiales sintéticos se evaluaron empleando concentraciones de 0.5 µg/ml y 1.5 µg/ml para la sensibilización de las microplacas de ELISA (NUNC® MaxiSorp /Thermo Fisher Scientific). De acuerdo a la concentración de trabajo (1000 µg/ml) se diluyeron los péptidos con la solución tampón carbonato/bicarbonato 100 mM con pH 9.6, posteriormente se tomaron 50 µl de cada péptido y se dispensaron en cada microplaca de ELISA y se dejaron incubando durante 18 horas a 4 °C.

Estandarización de agente de bloqueo de microplaca. – Luego del tiempo de sensibilización se realizaron 4 lavados con intervalos de 2 minutos con PBS 1X + Tween-20

al 0.05 % (PBS1X – T 0.05 %). posteriormente se bloquearon los pozos agregando 200 µl/pozo de albumina sérica bovina al 5 % contenida en solución de tampón fosfato salino 1X (PBS 1X – BSA 5%), el otro agente de bloqueo, PBS 1X-Leche 5 % fue dispensado en una microplaca diferente. Posteriormente se realizó una incubación a 37 °C durante dos horas.

Estandarización de dilución de anticuerpo primario y secundario. – Luego del bloqueo se añadieron 50 µl/pozo por duplicado de anticuerpo primario (plasma de ratón BALB/c) diluido 1:100 y 1:500 con BSA al 1 % y 2.5 %. Se incubaron las microplacas de ELISA por 1 hora a 37 °C. Luego se hicieron 4 lavados con intervalos de 2 minutos con 200 µl/pozo con PBS 1X – T 0.05 %.

Posteriormente, se añadieron 50 µl/pozo de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito picante (HRP) diluido 1:3000 y 1:5000 en solución PBS 1X - BSA al 2.5%, se incubaron las microplacas durante 1 hora a 37° C, el anticuerpo anti-IgM-HRP se evaluó en las diluciones 1:3000, 1:5000 y 1:10000. Inmediatamente después de la incubación se realizaron 4 lavados con intervalos de 2 minutos, La reacción fue evidenciada agregando 50 µl de la solución de sustrato 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidina (TMB – Sigma Aldrich). Finalmente se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. El revelado se realizó aplicando 50 µl de solución de ácido sulfúrico 0.5 M a cada pocillo. Las lecturas de absorbancia se realizaron en el lector de microplacas usando una longitud de onda de 450 nm.

Estandarización de Punto de Corte. – Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente para identificar el procedimiento adecuado para la detección de anticuerpos IgM e IgG y ser redactadas en un protocolo para el empleo de péptidos superficiales sintéticos. Posteriormente, las muestras de plasma de todos los individuos fueron evaluadas

bajo este protocolo, los resultados de densidades ópticas obtenidos fueron tratados estadísticamente por Curva ROC para identificar el área de la curva y el punto de corte óptimo para la discriminación de individuos positivos y negativos.

3.7. Análisis de datos

Se analizaron los datos cuantitativos obtenidos de densidades ópticas para cada condición evaluada a fin de establecer correlaciones con un grado de confianza del 95 % y significancia de 0.05 para cada caso. Se emplearon estadísticos descriptivos de medida de tendencia central como el promedio y la media, además se calcularon medidas de dispersión como desviación estándar y percentiles.

Se empleó el estadístico T-Student para comparar los valores de densidad óptica obtenidos en cada condición estandarizada y los valores de sensibilidad-especificidad obtenidos entre los péptidos y el antígeno control, de esta manera se evaluó si la diferencia entre los valores de ambos grupos es estadísticamente significativa. La comparación de los tres grupos evaluados (ED02, ED04 y ALT) se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los programas utilizados para realizar los análisis fueron GraphPad Prism 8 y Excel. En conjunto, el uso de estas técnicas estadísticas me permitió obtener resultados precisos y confiables para la estandarización de la técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de Mal de Chagas utilizando dos péptidos sintéticos.

La concordancia de la prueba de ELISA indirecto empleando péptidos superficiales sintéticos y antígeno lisado total se determinó mediante la índice kappa de Cohen, además se evaluó la precisión de la prueba realizando 4 ensayos en intervalos de tiempo de 1 semana empleando las mismas muestras (controles negativos y controles positivos).

3.8. Consideraciones éticas

En el presente trabajo de tesis se emplearon ratones como modelo experimental, uno de los aspectos más importantes fue el cuidado ético y el bienestar de los animales utilizados. Para garantizar ello, se siguieron estrictamente las normas éticas y los protocolos de experimentación animal, siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de San Martín de Porres. Se aseguró la correcta manipulación y el alojamiento adecuado de los animales, así como la administración de anestesia y analgesia para minimizar su dolor y malestar. Además, se utilizó el menor número posible de animales y se emplearon métodos alternativos a la experimentación con animales en la medida de lo posible. Todos estos aspectos éticos fueron fundamentales para garantizar la validez y la calidad de los resultados obtenidos, así como el respeto por la vida y el bienestar de los animales utilizados en el estudio.

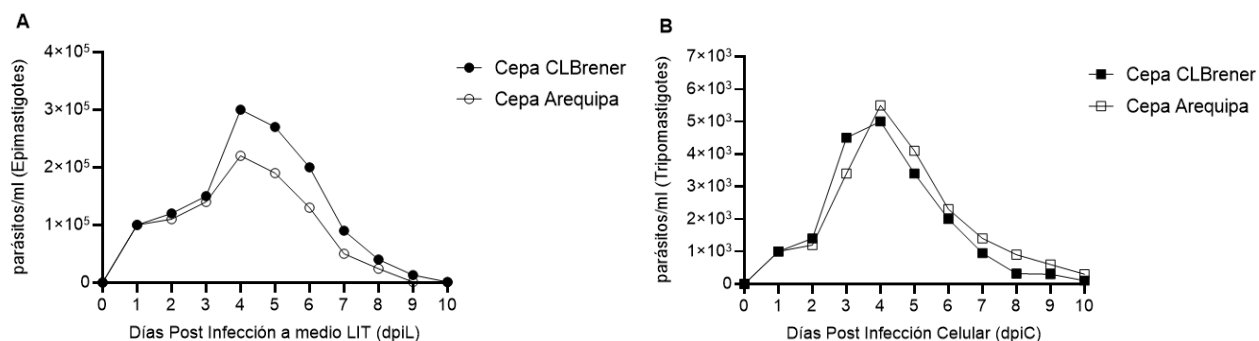
IV. RESULTADOS

4.1. Cultivo *in vitro* de *T. cruzi*

Los tripomastigotes y epimastigotes fueron mantenidos en cultivo *in vitro* en células LLC MK2 con medio RPMI y medio LIT sin células respectivamente. El tiempo óptimo de colecta de parásitos se estableció en el día 4 luego del momento de la infección a células (tripomastigotes) o inducción de transformación en medio LIT (epimastigotes) durante 1 mes (Figura 6). De esta manera para la elaboración de antígeno lisado total la colecta de epimastigotes de la cepa CLBrenner fue mayor con $1.3 \times 10^6 \pm 6.4 \times 10^4$ parásitos/ml frente a $9.7 \times 10^5 \pm 4.4 \times 10^4$ parásitos/ml de la cepa Arequipa, la colecta de tripomastigotes mostro cantidades menores siendo $1.9 \times 10^4 \pm 6.2 \times 10^2$ parásitos/ml de la cepa CLBrenner y $2.48 \times 10^4 \pm 6.3 \times 10^2$ parásitos/ml de la cepa Arequipa (Tabla 2).

Figura 6

Curva de crecimiento in vitro de T. cruzi.



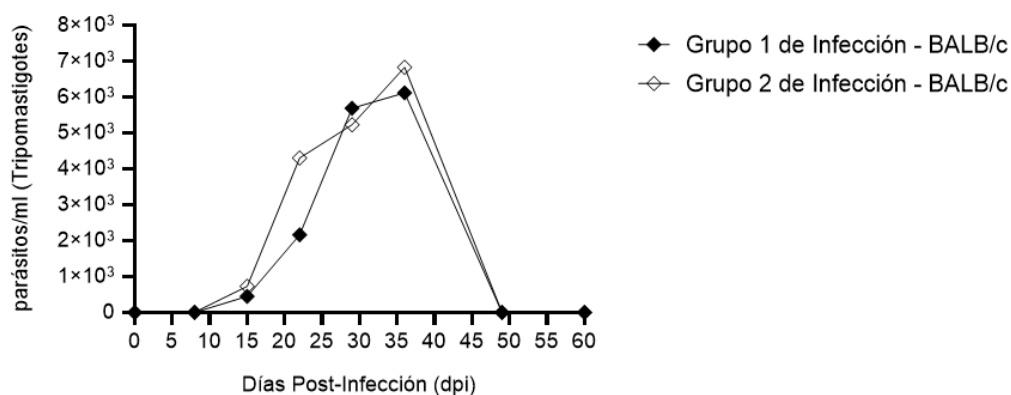
Nota. Se observa la mayor cantidad de parásitos a los 4 días post infección a medio LIT (epimastigotes) y células LLCMK2 (tripomastigotes) para ambas cepas cultivadas *in vitro*.

4.2. Obtención de muestras de plasma

La infección de los 2 grupos de ratones BALB/c se realizó con 10^4 tripomastigotes de la cepa Arequipa, el examen microscópico se realizó en los días 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 60 días post infección (dpi), la mayor cantidad de parásitos contabilizados se obtuvo a 36 dpi para ambos grupos (6118 parásitos/ml promedio, DS: 1059 para el grupo 1 de infección, 6832 parásitos/ml promedio, DS: 1247 para el grupo 2 de infección). La cantidad de parásitos más baja se observó a los 8 dpi, las cantidades reportadas se mantienen por debajo de 30 parásitos/ml (4.67 promedio, DS: 8 para el grupo 1 y 9.33 promedio, DS: 16 para el grupo 2) (Figura 7). Los ratones infectados a 49 y 60 dpi no mostraron parásitos durante el examen microscópico.

Figura 7

Examen Microscópico de referencia para los grupos de infección



Nota. Se observa la cantidad de tripomastigotes contabilizados por cada día post-infección para los grupos 1 y 2 de infección: Grupo 1 de infección: 8 dpi: 4.67 ± 8.08 p/ml, 15 dpi: 452.67 ± 32.33 p/ml, 22 dpi: 2165.33 ± 726.16 p/ml, 29 dpi: 5693.33 ± 2208.33 p/ml, 36 dpi: 6118.00 ± 1058.74 p/ml. Grupo 2 de infección: 8 dpi: 9.33 ± 16.17 p/ml, 15 dpi: 728.00 ± 327.43 p/ml, 22 dpi: 5226.67 ± 2360.37 p/ml, 29 dpi: 5226.67 ± 491.66 p/ml y 36 dpi: 6832.00 ± 1247.34 , 49 y 60

dpi: 0 ± 0 p/ml. Los valores mostrados representan el promedio de 3 individuos para cada día post-infección en ambos grupos, excepto para 60 y 36 dpi del grupo 2, solo presentaron 1 y 2 individuos infectados respectivamente.

Tabla 2

Conteo de parásitos para la elaboración de antígeno lisado total

Estadio N° de Colecta	Epimastigote		Tripomastigote	
	CLBrener	Arequipa	CLBrener	Arequipa
1	3.0×10^5	2.2×10^5	5.0×10^3	5.5×10^3
2	2.5×10^5	2.0×10^5	4.1×10^3	6.0×10^3
3	4.0×10^5	3.0×10^5	4.4×10^3	7.0×10^3
4	3.5×10^5	2.5×10^5	5.5×10^3	6.3×10^3
Total	1.3×10^6	9.7×10^5	1.9×10^4	2.5×10^4
DS	6.45×10^4	4.35×10^4	6.24×10^2	6.27×10^2

4.3. Selección de Péptidos Superficiales Sintéticos

Los péptidos superficiales sintéticos se obtuvieron de dos regiones consenso TSGI.1 y TSGI.2, el primer filtro para la selección dio como resultado 4 secuencias peptídicas que mostraron un score mayor al 0.5 para el programa bioinformático BEBIPREP – IEDB. Además, el porcentaje de conservación de estas secuencias dentro de las cepas de *T. cruzi*: Brasil A4, CL-Brener, Esmeraldo like, Non-Esmeraldo like, Sylvio X10/1, TCC, YC6 y Arequipa fue mayor o igual al 80 % (Tabla 3).

El segundo filtro para la selección de péptidos sintéticos dio como resultado 2 péptidos que mostraron el mejor score dentro de los análisis bioinformáticos de antigenicidad, accesibilidad, hidrofiliidad y hojas beta, además de presentar una homología mayor o igual al 70 % (Tabla 4).

Los péptidos superficiales sintéticos elegidos para la estandarización de ELISA indirecto fueron ED02 y ED04 (Anexo A).

Tabla 3

Selección de péptidos superficiales sintéticos a partir de regiones consenso (Primer Filtro de Selección)

Código	Secuencia Consenso	Péptidos Predichos				Porcentaje de Conservación		
		Posición Inicial	Posición Final	Secuencia de Aminoácidos (aa)	Longitud	Score Bebiprep	Homología	Identidad
ED01	TSGI.1	69	89	DDGETWETQIAIKNSRVSSVS	21	0.72	98.18% (54/55)	100.00%
ED02	TSGI.2	412	439	VDDRVSTLCSSSAGKSASKDAA	22	0.77	100.00% (18/18)	100.00%
ED03	TSGI.1	380	411	SSICTPADPAASSSERGCG	19	0.85	80.00% (44/55)	100.00%
ED04	TSGI.1	139	168	TADGKTTASIKWGSPVSLKEF	21	0.73	89.09% (49/55)	90.00%

Nota. El punto de corte establecido para la selección de secuencias peptídicas antigénicas fue de 0.5. El porcentaje de homología mínimo para aceptar la secuencia peptídica fue de 50 %. Todas las secuencias mostradas cumplen con ambos criterios para el primer filtro de selección.

Tabla 4

Análisis de la cualidad antigénica, accesibilidad, hidrofiliidad y hojas beta (Segundo Filtro de Selección)

Código	Secuencia de Aminoácidos (aa)	<i>ABCpred</i>	<i>Vaxijen</i>	<i>Kolaskar</i>	<i>Emini</i>	<i>ChouFas</i>	<i>Parker</i>	<i>IEDB</i>
		Antigenicidad: 0.5	Antigenicidad: 1.0	Antigenicidad	Accesibilidad: 1.0	Hojas Beta	Hidrofiliidad	Homología: ≥70%
ED01	DDGETWETQIAIKNSRVSSVS	0.72	1.02	0.98 < 1.036	1.79	0.96 < 1.02	2.53 < 3.53	98.18% (54/55)
ED02	VDDRVSTLCSSSAGKSASKDAA	0.77	1.19	1.049 < 1.057	1.68	1.08 < 1.16	3.87 < 4.26	100.00% (18/18)
ED03	SSICTPADPAASSSERGCG	0.85	1.05	1.02 < 1.03	1.50	1.14 < 1.18	3.12 < 4.66	80.00% (44/55)
ED04	TADGKTTASIKWGSPVSLKEF	0.73	1.09	0.99 < 1.02	1.45	0.97 < 1.12	1.49 < 3.01	89.09% (49/55)

Nota. Evaluación de antigenicidad, ABCpred (valor de referencia > 0.5), Vaxijen (valor de referencia > 1.0), Kolaskar y Tongaonkar (umbral para péptido ED01: 0.98, ED02: 1.049, ED03: 1.02 y ED04: 0.99). Evaluación de accesibilidad o exposición del epítotope, Emini (valor de

referencia > 1.0). Evaluación de presencia de hojas beta (umbral para péptido ED01: 0.96, ED02: 1.08, ED03: 1.14 y ED04:0.97). Evaluación de hidrofiliidad, Parker (umbral para péptido ED01: 2.53, ED02: 3.87, ED03: 3.12 y ED04: 1.49).

4.4. Cuantificación de antígeno lisado total y péptidos sintéticos

Se obtuvo antígeno lisado total (ALT) de ambos estadios cultivados para las cepas CLBrenner y Arequipa, para el estadio epimastigote la mayor concentración fue el ALT de CLBrenner (148.665 $\mu\text{g/ml}$) y para tripomastigote la mayor concentración fue el ALT de Arequipa (100.176 $\mu\text{g/ml}$). Los péptidos sintéticos ED02 y ED04 se reconstituyeron obteniendo concentraciones de 800000 y 860000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5

Concentración de antígeno lisado total y péptidos sintéticos

Antígeno/Péptido	Estadio	Cepa de Origen	Concentración Stock	Concentración de Trabajo
Lisado Total (ALT)	Tripomastigote	CLBrenner	36.885 $\mu\text{g/ml}^*$	1.5 $\mu\text{g/ml}$
Lisado Total (ALT)	Tripomastigote	Arequipa	100.176 $\mu\text{g/ml}^*$	1.5 $\mu\text{g/ml}$
Lisado Total (ALT)	Epimastigote	CLBrenner	148.665 $\mu\text{g/ml}^*$	1.5 $\mu\text{g/ml}$
Lisado Total (ALT)	Epimastigote	Arequipa	41.604 $\mu\text{g/ml}^*$	1.5 $\mu\text{g/ml}$
Péptido SS ED02	-	Arequipa	800 mg/ml^{**}	0.5, 1.5 $\mu\text{g/ml}$
Péptido SS ED04	-	Arequipa	860 mg/ml^{**}	0.5, 1.5 $\mu\text{g/ml}$

Nota. *Concentraciones determinadas por método de Bradford a partir de curva estándar de BSA (0 – 200 $\mu\text{g/ml}$). **Concentraciones determinadas por peso en gramos en 1 ml de agua grado molecular. SS: Superficial Sintético.

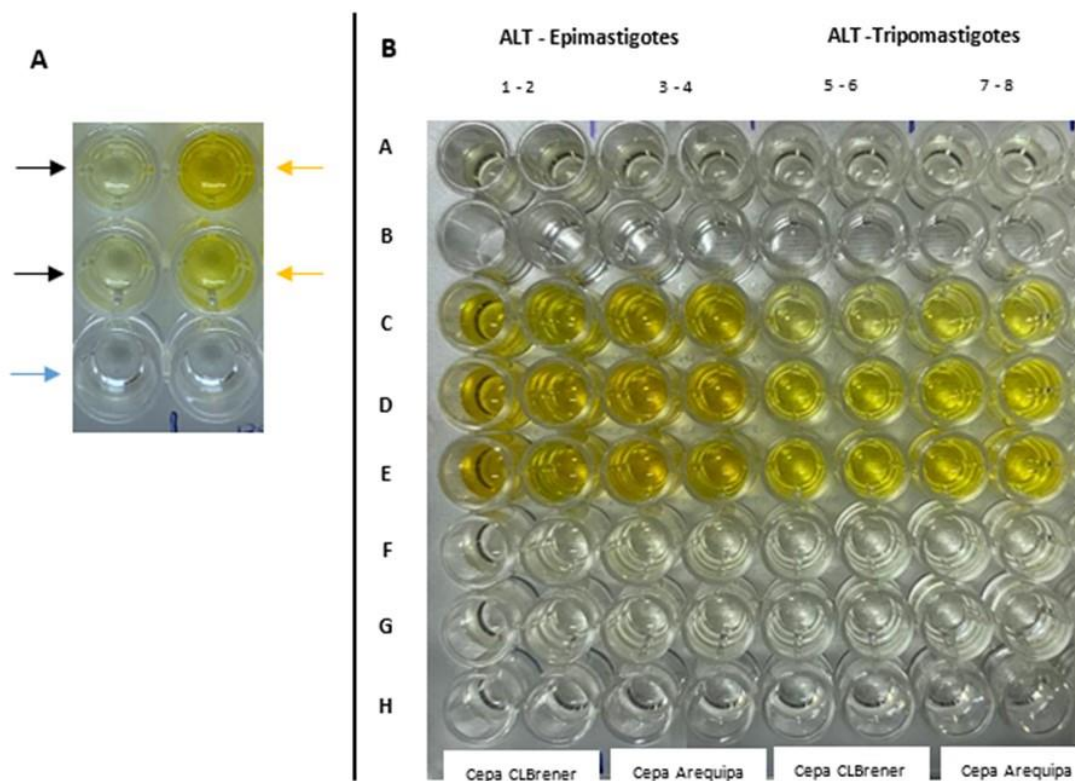
4.5. Estandarización de ELISA indirecto

4.5.1. Selección de antígeno control

La reactividad óptima de las proteínas antigénicas totales (ALT) fue estandarizada empleando sueros de ratones BALB/c infectados con las cepas CLBrener y Arequipa en dilución 1:100 y 1:500 (Anexo B). Se consideraron sueros reactivos aquellos que luego de la adición de ácido sulfúrico presentaron coloración amarilla intensa y sueros no reactivos, con coloración amarilla tenue (Figura 8). La correlación entre las muestras de plasma reactivas y ALT se determinó empleando un análisis de T-student (IC 95 %, α : 0.05) de las densidades ópticas obtenidas a partir de la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en las muestras de plasma de 22, 36 y 49 dpi. Los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas entre el antígeno lisado total de epimastigotes y tripomastigote de la cepa CLBrener (p valor = 0.2578, r = 0.73)¹ y de la cepa Arequipa (p valor = 0.1260, r = 0.93) (Figura 9).

Figura 8

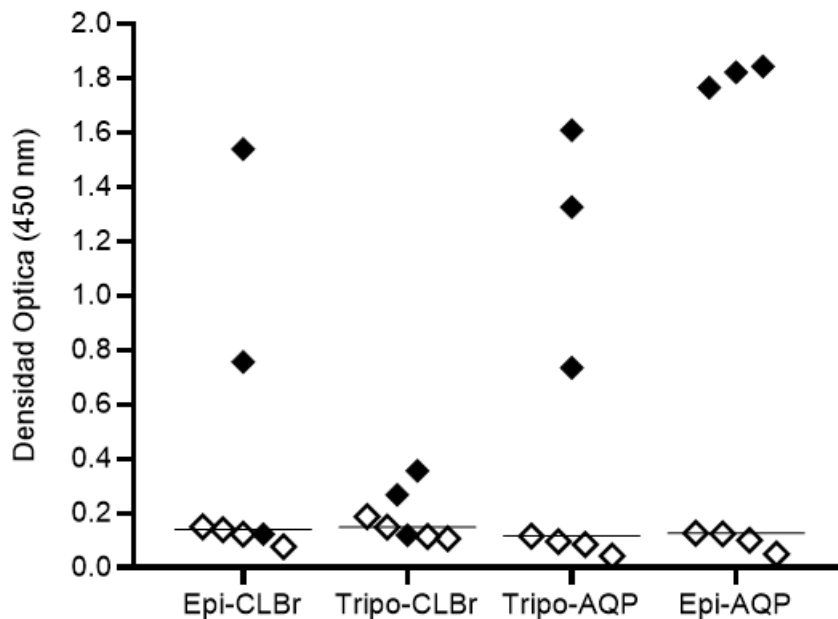
Reactividad de muestras control a antígenos lisados totales



Nota. A. Flechas negras indican muestras negativas no reactivas. Flechas amarillas indican muestras positivas reactivas. Flecha azul indica la muestra blanco en el ensayo. B. Filas F – G: controles negativos. Fila A: Control positivo 8 dpi, Fila C: Control positivo 22 dpi, Fila D: Control positivo 36 dpi, Fila E: Control positivo 49 dpi. Columnas 1 – 2: ALT de epimastigotes cepa CLBrener, Columnas 3 – 4: ALT de epimastigotes cepa Arequipa. Columnas 5 – 6: ALT de tripomastigotes cepa CLBrener, Columnas 7 – 8: ALT de tripomastigotes cepa Arequipa

Figura 9

Selección de antígeno lisado total como control de ensayos



Nota. Se muestra la densidad óptica (D.O.) de 3 controles positivos (29*, 36 y 49 dpi) (rombos negros) y 4 controles negativos (rombos blancos) empleando ALT obtenido del estadio epimastigote y tripomastigote de las cepas CLBrenner y Arequipa de *T. cruzi*. Epi-CLBr: valores entre 0.078 – 1.539 D.O., mediana: 0.140. Tripo-CLBr: valores entre 0.108 – 0.357 D.O., mediana: 0.150. Tripo-AQP: valores entre 0.044 – 1.609 D.O., mediana: 0.117. Epi-AQP: valores entre 0.051 – 1.843 D.O., mediana: 0.102, (IC 95% de valores de mediana: 98.44 %). *El valor de densidad óptica para el control positivo a 29 dpi fue: 0.124 ± 0.0000 (Epi-CLBr), 0.121 ± 0.0057 (Tripo-CLBr), 0.736 ± 0.0028 (Tripo-AQP) y 1.765 ± 0.0007 (Epi-AQP).

4.5.2. Selección de Agente de Bloqueo

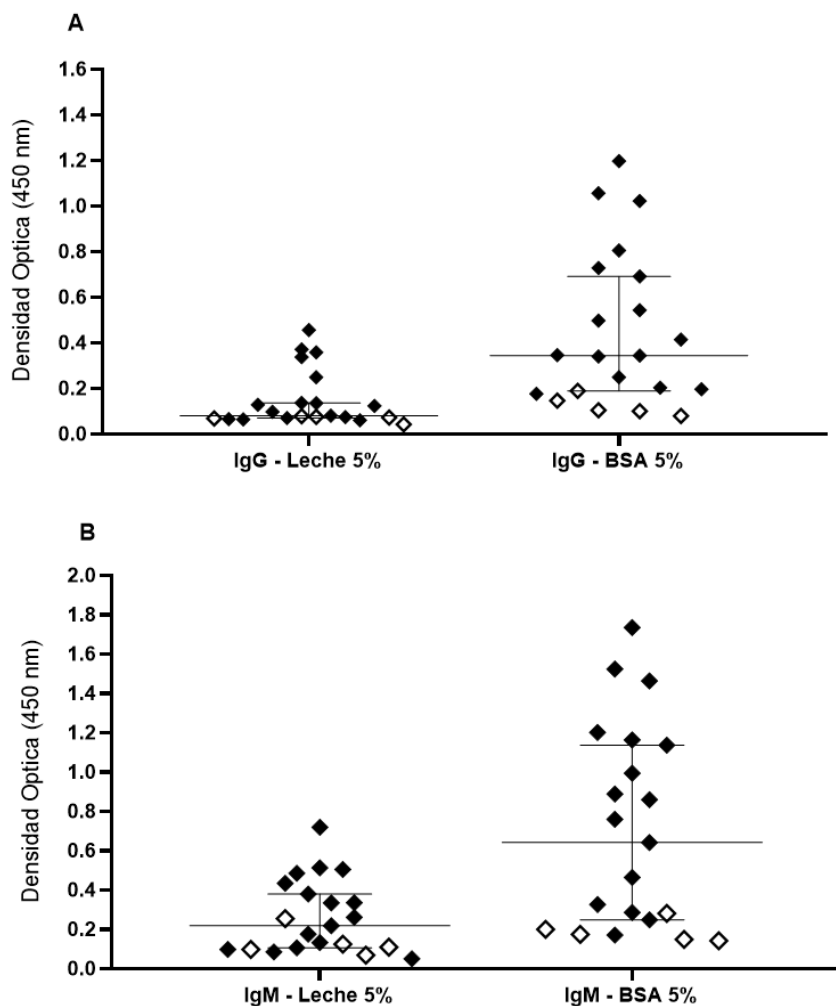
La selección del agente de bloqueo se realizó en 2 ensayos, el primero, sensibilizando la microplaca de ELISA con antígeno lisado total de tripomastigotes de la cepa Arequipa (Tripo-AQP) y el segundo sensibilizando dos microplacas para los péptidos ED02 y ED04. Se evaluaron dos agentes de bloqueo, albumina sérica bovina al 5 % (BSA) y leche en polvo al 5 %, el análisis se realizó empleando como anticuerpo secundario anti-IgM y anti-IgG de ratón en dilución 1:3000 y 1:5000 respectivamente.

Para la selección de agente de bloqueo empleando ALT-Tripo-AQP, se emplearon 21 muestras, 5/21 fueron controles negativos y los controles positivos se agruparon entre población aguda (8 – 22 dpi: 9/21) y población crónica (29 – 49 dpi: 7/21). Para la selección de agente de bloqueo empleando péptidos ED02 y ED04 se utilizaron 19 y 18 muestras para la detección de anticuerpos IgG e IgM respectivamente, agrupados de la siguiente manera: 10/19 y 9/18 controles negativos (IgG e IgM respectivamente), población aguda (22 dpi: 3/19) y población crónica (36 y 49 dpi: 6/19).

Se demuestra la existencia de diferencias significativas entre el uso de leche al 5% y BSA al 5 % para la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi* tanto para el uso de antígeno lisado total (p valor < 0.0001, r = 0.89) como para los péptidos sintéticos (ED02: p valor = 0.0004, r = 0.97 y ED04: p valor = 0.0003, r = 0.97). De la misma manera, para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* existieron diferencias significativas entre ambos agentes de bloqueo (ALT-Tripo-AQP: p valor < 0.0001, r = 0.86, ED02: p valor = 0.0002, r = 0.90, ED04: p valor = 0.0017, r = 0.84) (Figura 10 y Figura 11).

Figura 10

Selección de Agente de Bloqueo empleando Antígeno Lisado Total

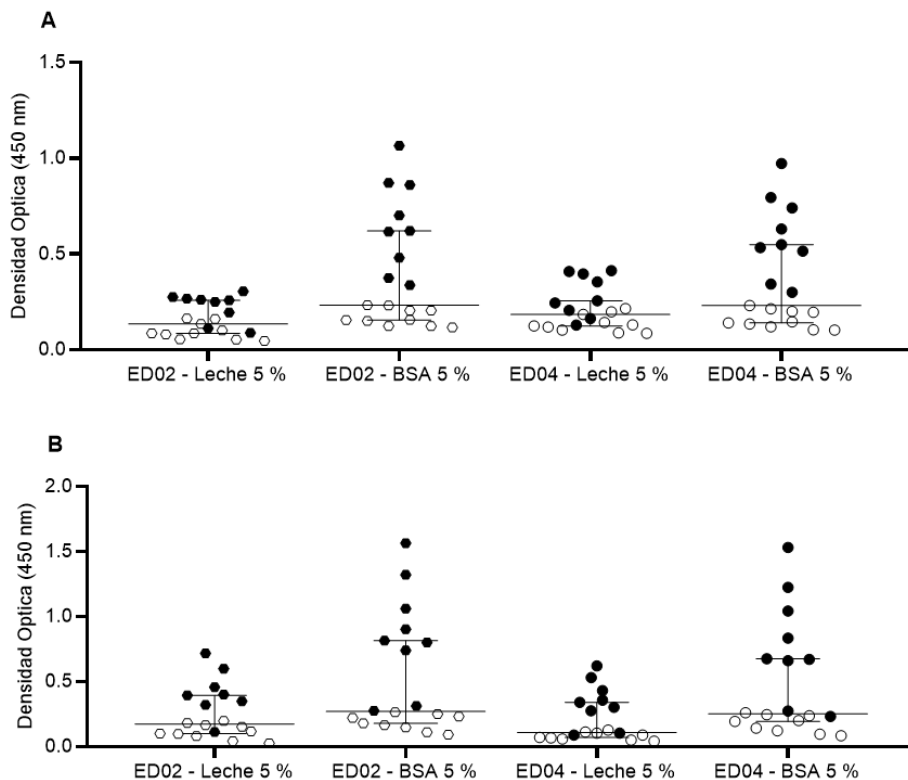


Nota. Los controles positivos de 8 a 49 dpi se representan como rombos negros y los controles negativos se representan como rombos blancos. A. Detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*, para leche al 5 % el rango de valores de densidad óptica oscila entre $0.042 \pm 0.014 - 0.456 \pm 0.003$, mediana: 0.080^* , para BSA al 5 % el rango oscila entre $0.079 \pm 0.044 - 1.197 \pm 0.257$ D.O., mediana: 0.345^* . B. Detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi*, leche al 5 %: $0.050 \pm 0.072 - 0.719 \pm 0.171$ D.O., mediana: 0.219^* , BSA al 5 %: $0.142 \pm 0.056 - 1.735 \pm 0.492$, mediana: 0.642^* .

*IC_{95%}: 97.34 %.

Figura 11

Selección de Agente de Bloqueo empleando Péptidos Superficiales Sintéticos



Nota. Los controles positivos de 22 a 49 dpi se representan como rombos negros y los controles negativos se representan como rombos blancos. A. Selección de agente de bloqueo para la detección de anticuerpos IgG. ED02: leche 5 %: $0.096 \pm 0.043 - 0.282 \pm 0.020$ D.O., mediana: 0.134^* , BSA 5 %: $0.170 \pm 0.045 - 0.878 \pm 0.183$ D.O., mediana: 0.233^* . ED04: leche 5 %: $0.138 \pm 0.045 - 0.355 \pm 0.096$ D.O., mediana: 0.184^* y BSA 5 %: $0.158 \pm 0.047 - 0.799 \pm 0.171$ D.O., mediana: 0.230^* . B. Selección de agente de bloqueo para la detección de anticuerpos IgM. ED02: leche 5 %: $0.119 \pm 0.061 - 0.465 \pm 0.117$, mediana: 0.174^{**} , BSA 5 %: $0.185 \pm 0.061 - 1.094 \pm 0.410$, mediana: 0.270^{**} . ED04: leche 5 %: $0.081 \pm 0.030 - 0.421 \pm 0.174$, mediana: 0.109^{**} , BSA 5 %: $0.176 \pm 0.067 - 1.013 \pm 0.454$, mediana: 0.253^{**} . $^*IC_{95\%}: 98.08 \%$, $^{**}IC_{95\%}: 96.91 \%$.

4.5.3. Estandarización de Concentración de Péptido Superficial Sintético

La concentración adecuada de péptido sintético para sensibilizar las microplacas (MaxiSorp Nunc) se evaluó entre 0.5 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$. Fueron evaluadas 15 muestras de plasma agrupadas de la siguiente manera: 5/17 controles negativos, 10/15 controles positivos (8 dpi: 1/15, 22 dpi: 3/15, 36 – 49 dpi: 6/15). El péptido sintético ED02 mostro diferencias significativas entre ambas concentraciones (p valor = 0.0175, r = 0.99), el péptido sintético ED04 no mostró diferencias significativas (p valor = 0.9119, r = 0.99). Los resultados de densidad óptica (D.O.) de los controles negativos estuvieron por debajo de 0.250 y los controles positivos mostraron valores por encima de 0.300 para ambas concentraciones (Figura 12).

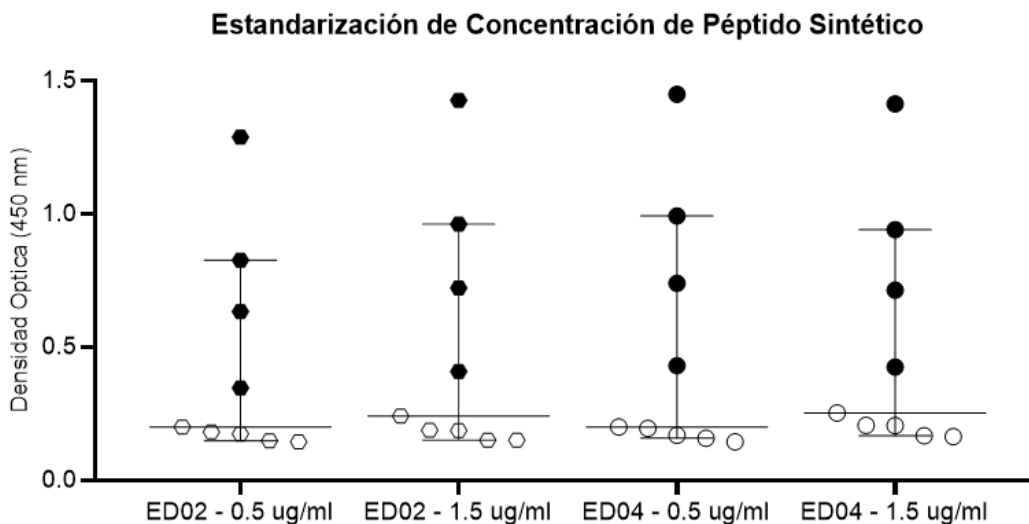
4.5.4. Estandarización de Diluciones de Anticuerpo Primario y Secundario

La dilución adecuada de anticuerpo primario (plasma de ratón) se evaluó en las diluciones 1:100 y 1:500 tomando 28 muestras agrupadas de la siguiente manera: 10/28 fueron controles negativos, 18/28 fueron controles positivos (8, 15, 22, 29, 36 y 49 dpi). Para este análisis se considerando los valores de densidad óptica obtenidos en un ensayo previo empleando ALT-Tripo-AQP (Anexo C) se empleó 1:5000 como dilución de anticuerpo secundario anti-IgG HRP de ratón. Los valores de D.O. entre ambas diluciones fueron significativamente diferentes para ambos péptidos sintéticos (ED02: p valor = 0.0002, r = 0.98 y ED04: p valor <0.0001, r = 0.99). La mayor D.O. se observó a los 36 dpi (ED02: 0.865 y ED04: 0.866) en dilución 1:100, el resultado de los controles negativos se mantuvo por debajo de 0.281 para la dilución 1:100 y por debajo de 0.200 para la dilución 1:500 (Figura 13).

La dilución adecuada para el anticuerpo secundario anti-IgG HRP de ratón se evaluó en 1:3000 y 1:5000 y la dilución para el anticuerpo secundario anti-IgM HRP de ratón se evaluó en 1:3000, 1:5000 y 1:10000. Los ensayos con anticuerpo IgG emplearon un total de 29 muestras de

plasma agrupadas de la siguiente manera: 10/29 controles negativos (grupo 1 y grupo 2), 18/29 controles positivos (15, 22, 29, 36, 60 dpi del grupo 2 y 49 dpi del grupo 1 de ratones infectados). Los ensayos con anticuerpo IgM emplearon un total de 23 muestras de plasma agrupadas de la siguiente manera: 7/23 controles negativos, 16/23 controles positivos (15, 22, 29, 36, 60 dpi del grupo 2 y 49 dpi del grupo 1 de ratones infectados).

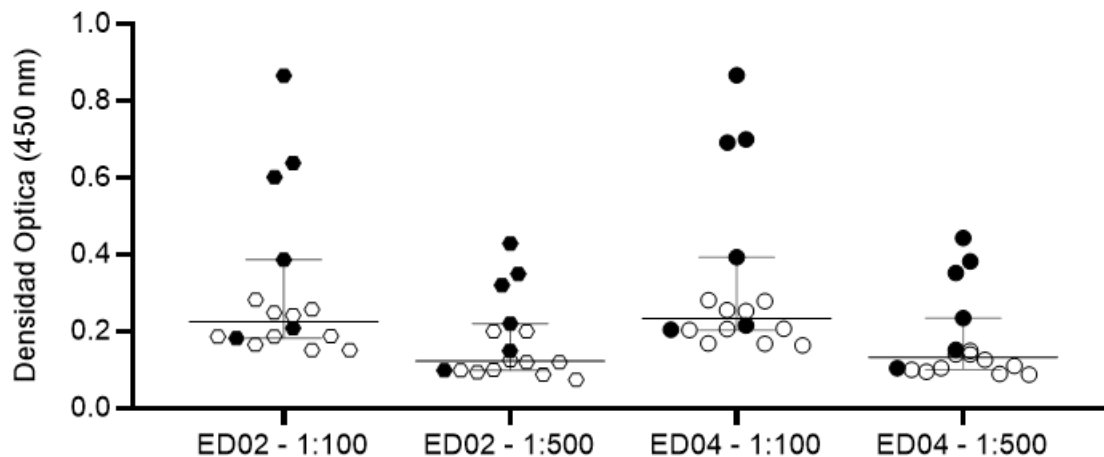
Respecto a la estandarización de dilución óptima de anticuerpos anti-IgG HRP de ratón, los valores de D.O. obtenidos para las diluciones 1:3000 y 1:5000 fueron significativamente diferentes para los péptidos sintéticos ED02 y ED04 (p valor ≤ 0.0001 , $r = 0.97$ y 0.94 respectivamente), el valor promedio de D.O. para los controles negativos a 1:3000 fue de 0.448 (SD: 0.093) para el péptido ED02 y 0.422 (SD: 0.097) para el péptido ED04, la dilución 1:5000 mostró valores de D.O. de 0.219 (SD: 0.045) para ED02 y 0.206 (SD: 0.048) para ED04 (Figura 14^a). Respecto a la estandarización de dilución óptima de anticuerpos anti-IgM HRP de ratón, el análisis de ANOVA unidireccional indicó que los valores de D.O. obtenidos para las diluciones 1:3000, 1:5000 y 1:10000 para el péptido sintético ED02 son significativamente diferentes (p valor < 0.0001 , $r = 0.80$), el valor promedio de D.O. en la dilución 1:3000 para los controles negativos fue de 0.283 (SD: 0.060), 1:5000, 0.191 (SD: 0.057), 1:10000, 0.178 (SD: 0.046) (Figura 14B).

Figura 12*Estandarización de Concentración de Péptido Sintético*

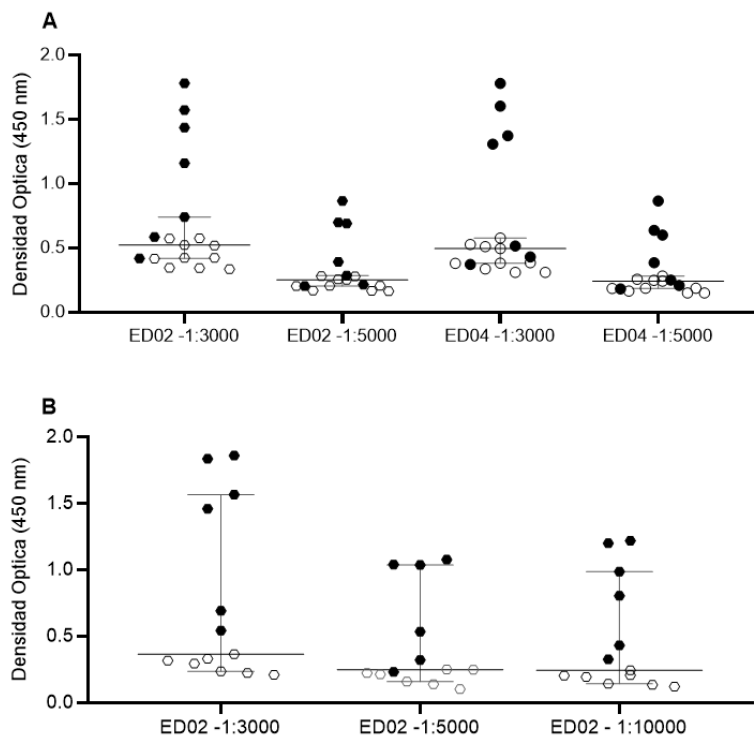
Nota. Péptido ED02. Valores de D.O a 8 dpi para concentración 0.5 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 0.347, 0.409 respectivamente (DS: 0.044), valores de D.O. a 22 dpi 0.634*, 0.722* respectivamente (DS: 0.062), valores de D.O. a 36 dpi 1.288*, 1.426* respectivamente (DS: 0.097), valores de D.O. a 49 dpi 0.826*, 0.961* respectivamente (DS: 0.096). Péptido ED04. Valores de D.O. a 8 dpi para concentración 0.5 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 0.430, 0.425 respectivamente (DS: 0.004), valores de D.O. a 22 dpi 0.740*, 0.714* respectivamente (DS: 0.018), valores de D.O. a 36 dpi 1.449*, 1.413* respectivamente (DS: 0.026), valores de D.O. a 49 dpi 0.992*, 0.941* respectivamente (DS: 0.036). *los valores de D.O. corresponden al promedio de 3 muestras de plasma para los dpi mostrados provenientes del grupo 1 de ratones infectados.

Figura 13

Estandarización de Dilución de Anticuerpo Primario: Péptidos Superficiales Sintéticos



Nota. Los valores de D.O. mostrados corresponden a la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. Los controles negativos se representan como hexágonos y círculos blancos para los péptidos sintéticos ED02 y ED04 respectivamente, los controles positivos se representan como hexágonos y círculos negros. Péptido ED02: Dilución 1:100, valores de D.O. entre $0.206 \pm 0.048 - 0.881 \pm 0.135$, mediana: 0.225^* . Dilución 1:500, valores de D.O. entre $0.128 \pm 0.019 - 0.402 \pm 0.070$, mediana: 0.215^* . Péptido ED04: Dilución 1:100, valores de D.O. entre $0.198 \pm 0.082 - 0.762 \pm 0.125$, mediana: 0.234^* y dilución 1:500, valores de D.O. entre $0.129 \pm 0.021 - 0.379 \pm 0.036$, mediana: 0.133^* . $^*IC_{95\%}: 97.87\%$. Los valores mostrados para controles positivos corresponden al promedio de 3 muestras para cada dpi del grupo 2 de ratones infectados.

Figura 14*Estandarización de Dilución de Anticuerpo Secundario: Péptidos Superficiales Sintéticos*

Nota. Controles negativos (CN): hexágono y círculo blanco, controles positivos (CP): hexágono y círculo negro. A. Estandarización de anticuerpo secundario anti-IgG HRP de ratón, ED02: 1:3000, valores de D.O. entre 0.336 (CN: 0.448 ± 0.093) y 1.780 (MED CP: 1.099 ± 0.525), mediana: 0.523*. 1:5000, D.O. entre 0.164 (MED CN: 0.219 ± 0.045) y 0.866 (MED CP: 0.479 ± 0.269), mediana: 0.253*. ED04: 1:3000, D.O. entre 0.310 (MED CN: 0.422 ± 0.097) – 1.779 (MED CP: 1.054 ± 0.597), mediana: 0.496*. 1:5000, D.O. entre 0.151 (MED CN: 0.206 ± 0.048) – 0.865 (MED CP: 0.447 ± 0.259), mediana: 0.242*. B. Estandarización de anticuerpo secundario anti-

IgM HRP de ratón, ED02: 1:3000, D.O. entre 0.210 (MED CN: 0.283 ± 0.060) – 1.859 (MED CP: 1.325 ± 0.572), mediana: 0.365**. 1:5000, D.O. entre 0.103 (MED CN: 0.191 ± 0.057) – 1.076 (MED CP: 0.707 ± 0.390), mediana: 0.249**. 1:10000, D.O. entre 0.122 (MED CN: 0.178 ± 0.046) – 1.219 (MED CP: 0.828 ± 0.380), mediana: 0.244**. *IC_{95%}: 95.10 % (0.42 – 0.74), ** IC_{95%}: 97.75 % (0.24 – 1.57).

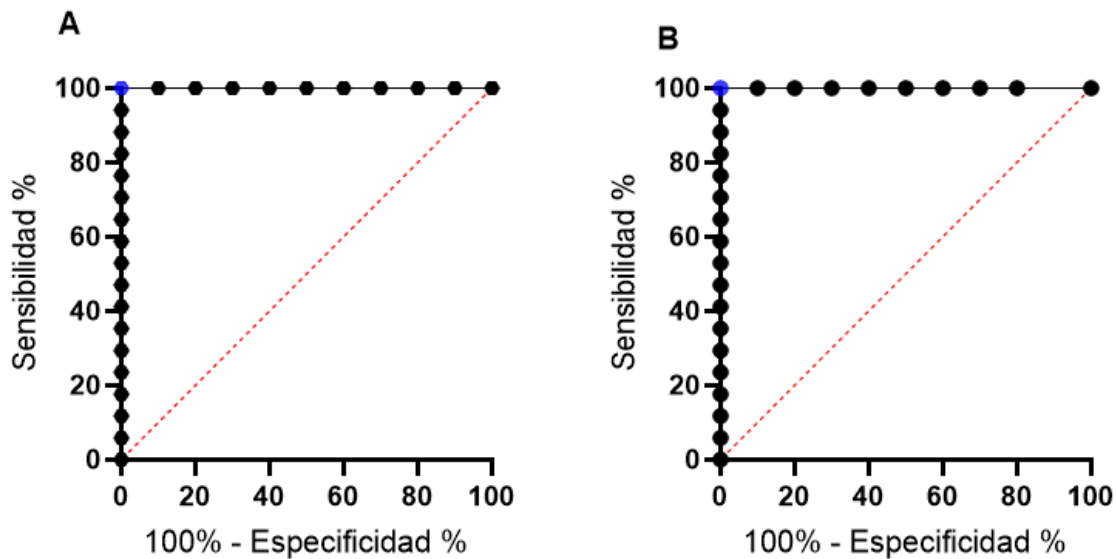
4.6. Establecimiento de Punto de Corte

El punto de corte para la técnica de ELISA empleando péptidos superficiales sintéticos se estableció para la detección de anticuerpos IgM e IgG. Se emplearon 27 muestras de plasma agrupadas de la siguiente manera: 10/27 controles negativos, 17/27 controles positivos (población aguda: 15 – 36 dpi (12/27), población crónica 49 – 60 dpi (5/27)). El área bajo la curva (AUC) para la detección de anticuerpos IgM e IgG fue 1.0 (p valor < 0.0001) empleando ambos péptidos sintéticos (Figura 15), los puntos de corte para la detección de anticuerpos IgG fueron 0.249 D.O. y 0.243 D.O. para ED02 y ED04 respectivamente (Índice de Youden: 100.00 para ambos casos), para la detección de anticuerpos IgM los puntos de corte fueron 0.262 D.O. y 0.257 D.O. (Índice de Youden: 100.00 para ambos casos) (Figura 16).

El análisis empleando antígeno lisado total (ALT-Tripo-AQP) para la detección de anticuerpos IgG mostró un área bajo la curva (AUC) de 0.953 (p valor = 0.0001) estableciendo el punto de corte en 0.132 D.O. (Índice de Youden: 84.1). La detección de anticuerpos IgM mostró un AUC de 0.99 (p valor = 0.0001) (Figura 17), el punto de corte se estableció en 0.283 D.O. (Índice de Youden: 91.7).

Figura 15

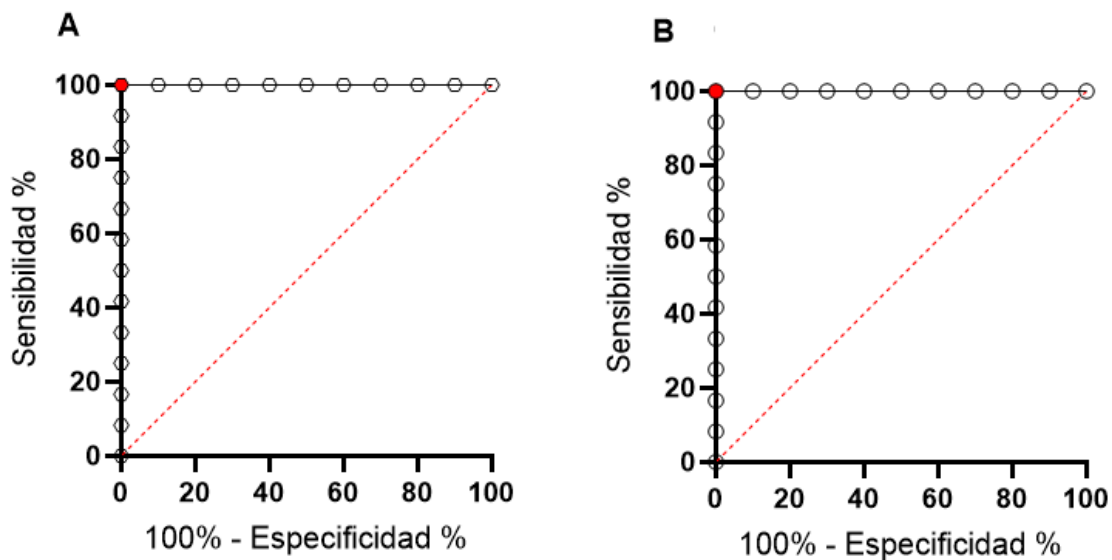
Curva ROC-IgG: Péptidos Superficiales Sintéticos



Nota. Análisis de Curva ROC para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. A. Curva ROC para péptido superficial sintético ED02, AUC*: 1.0. B. Curva ROC para péptido superficial sintético ED04, AUC*: 1.0 El hexágono y el círculo azul indican los valores de punto de corte: 0.249 y 0.243 para ED02 y ED04 respectivamente. *IC_{95%}: 1.00 – 1.00

Figura 16

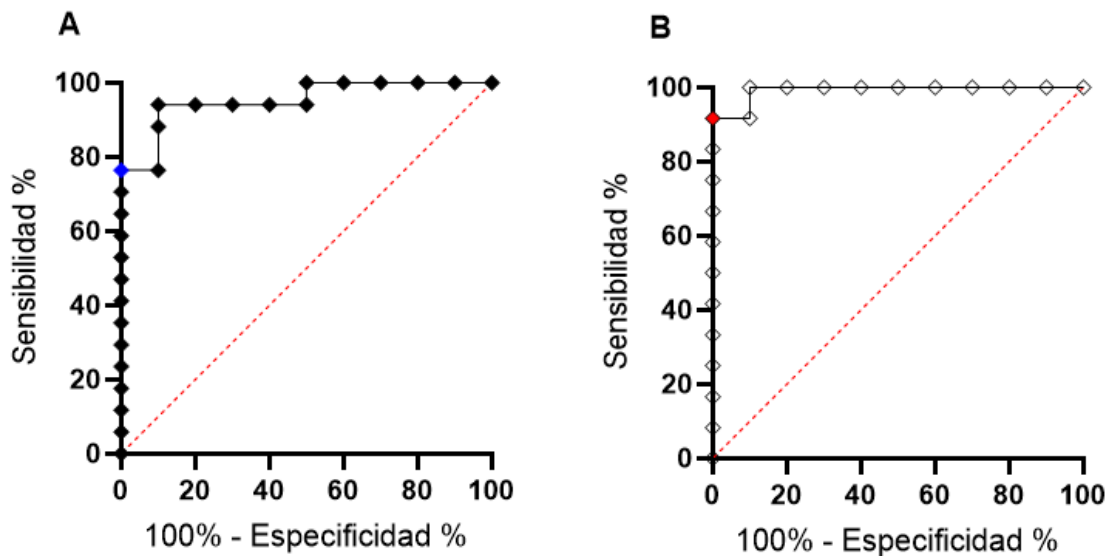
Curva ROC-IgM: Péptidos Superficiales Sintéticos



Nota. Análisis de Curva ROC para la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi*. A. Curva ROC para péptido superficial sintético ED02, AUC*: 1.0. B. Curva ROC para péptido superficial sintético ED04, AUC*: 1.0. El hexágono y el círculo rojo indican los valores de punto de corte: 0.262 para ED02 y 0.257 para ED04. *IC_{95%}: 1.00 – 1.00

Figura 17

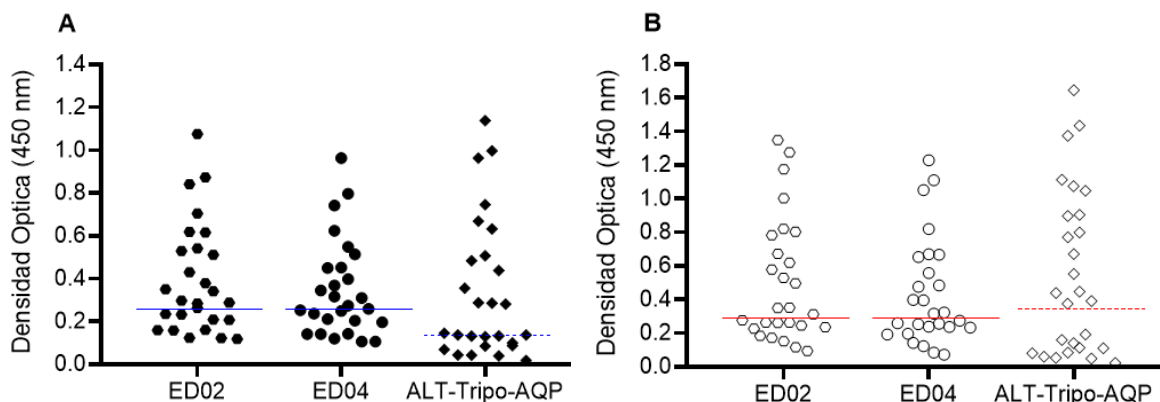
Curva ROC-IgG/IgM: Antígeno Lisado Total



Nota. A. Curva ROC para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*, AUC*: 0.95 (error estándar: 0.03823). B. Curva ROC para la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi*, AUC**: 0.99 (error estándar: 0.01354). El rombo azul indica el valor de punto de corte: 0.132 y el rombo rojo indica el punto de corte: 0.283. *IC_{95%}: 0.88 – 1.00, **IC_{95%}: 0.97 – 1.00.

Figura 18

Comparación de detección de anticuerpos IgM e IgG: Péptidos Superficiales Sintéticos vs ALT-Tripo-AQP



Nota. A. Detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*, las líneas azules solidas representan el punto de corte establecido en 0.249 para ED02 y 0.243 para ED04, la línea azul punteada representa el punto de corte establecido en 0.132 para ALT-Tripo-AQP. Los valores de D.O. son significativamente diferentes (p valor = 0.0323*, F: 4.842). B. Detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi*, las líneas rojas solidas representan el punto de corte establecido en 0.262 para ED02 y 0.257 para ED04, la línea roja punteada representa el punto de corte establecido en 0.282 para ALT-Tripo-AQP. Los valores de D.O. son significativamente diferentes (p valor = 0.0197**, F: 5.832). *Comparación de datos efectiva por prueba exacta de Fisher (F: 40.54, R: 0.95) con p valor < 0.0001. **Comparación de datos efectiva por prueba exacta de Fisher (F: 25.38, R: 0.92) con p valor < 0.0001. Análisis realizado por ANOVA de una vía.

4.7. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto

La sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi* empleando péptidos sintéticos y ALT se determinó mediante la elaboración de tablas de contingencia tomando una prevalencia del 63 % (Anexo D). Empleando los péptidos ED02 y ED04 se determinó una sensibilidad y especificidad del 100.00 % para la detección de ambos tipos de anticuerpos. Empleando antígeno lisado total la sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos IgM fue 100.00 % y 90.91 % y para la detección de anticuerpos IgG fue 93.75 % y 81.82 % respectivamente (Tabla 6 y 7).

Tabla 6

Sensibilidad y Especificidad para la detección de anticuerpos IgG contra T. cruzi

Antígeno/Péptido	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%	VPP (%)	VPN (%)	Precisión (%)
ED02	100.00	80.49 - 100.00	100.00	69.15 - 100.00	100.00	100.00	100.00
ED04	100.00	80.49 - 100.00	100.00	69.15 - 100.00	100.00	100.00	100.00
ALT-Tripo-AQP	93.75	69.77 - 99.84	81.82	48.22 - 97.72	89.77	88.49	89.34

Nota. Los IC_{95%} para VPP IgG ED02 y ED04 (%): 100.00 – 100.00, para ALT-Tripo-AQP: 71.35 – 96.87 y los IC_{95%} IgM ED02 (%): 100.00 – 100.00, IgM ED04 y ALT-Tripo-AQP: 74.29 – 99.18.

Tabla 7

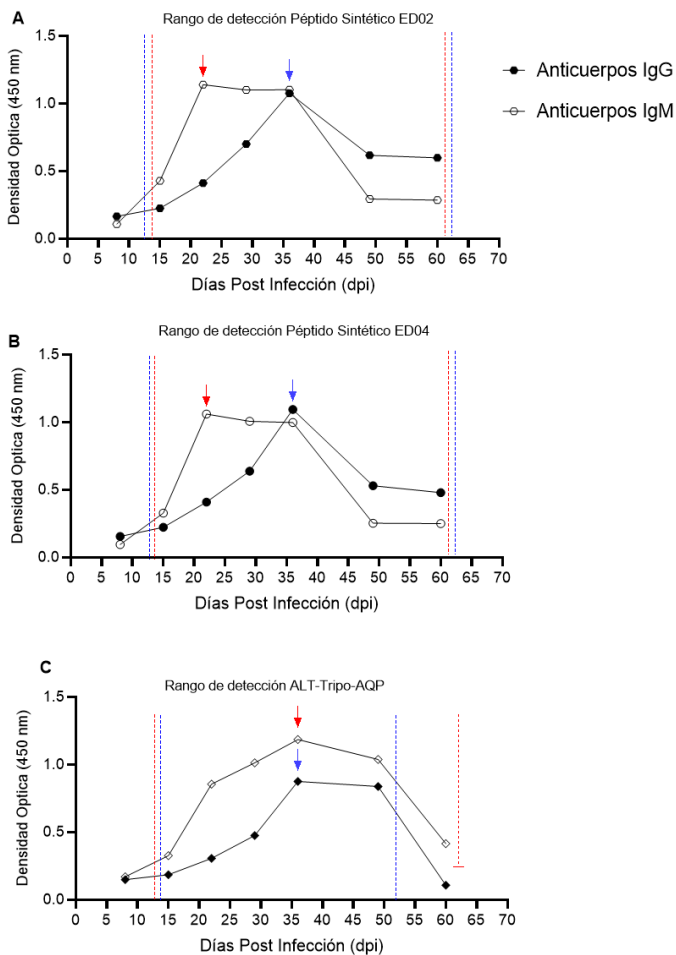
Sensibilidad y Especificidad para la detección de anticuerpos IgM contra T. cruzi

Antígeno/Péptido	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%	VPP (%)	VPN (%)	Precisión (%)
ED02	100.00	80.49 - 100.00	100.00	69.15 - 100.00	100.00	100.00	100.00
ED04	100.00	79.41 - 100.00	90.91	58.72 - 99.77	94.93	100.00	96.64
ALT-Tripo-AQP	100.00	79.41 - 100.00	90.91	58.72 - 99.77	94.93	100.00	96.64

Nota. Los IC_{95%} para VPP IgG ED02 y ED04 (%): 100.00 – 100.00, para ALT-Tripo-AQP: 71.35 – 96.87 y los IC_{95%} IgM ED02 (%): 100.00 – 100.00, IgM ED04 y ALT-Tripo-AQP: 74.29 – 99.18.

Figura 19

Cinética de anticuerpos y rangos de detección: ALT-Tripo-AQP y Péptidos Superficiales Sintéticos



Nota. A. Cinética de anticuerpos para péptido ED02 (rango de detección IgM/IgG 15 dpi – 60 dpi).

B. Cinética de anticuerpos para péptido ED04 (rango de detección IgM/IgG 15 dpi – 60 dpi).

C. Cinética de anticuerpos para ALT-Tripo-AQP (línea punteada azul: rango de detección IgG 22 dpi

– 49 dpi, línea punteada roja: rango de detección IgM 15 dpi – 60 dpi). Flecha roja indica el pico

máximo de reactividad para anticuerpos IgM (22 dpi para ED02 y ED04, 36 dpi para ALT-Tripo-

AQP) y la flecha azul indica el pico máximo de reactividad para anticuerpos IgG (36 dpi para

ED02, ED04 y ALT-Tripo-AQP).

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos se acepta la hipótesis nula (H_0) para la detección de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi*, los porcentajes de sensibilidad y especificidad calculados para los péptidos sintéticos no muestran diferencia significativa (p valor: 0.2892) respecto al antígeno control, este análisis se encuentra relacionado a la comparación estadística por Kruskal-Wallis de los valores de densidad óptica entre los 3 grupos de interés (ED02, ED04 y ALT-Tripo-AQP), siendo para la detección de anticuerpos IgG (H: 2.898, p valor: 0.235) y anticuerpos IgM (H: 0.388, p valor: 0.824) en ambos casos no se encontraron diferencias significativas.

Cabe destacar que, a pesar de no existir diferencia significativa a nivel estadístico, el valor biológico de los datos obtenidos es importante en cuanto a la detección de los anticuerpos IgG e IgM asociados a la enfermedad de Mal de Chagas, de esta manera los péptidos superficiales sintéticos ED02 y ED04 muestran una porcentaje mayor de sensibilidad, 100.00 %, en comparación a 93.75 % empleando antígeno control lisado total de tripomastigotes de la cepa Arequipa (ALT-Tripo-AQP), además se obtuvo 100.00 % de especificidad para los péptidos sintéticos y 81.82 % para el ALT-Tripo-AQP. Respecto a la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi* los mayores valores diagnósticos fueron obtenidos empleando el péptido superficial sintético ED02, con una sensibilidad del 100.00 % y especificidad del 100.00 % en comparación al ALT-Tripo-AQP con 100.00 % y 90.91 % de sensibilidad y especificidad respectivamente (Tabla 6 y 7).

Es necesario que una prueba diagnóstica tenga una precisión alta tanto en sensibilidad como en especificidad para poder identificar de forma precisa los casos positivos y negativos en una población. Si una prueba tiene una sensibilidad alta, pero una especificidad baja, se pueden generar resultados falsos positivos. Por otro lado, si una prueba tiene una especificidad alta pero

una sensibilidad baja, se pueden producir resultados falsos negativos. En ambos casos, existe el riesgo de que los casos no sean diagnosticados o tratados de manera incorrecta. El alto porcentaje de sensibilidad y especificidad reportados para ambos péptidos sintéticos permite presentarlos como una alternativa al ensayo de ELISA convencional para el diagnóstico de Mal de Chagas debido a la elevada probabilidad de identificar pacientes verdaderamente positivos y negativos y un bajo o nulo porcentaje de pacientes falsos positivos y falsos negativos.

El índice de concordancia de Kappa de Cohen entre los ensayos de referencia (examen directo microscópico y ELISA convencional IgG) se determinó para la detección de la fase aguda de la enfermedad (15 hasta 36 dpi) y la fase crónica (15 hasta 60 dpi), las muestras de plasma se agruparon de la siguiente manera, fase aguda: ED02/ED04: 10/22 controles negativos, 12/22 controles positivos, fase crónica: 10/27 controles negativos, 17/27 controles positivos. El índice Kappa para la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi* empleando ED02 y ED04 fue de 1.00 (IC_{95%}: 0.58 – 1.00), empleando ALT-Tripo-AQP fue 0.91 (IC_{95%}: 0.50 – 1.00), para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* empleando ED02 y ED04 fue de 0.77 (IC_{95%}: 0.47 – 1.00) (Anexo E). Mostrando para todos los casos una concordancia de sustancial a casi perfecta para una prevalencia de 0.63 y un tamaño muestral mayor o igual a 20 (Blackman & Koval, 2000; Landis & Koch, 1977) (Anexo F).

5.1. Proteínas Antigénicas y Péptidos Superficiales Sintéticos

El cultivo in vitro de *T. cruzi* permitió obtener extracto de proteínas totales del estadio epimastigote y tripomastigote. Existen proteínas intracelulares y de superficie estadio-específicas presentes en la etapa aguda y crónica de la enfermedad de Chagas (Affranchino et al., 1989; Grauert et al., 1993; Ohyama et al., 2016) que estimulan a los linfocitos B generando una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos que son reconocidos mediante ensayos serológicos,

como la técnica de ELISA (Betônico et al., 1999; Flores-Chávez et al., 2010; Houghton et al., 2000; Mucci et al., 2017; Palacios et al., 2000; Sanabria, 2013). Las proteínas de superficie de las familias de mucinas, trans-sialidasas (Ts), TcGP63, amastina, TcTASV, cruzipaina y mucinas asociadas a superficie (MASPs) han sido ampliamente estudiadas por presentar un rol importante en la en la invasión, internalización y mantenimiento de *T. cruzi* en las células infectadas del hospedero (Queiroz et al., 2014; Tarleton, 2007), específicamente la familia de trans-sialidasas dividida en 4 grupos (Ts I – Ts IV) generan una respuesta robusta en el hospedero considerándose el mayor factor de virulencia de *T. cruzi* (Freire-De-Lima et al., 2015), la respuesta es mediada por la activación de células T CD4+, CD8+ y células B (IL-6, IL-17, IFN- γ , secreción de inmunoglobulinas) a través de un dominio carboxilo terminal que contiene repeticiones de 14 aminoácidos en tándem denominada región SAPA perteneciente al grupo Ts-I (Bermejo et al., 2013; Gao et al., 2002; Martin et al., 2006; Tarleton, 2007). De la misma manera, se ha reportado el uso de proteínas secretadas-excretadas (TESA) del estadio epimastigote para el diagnóstico serológico (Berrizbeitia, 2013; Montes et al., 2006; Nakazawa et al., 2001), algunas proteínas trans-sialidasas del grupo Ts III pertenecen al antígeno TESA.

El presente estudio empleó antígeno lisado total (ALT) de estadio epimastigote y tripomastigote como controles de sensibilización, sin embargo, debido a que el estadio diagnóstico son los tripomastigotes se seleccionó el antígeno lisado total de la cepa Arequipa para dicho estadio como control para los ensayos de estandarización de la técnica de ELISA empleando péptidos superficiales sintéticos (Figura 18), la reactividad de todos los antígenos empleados en el estudio fueron óptimos (Figura 8, Anexo B)

Los péptidos sintéticos evaluados han sido obtenidos mediante análisis proteómico de la cepa Arequipa de *T. cruzi*. El análisis ontológico permitió clasificar y obtener secuencias de

proteínas con actividad sialidasa, el análisis por alineamiento local con las cepas *T. cruzi* Brasil A4, CL-Brener, Esmeraldo like, Non-Esmeraldo like, Sylvio X10/1, TCC y YC6 permitieron seleccionar dos secuencias consenso; este fue necesario para representar secuencias conservadas en las diferentes cepas con información proteómica en la base de datos TriTrypDB. Las 2 secuencias consenso, denominadas TSGI.1 y TSGI.2 presentan parte de la región SAPA altamente antigénica. Posteriores análisis de antigenicidad, accesibilidad, hidrofiliidad y hojas beta permitieron obtener 4 secuencias (ED01 – ED04) de péptidos que contenían epitopes lineales conservados en *T. cruzi* (Tabla 3 y 4). La estandarización del ensayo de ELISA indirecto se realizó empleando dos secuencias de este grupo (ED02 y ED04). Los scores óptimos de antigenicidad se correlacionan con la óptima respuesta inmune entre células T y B reportadas en estudios *in vivo*, donde la proteína trans-sialidasa genera una rápida secreción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y anticuerpos antígeno-específicos a los 4 – 8 dpi (Gao et al., 2002).

El uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes, históricamente, ha permitido la producción y purificación de grandes cantidades de antígenos inmunodominantes aplicados en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas. Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se ha empleado la proteína recombinante de choque térmico HSP-70, la cual mostró una alta sensibilidad en pacientes con Chagas crónico; sin embargo, existía una reacción cruzada con pacientes sanos debido a que presenta 70 % de homología en los humanos. Este concepto fue tomado en cuenta durante los filtros de selección de las secuencias de aminoácidos para evitar reacciones cruzadas con sueros reactivos a infecciones por *Leishmania sp*, De esta manera, se descartaron los péptidos que presentaban una homología mayor al 70 % para las especies de *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. major*, disminuyendo la probabilidad de reacciones cruzadas y una sobrevaloración de la sensibilidad o una disminución de especificidad en los ensayos de

estandarización (Mucci et al., 2017; Noya et al., 2005). El uso de tripéptidos y tetrapéptidos quiméricos a principios de los 2000 han permitido obtener porcentajes de sensibilidad y especificidad elevados en población humana; sin embargo, su desarrollo suele ser muy complejo, por lo que recientemente se ha evaluado el uso de péptidos sintéticos que emplean la región SAPA para un diagnóstico eficiente en la etapa temprana de la enfermedad, y antígenos de superficie (TSA) de *T. cruzi*, mostrando porcentajes diagnósticos óptimos (Betônico et al., 1999; Houghton et al., 2000).

Los resultados de la densidad óptica de las muestras de plasma control 15, 22 y 36 logran mostrar que la región SAPA involucrada dentro de nuestros péptidos sintéticos es eficiente para la detección de anticuerpos IgM incluso hasta los 60 dpi, los anticuerpos IgG contra *T. cruzi* fueron detectados de igual manera desde los 15 hasta los 60 dpi (Figura 19, A-B), en comparación con el antígeno lisado total Tripo-AQP que detectó anticuerpos IgM desde los 15 hasta los 60 dpi, sin embargo, la detección de anticuerpos IgG fue desde los 15 hasta los 49 dpi (Figura 19, C). Los péptidos superficiales sintéticos muestran diferencias en cuanto a la detección de anticuerpos IgM e IgG, durante la fase aguda (15 – 36 dpi) los valores de densidad óptica fueron mayores frente a los valores durante la fase crónica (49 – 60 dpi), sin embargo, para ambos casos las muestras se clasificaron con resultado positivo. Los valores de D.O. tienden a decaer desde los 49 dpi hasta 60 dpi para péptidos sintéticos y ALT-Tripo-AQP, aunque esta observación fue más acentuada para ALT-Tripo-AQP (Figura 19 A-C).

5.2. Estandarización de ELISA indirecto

El presente estudio empleó como control de ensayo antígeno lisado total de tripomastigotes de la cepa Arequipa, diversos estudios de estandarización de técnicas serológicas como Aglutinación directa/indirecta, ELISA, Inmunofluorescencia (IFI), Western Blot, Dot-ELISA, han

empleado extractos lisados totales y proteínas excretadas-secretadas de *T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Alvarez et al., 2014; Berrizbeitia et al., 2015; Cannova et al., 2002; Cervantes-Landín et al., 2014; López et al., 1999), reportando resultados favorables con 94.3 % de sensibilidad en ensayos de aglutinación directa, entre 96 % y 100 % para IFI y ELISA indirecto, sin embargo, la especificidad de estas pruebas suele ser menor al 90 % lo que conlleva a reportar resultados falsos positivos. De esta manera se fundamenta el uso de este tipo de antígenos en la técnica de ELISA indirecto.

El título de anticuerpos puede variar de acuerdo al tipo de antígeno empleado en los ensayos de ELISA. Los antígenos lisados totales (ALT) generan la producción de títulos elevados de anticuerpo IgM/IgG por una mayor formación de complejos antígeno-anticuerpo por la gran cantidad de epitopes presentes en las diversas proteínas contenidas en el extracto. Una evaluación del título de los isotipos de IgG (IgG1, IgG2a/b, IgG3) ha demostrado que IgG2a forma una mayor cantidad de inmunocomplejos (3960 $\mu\text{g/ml}$ a 28 dpi con D.O. de 0.482) con este tipo de antígeno obtenido a partir de tripomastigotes (Spinella et al., 1992). El presente estudio muestra que los valores de D.O. de IgG para las proteínas antigénicas totales (ALT) de tripomastigotes de la cepa Arequipa (AQP) fueron similares, siendo 0.475 a 36 dpi y 0.786 a 49 dpi; sin embargo, el ALT de epimastigotes de la cepa CLBrenner demostró mayor reactividad con D.O. de 0.757 a 36 dpi y aun mayor a 49 dpi con 1.539. Estos resultados pueden explicarse por la mayor cantidad de proteínas de superficie inmunoreactivas reportadas en las formas intracelulares y extracelulares del estadio epimastigote, las cuales no son compartidas con los estadios amastigote o tripomastigote (Almeida-de-Faria et al., 1999; Atwood et al., 2005).

Respecto al uso de péptidos superficiales sintéticos ED02 y ED04, la concentración óptima se estableció en 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (0.075 g/pozo), la reactividad de los sueros positivos a dicha

concentración generó valores de densidad óptica adecuados a 8, 22, 36 y 49 dpi (Figura 12), siendo el pico de reactividad a los 36 dpi con D.O. de 1.413 y 1.426 respectivamente, siendo mayores al valor obtenido con el antígeno control ALT epimastigotes/tripomastigotes cepa CLBrener/Arequipa (0.757/0.475); sin embargo, estos valores descendían a D.O. de 0.941 y 0.961 a los 49 dpi, estos valores fueron menores a las obtenidas empleando el antígeno control ALT epimastigote-CLBrener (1.539), pero mayores al control ALT tripomastigote-AQP (0.786). Solo una muestra de plasma a 8 dpi mostró una reactividad elevada para la detección de anticuerpos IgM, el resto de muestras a 8 dpi de ambos grupos de infección tuvieron valores por debajo de 0.250 D.O., el examen microscópico de referencia mostró que solo 2/6 ratones presentaron tripomastigotes en sangre (Figura 7, Anexo G), por este motivo la estandarización de la técnica de ELISA y los análisis estadísticos se realizaron desde los 15 hasta 60 dpi.

Respecto a la dilución óptima de anticuerpo primario (plasma de ratón BALB/c) los valores de D.O. mostraron una mejor distribución entre controles positivos y negativos en la dilución 1:100 con valores máximos de 0.865 y 0.866 D.O. para ED02 y ED04 respectivamente a 36 dpi, sin embargo, empleando una dilución 1:500 estos valores se redujeron aproximadamente a la mitad con 0.429 y 0.443, posiblemente esta dilución ocasionaría la pérdida de muestras positivas reportándolas como falsas negativas especialmente a 49 y 60 dpi, ya que a estos días post-infección los valores de D.O. fueron límites encontrándose cerca al punto de corte establecido para la detección de cada anticuerpo (Figura 15 -16 y 19).

La dilución óptima de anticuerpo secundario (conjugado anti-IgM/IgG HRP de ratón) se estableció de acuerdo a la observación de valores óptimos para controles negativos y/o controles positivos, para la detección de anticuerpos IgM el valor más bajo fue 0.210 empleando una dilución 1:3000, 0.103 con 1:5000 y 0.122 con 1:10000 para controles negativos, 1.859, 1.076 y 1.219

respectivamente para el control positivo a 36 dpi. Al presentar valores estadísticamente diferentes (p valor = 0.0052, $F = 9.278$) se optó por tomar la dilución óptima en 1:3000 debido a que incrementaba los valores de D.O. de todos los controles positivos manteniendo una diferencia promedio de 1.043 entre controles positivos y negativos, de esta manera se espera que los picos de detección se obtengan dentro de las primeras 3 semanas de infección (15, 22 y 29 dpi). Respecto a la detección de anticuerpos IgG el valor más bajo de D.O. fue 0.336 para la dilución 1:3000 y 0.164 para la dilución 1:5000, los valores para el control positivo a 36 dpi fueron en promedio 1.780 y 0.866 para 1:3000 y 1:5000 respectivamente, debido a que los valores de D.O. fueron significativamente diferentes (p valor < 0.0001, $r: 0.97$) se optó por determinar la dilución óptima en 1:5000 por presentar valores adecuados para los controles negativos en promedio 0.212 frente a 0.435, lo que evita el reporte de resultados falsos positivos (Figura 14).

5.3. Establecimiento de punto de corte

El análisis de curvas de ROC y cálculo de índice de Youden permitió obtener los puntos de corte óptimos para la correcta discriminación entre controles negativos y positivos empleando ALT-Tripo-AQP, ED02 y ED04 para la detección de anticuerpos (Figura 15 – 17), el punto de corte para anticuerpos IgG fue menor con 0.132 (ALL-Tripo-AQP), 0.249 (ED02) y 0.243 (ED04) en comparación a 0.283 (ALT-Tripo-AQP), 0.262 (ED02) y 0.257 (ED04) para la detección de anticuerpos IgM. Las áreas debajo de la curva (AUC) fueron elevadas con 1.00 (IC_{95%}: 1.00 – 1.00) para IgM e IgG empleando ambos péptidos sintéticos y 0.95 (IC_{95%}: 0.88 – 1.00) para IgG y 0.99 (IC_{95%}: 0.97 – 1.00). Los valores reportados en este estudio son comparables con los reportados en diversos estudios (AUC: 0.99, error estándar: 0.004) (Afonso et al., 2012).

Las tablas de contingencia permitieron el cálculo de sensibilidad y especificidad (Anexo D), el presente estudio reporta 100.00 % de sensibilidad y 100.00 % de especificidad empleando

péptidos superficiales sintéticos para una prevalencia del 63 % de la enfermedad entre las cohortes estudiadas. Los porcentajes de sensibilidad reportados en este estudio son mayores que algunos test comerciales y no comerciales de ELISA (sensibilidad del 95 % (IC_{95%}: 94 – 95 %) y 81 % (IC_{95%}: 80 – 83 %) respectivamente) pero una especificidad similar (99 % (IC_{95%}: 55 – 99 %) y 97 % (IC_{95%}: 97 – 98 %) respectivamente) (Afonso et al., 2012). El uso de antígenos recombinantes en algunas pruebas de ELISA muestran valores cercanos al 100 % para sensibilidad y especificidad (Da Silveira et al., 2001; Meira et al., 2004; Pereira-Chiocola et al., 2003), siendo comparables a los porcentajes reportados empleando péptidos sintéticos (Betônico et al., 1999; Flores-Chávez et al., 2010; Houghton et al., 2000; Mucci et al., 2017), sin embargo, las ventajas empleando péptidos sintéticos se basan en el costo de producción, calidad estable, producción a gran escala en un periodo corto de tiempo y menor heterogeneidad en los resultados intra/inter-laboratorios.

Finalmente, el presente estudio presenta una aproximación del uso del péptido superficial sintético ED02 en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónico empleando muestras de suero humano (Anexo H), se evaluaron 3 poblaciones peruanas, de Cajamarca (n = 9) y Arequipa (n = 7), paciente no Chagásico (n = 1) paciente con leishmaniosis de Puerto Maldonado (n = 1). Empleando una dilución de 1:5000 para el anticuerpo secundario anti-IgG HRP el promedio de muestras positivas fue 1.078, el promedio de muestras negativas fue 0.470 y el promedio de muestra de paciente con leishmaniosis fue 0.329, empleando una dilución 1:2500 los valores de D.O. fueron elevados para las 3 poblaciones, promedio de positivos 1.480, promedio de negativos 0.749 y promedio de paciente con leishmaniosis 0.500. Estos resultados son prometedores para el empleo de este péptido en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónico, es necesario realizar un estudio con pacientes humanos en fase aguda para determinar su capacidad diagnóstica para anticuerpos IgM.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron proteínas antigénicas totales (ALT) de estadio epimastigote y tripomastigote de las cepas CLBrener y Arequipa, siendo el ALT epimastigote-CLBrener y ALT-tripomastigote-Arequipa los más adecuados para ser empleados como antígenos controles para los ensayos de estandarización. Los análisis bioinformáticos permitieron la adecuada selección de dos péptidos sintéticos, siendo ED02 y ED04 los más adecuados para ser evaluados.

Se obtuvieron 44 muestras de plasma de dos grupos de infección de ratones de la cepa BALB/c clasificadas de la siguiente manera: 10/44 controles negativos y 34/44 controles positivos (población aguda: 8, 15, 22, 29, 36 dpi, población crónica: 49 y 60 dpi). La estandarización se realizó con 27 muestras de plasma.

La estandarización del ELISA indirecto empleando péptidos superficiales sintéticos ED02 y ED04 determinó el BSA al 5 % como un agente de bloqueo óptimo, la concentración óptima de sensibilización fue 1.5 µg/ml (0.075 µ/pozo), las diluciones adecuadas de anticuerpo primario y secundario fueron 1:100 (muestras de plasma de ratones BALB/c), 1:5000 (para la detección de anticuerpos IgG) y 1:3000 (para la detección de anticuerpos IgM).

Los puntos de corte establecidos para la detección de anticuerpos IgM fueron 0.262 (ED02), 0.257 (ED04) y 0.283 (ALT-Tripo-AQP). Para la detección de anticuerpos IgG fueron 0.249 (ED02), 0.243 (ED04) y 0.132 (ALT-Tripo-AQP). Finalmente se reporta el péptido ED02 como el mejor péptido superficial sintético para ser empleado en futuros ensayos con muestras humanas mostrando una sensibilidad del 100.00 % y especificidad del 100.00 % para la detección de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi*.

VII. RECOMENDACIONES

Para lograr la estandarización de técnicas diagnósticas se debe diseñar y mapear cada ensayo de la experimentación. Algunas consideraciones de este trabajo de tesis pueden ser tomadas como referencia para futuros estudios: (1) Seleccionar los exámenes de referencia a comparar con la técnica a estandarizar, (2) Establecer la cantidad muestral adecuada para la estandarización de acuerdo a las normas éticas y evitar en la mayor medida posible el uso innecesario de modelos animales, (3) Basar el flujograma de experimentación en resultados previos del mismo equipo de investigación o de externos, (4) Manejar las muestras empleadas como controles negativos y positivos con el mayor cuidado posible, manteniendo la cadena de frío luego de su almacenaje, es posible que un mal uso de las muestras afecten el resultado de la estandarización.

Para la correcta discriminación entre fase aguda y crónica de la enfermedad se recomienda evaluar rangos de infección desde los 8 hasta los 120 dpi. El presente estudio logró la discriminación de ambas fases empleando un rango de 15 hasta 60 dpi. Por otro lado, el establecimiento de puntos de corte y cálculos de sensibilidad y especificidad deben realizarse con el mismo número de muestras entre los exámenes de referencia y la técnica a estandarizar, posteriormente se puede aumentar la cantidad de muestras a evaluar con dichos valores ya establecidos.

Finalmente, respecto a las consideraciones técnicas, es importante que las soluciones tengan una molaridad adecuada para reducir el ruido de fondo en la lectura de resultados, se sugiere 1 M para lavado y 0.5 M para parada, homogeneizar las muestras con vortex antes y después de agregar el diluyente, revelar en oscuridad debido al uso de sustratos fotosensibles y basar el tiempo de parada de acuerdo al inicio de aparición de reacción en los controles negativos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*, 9(August), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Acosta Rodriguez, E. V., Zuniga, E. I., Montes, C. L., Merino, M. C., Bermejo, D. A., Amezcua Vesely, M. C., Motran, C. C., & Gruppi, A. (2007). *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: Can we strike first? *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01968.x>
- Affranchino, J. L., Ibañez, C. F., Luquetti, A. O., Rassi, A., Reyes, M. B., Macina, R. A., Åslund, L., Pettersson, U., & Frasch, A. C. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34(3), 221–228. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90050-9)
- Afonso, A. M., Ebell, M. H., & Tarleton, R. L. (2012). A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001881>
- Almeida-de-Faria, M., Freymüller, E., Colli, W., & Alves, M. J. M. (1999). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigote- like form. *Experimental Parasitology*, 92(4), 263–274. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4423>
- Álvarez-Hernández, D. A., García-Rodríguez-Arana, R., Ortiz-Hernández, A., Álvarez-Sánchez, M., Wu, M., Mejia, R., Martínez-Juárez, L. A., Montoya, A., Gallardo-Rincon, H., Vázquez-López, R., & Fernández-Presas, A. M. (2021). A systematic review of historical and current

- trends in Chagas disease. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 8, 1–17.
<https://doi.org/10.1177/20499361211033715>
- Alviarez, Y., Lares, M., Viettri, M., Aguilar, C. M., Herrera, L., & Ferrer, E. (2014). Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, 34(2), 308–317.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2078>
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2005). Microbiology: The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309(5733), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E., Fornaciari, G., & Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2034–2039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>
- Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E., Amezcua-Vesely, M. C., Sather, B., Singh, A. K., Khim, S., & Mucci, J. (2013). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates an ROR- γ t–AHR independent program leading to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol*, 14(5), 514–522. <https://doi.org/10.1038/ni.2569>.
- Berrizbeitia, M. (2013). Antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (TESA) como herramientas útiles para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. *Saber, Universidad de Oriente*, 25(4), 346–357.
- Berrizbeitia, M., Seijas, N., Rodríguez, J., Jorquera, A., & Romero, L. (2015). Estandarización, validación y aplicación de la inmunofluorescencia indirecta en un estudio epidemiológico de

- la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Venez. Microbiol*, 35(1), 45–50.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000100010
- Betônico, G. N., Miranda, E. O., Silva, D. A. O., Houghton, R., Reed, S. G., Campos-Neto, A., & Mineo, J. R. (1999). Evaluation of a synthetic tripeptide as antigen for detection of IgM and IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* in serum samples from patients with Chagas disease or viral diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(6), 603–606. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90064-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90064-0)
- Blackman, N. J. M., & Koval, J. J. (2000). Interval estimation for Cohen's kappa as a measure of agreement. *Statistics in Medicine*, 19(5), 723–741. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(20000315\)19:5<723::AID-SIM379>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(20000315)19:5<723::AID-SIM379>3.0.CO;2-A)
- Brasil, P. E. A. A., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., Sangenis, L. H. C., & Braga, J. U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>
- Bua, J., Volta, B. J., Perrone, A. E., Scollo, K., Velázquez, E. B., Ruiz, A. M., De Rissio, A. M., & Cardoni, R. L. (2013). How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), 12–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002476>
- Burns, J. M., Shreffler, W. G., Rosman, D. E., Sleath, P. R., March, C. J., & Reed, S. G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4), 1239–1243. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1239>

- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C., & Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>
- Cannova, D., Aguilar, C. M., Pacheco, M., Simons, M. I., & Medina, M. (2002). Validación del inmuno ensayo enzimático (ELISA) y hemoaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad de chagas. *Salus*, 6(3), 4–9.
- Castro-Sesquen, Y. E., Tinajeros, F., Bern, C., Galdos-Cardenas, G., Malaga, E. S., Valencia Ayala, E., Hjerrild, K., Clipman, S. J., Lescano, A. G., Bayangos, T., Castillo, W., Menduiña, M. C., Talaat, K. R., Gilman, R. H., Verastegui, M., Calderon, M., Chávez, C., Leigue, J. K., Hinojosa, E., ... Romero, Y. K. (2021). The immunoglobulin M-Shed acute phase antigen (SAPA)-test for the early diagnosis of congenital Chagas disease in the time of the elimination goal of mother-to-child transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 73(2), E477–E484. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa986>
- Cazzulo, J., & Frasch, A. (1992). two antigens *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. 6(14), 3259–3264. <https://doi.org/doi:10.1096/fasebj.6.14.1426764>
- Cedillos, R. A., Torrealba, J. W., Tonn, R. J., Mosca, W., & Ortegón, A. (1982). El xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, 93(3), 240–249.
- Cervantes-Landín, A. Y., Martínez-Martínez, I., Reyes, P. A., Shabib, M., & Espinoza-Gutiérrez, B. (2014). Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enfermedades Infecciosas*

y *Microbiologia Clinica*, 32(6), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.05.006>

Coura, J. R., Dias, J. C. P., Frasc, A. C. C., Guhl, F., Lazzari, J. O., Lorca, M., Monroy Escobar, C., Ponce, C., Silveira, A. C., Velazquez, G., & Zingales, B. (2002). Control of Chagas disease. World Health Organization - Technical Report Series, 905, 1–99. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90338-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90338-x)

Coura, José Rodrigues, & Borges-Pereira, J. (2011). Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 641–645. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600001>

Cuba Cuba, C. A., Abad-Franch, F., Rodríguez, J. R., Vásquez, F. V., Velasquez, L. P., & Miles, M. A. (2002). The triatomines of Northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(2), 175–183. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000200005>

da Silva, C. V., Kawashita, S. Y., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Cruz, M. C., da Silva, E. A., Souto-Padrón, T. C. B. S., Krieger, M. A., Goldenberg, S. (2009). Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes and Infection*, 11(5), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

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. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01897-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01897-9)

De Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 269–285. [https://doi.org/Souza, W. \(2002\). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8\(4\), 269–285. doi:10.2174/1381612023396276](https://doi.org/Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. Current Pharmaceutical Design, 8(4), 269–285. doi:10.2174/1381612023396276)

- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Duarte, L. F., Florez, O., Rincón, G., & Gonzalez, C. I. (2014). Comparación de siete pruebas diagnósticas para detectar infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas. *Colombia Medica*, 45(2), 61–66.
- Escalante, H., Jara, C., Davelois, K., Iglesias, M., Benites, A., & Espinoza, R. (2014). Artículo Original. Western blot technique standardization for specific diagnosis of chagas disease using excretory-secretory. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 31(4), 6–8. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Favoreto, S., Dorta, M. L., & Yoshida, N. (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Experimental Parasitology*, 89(2), 188–194. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4285>
- Flores-Chávez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., & Cañavate, C. (2010). Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica*, 28(5), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.07.005>
- Frasch, A. C. C. (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology*, 108(S1), S37–S44. <https://doi.org/10.1017/S0031182000075703>
- Freire-De-Lima, L., Fonseca, L. M., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. O.

- (2015). The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, 25(11), 1142–1149. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Gao, W., Wortis, H. H., & Pereira, M. A. (2002). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *International Immunology*, 14(3), 299–308. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.3.299>
- Garcia, E. S., & Azambuja, P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, 7(9), 240–244. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90237-I](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90237-I)
- Grauert, M. R., Houdayer, M., & Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1993). *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 93(1), 85–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb06501.x>
- Gutierrez, F. R. S., Guedes, P. M. M., Gazzinelli, R. T., & Silva, J. S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, 31(11), 673–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x>
- Hamilton, P. B., Teixeira, M. M. G., & Stevens, J. R. (2012). The evolution of *Trypanosoma cruzi*: The “bat seeding” hypothesis. *Trends in Parasitology*, 28(4), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.006>
- Hasslocher-Moreno, A. M., Xavier, S. S., Saraiva, R. M., & de Sousa, A. S. (2021). Indeterminate form of chagas disease: Historical, conceptual, clinical, and prognostic aspects. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54(April), 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0254-2021>

- Henriquez, D., Piras, R., & Piras, M. M. (1981). The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2(5–6), 359–366. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(81\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90087-6)
- Herrer, A., & Ayulo, V. (1944). Estudios sobre trypanosomiasis americana en el Perú II. Observaciones Entomologicas. *Revista de Medicina Experimental*.
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. A. W., Badaro, R., Krettli, A. U., & Reed, S. G. (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 325–330. <https://doi.org/10.1086/315165>
- Kipnis, T. L., Calich, V. L. G., & Da Silya, W. D. (1979). Active Entry of Bloodstream Forms of *Trypanosoma cruzi* into Macrophages. *Parasitology*, 78(1), 89–98. <https://doi.org/10.1017/S0031182000048617>
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). An Application of Hierarchical Kappa-type Statistics in the Assessment of Majority Agreement among Multiple Observers. *Biometrics*, 33(2), 363. <https://doi.org/10.2307/2529786>
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(4), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Hognigber, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Polajnsky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, & F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. *The*

- Journal of Protozoology, 27(1), 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography*, 49(6), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- López, M. C., Duque, S., Orozco, L. C., Camargo, D., Gualdrón, L. E., Cáceres, E., Ronderos, M., Rey, M., & Corredor, A. (1999). Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. *Biomédica*, 19(2), 159. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v19i2.1018>
- Macedo, A. M., Machado, C. R., Oliveira, R. P., & Pena, S. D. J. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1), 1–12. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100001>
- Machado, C. R., Augusto-Pinto, L., McCulloch, R., & Teixeira, S. M. R. (2006). DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 612(1), 40–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.05.001>
- Martin, D. L., Weatherly, D. B., Laucella, S. A., Cabinian, M. A., Crim, M. T., Sullivan, S., Heiges, M., Craven, S. H., Rosenberg, C. S., Collins, M. H., Sette, A., Postan, M., & Tarleton, R. L. (2006). CD8+ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathogens*, 2(8), 0731–0740. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020077>
- Meira, W. S. F., Galvão, L. M. C., Gontijo, E. D., Machado-Coelho, G. L. L., Norris, K. A., & Chiari, E. (2004). Use of the *Trypanosoma cruzi* Recombinant Complement Regulatory Protein To Evaluate Therapeutic Efficacy following Treatment of Chronic Chagasic Patients.

- Journal of Clinical Microbiology, 42(2), 707–712. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.707-712.2004>
- Mills, R. M. (2020). Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *American Journal of Medicine*, 133(11), 1262–1265. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>
- Moncayo, Á., & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 17–30. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005>
- Montes, C. L., Acosta-Rodríguez, E. V., Mucci, J., Zuniga, E. I., Campetella, O., & Gruppi, A. (2006). A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. *European Journal of Immunology*, 36(6), 1474–1485. <https://doi.org/10.1002/eji.200535537>
- Mucci, J., Carmona, S. J., Volcovich, R., Altcheh, J., Bracamonte, E., Marco, J. D., Nielsen, M., Buscaglia, C. A., & Agüero, F. (2017). Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005972>
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL.1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)

- Nakazawa, M., Rosa, D. S., Pereira, V. R. A., Moura, M. O., Furtado, V. C., Souza, W. V., Barros, M. D. N. D. S., Abath, F. G. C., & Gomes, Y. M. (2001). Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5), 1024–1027. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1024-1027.2001>
- Náquira, C. (2014). Urbanización de la enfermedad de Chagas en el Perú: experiencias en su prevención y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2), 343–347. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.312.56>
- Náquira, C., & Cabrera, R. (2009). Short review of chagas disease history after a century of its discovery and the current situation in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 26(4), 494–504.
- Nonajulca C, D. E. (2019). Comparación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de aglutinación de látex con antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes y homogeneizado total de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Noya, O., Patarroyo, M., Guzman, F., & de Noya, B. (2005). Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. *Current Protein & Peptide Science*, 4(4), 299–308. <https://doi.org/10.2174/1389203033487153>
- Ohyama, K., Huy, N. T., Yoshimi, H., Kishikawa, N., Nishizawa, J. E., Roca, Y., Revollo Guzmán, R. J., Velarde, F. U. G., Kuroda, N., & Hirayama, K. (2016). Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease. *Parasite Immunology*, 38(10), 609–617. <https://doi.org/10.1111/pim.12341>
- Organización Mundial de Salud (OMS). (2020). Chagas disease. Enfermedad de Chagas.

<https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>

Paiva, C. N., Figueiredo, R. T., Kroll-Palhares, K., Silva, A. A., Silvério, J. C., Gibaldi, D., Pyrrho, A. dos S., Benjamim, C. F., Lannes-Vieira, J., & Bozza, M. T. (2009). CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1239–1246.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0309187>

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. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 8(6), 411–417. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892000001100006>

Pereira-Chioccola, V. L., Fragata-Filho, A. A., De Aparecida Levy, A. M., Rodrigues, M. M., & Schenkman, S. (2003). Enzyme-linked immunoassay using recombinant trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), 826–830. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.826-830.2003>

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)

Pitcovsky, T. A., Buscaglia, C. A., Mucci, J., & Campetella, O. (2002). A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Journal of Infectious Diseases*, 186(3), 397–404. <https://doi.org/10.1086/341463>

Previato, J., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V., & Mendonça-Previato, L. (1985).

- Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(1), 85–96.
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90051-9)
- Queiroz, R. M. L., Charneau, S., Bastos, I. M. D., Santana, J. M., Sousa, M. V., Roepstorff, P., & Ricart, C. A. O. (2014). Cell surface proteome analysis of human-hosted *Trypanosoma cruzi* life stages. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3530–3541.
<https://doi.org/10.1021/pr401120y>
- Ramos-Rincón, J. M., Ortiz-Martínez, S., Vásquez-Chasnamote, M. E., Gamboa-Paredes, O. N., Pinedo-Cancino, V. V., Ramal-Asayag, C., Górgolas-Hernández-Mora, M., & Casapía-Morales, M. (2020). Chagas Disease in Pregnant Women in the Peruvian Amazon Basin. Cross-Sectional Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(September), 1–6.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00556>
- Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi, A. (2010). Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. In *American Trypanosomiasis* (First Edit). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00027-7>
- Rivera, H. N., Mcauliffe, I., Aderohunmu, T., Wiegand, R. E., Montgomery, S. P., & Bradbury, R. S. (2022). Evaluation of the Performance of Ortho T . cruzi ELISA Test System for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1–5.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jcm.00134-22>
- Rodea, G. B., Martinez Cuevas, T. I., Jimenez Ramos, B., & Campos, A. A. (2018). Chagas disease: an overview of diagnosis. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 6(3).
<https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00207>

- Rojas de Arias, A., Abad-Franch, F., Acosta, N., López, E., González, N., Zerba, E., Tarelli, G., & Masuh, H. (2012). Post-Control Surveillance of *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* with Chemically-Baited Sticky Traps. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001822>
- Sanabria, O. (2013). Eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno- Sorbent Assay con antígenos de Excreción-Secreción de Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas excretion-secretion antigens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to. 1(2), 50–57.
- Sánchez, L. (2018). Identificación de linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en chagas congénito: un estudio basado en madres transmisoras y no transmisoras. http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/5956/Identificacion_SanchezJusto_Leny.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Santana, K. H., Oliveira, L. G. R., Barros de Castro, D., & Pereira, M. (2020). Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 25(7), 752–763. <https://doi.org/10.1111/tmi.13398>
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M. M. A., Lima, A. P. C. A., Morrot, A., Juliano, L., & Müller-Esterl, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1289–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1289>
- Sousa-Rocha, D., Thomaz-Tobias, M., Diniz, L. F. A., Souza, P. S. S., Pinge-Filho, P., & Toledo, K. A. (2015). *Trypanosoma cruzi* and its soluble antigens induce NET release by stimulating

toll-like receptors. PLoS ONE, 10(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139569>

Spinella, S., Liegeard, P., & Hontebeyrie-joskowicz, M. (1992). *Trypanosoma cruzi*: Response Predominance of IgG2a in Nonspecific during Experimental Chagas' Disease Humoral animals and , possibly , relevant to the (Van Voorhis and Eisen 1989 ; Kahn et al . tion of autoantibodies is the result of non- asite-antigen-. 56, 46–56.

Tarleton, R. L. (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Current Opinion in Immunology, 19(4), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.003>

Velarde, N., Huapaya, P., Espinoza Blanco, Y., & Chirinos Vega, S. (2001). Enfermedad de Chagas. Instituto Nacional de Salud.

Werner, B., Heitmann G., I., Jercic L., M. I., Jofré M., L., Muñoz C. Del V., P., Noemí H., I., San Martín V., A. M., Sapunar P., J., Torres H., M., & Zulantay A., I. (2008). Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. Revista Chilena de Infectología, 25(3), 194–199.

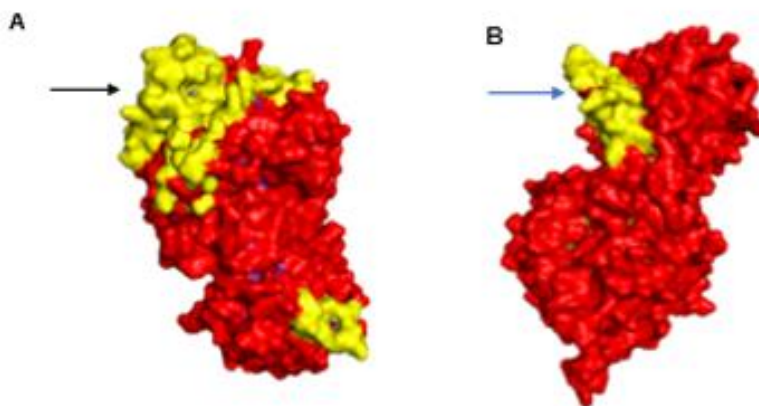
Yoshida, N., Blanco, S. A., Araguth, M. F., Russo, M., & González, J. (1990). The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology, 39(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90006-8)

Zuniga, E., Acosta-Rodriguez, E., Merino, M. C., Montes, C., & Gruppi, A. (2005). Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: Involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. European Journal of Immunology, 35(6), 1849–1858. <https://doi.org/10.1002/eji.200526005>.

IX. ANEXOS

Anexo A

Ubicación de péptidos superficiales sintéticos ED02 y ED04 en la proteína trans-sialidasa de *T. cruzi*



Nota. Proteína trans-sialidasa de *T. cruzi*. A. Grupo TSGL1.1, flecha negra, indica región correspondiente al péptido sintético ED04. B. Grupo TSGL2, flecha azul, indica región correspondiente al péptido sintético ED02. Elaboración en swiss-model

Anexo B

Reactividad de muestras de plasma empleando péptidos superficiales sintéticos (ED02-ED04) para la detección de anticuerpos IgM.

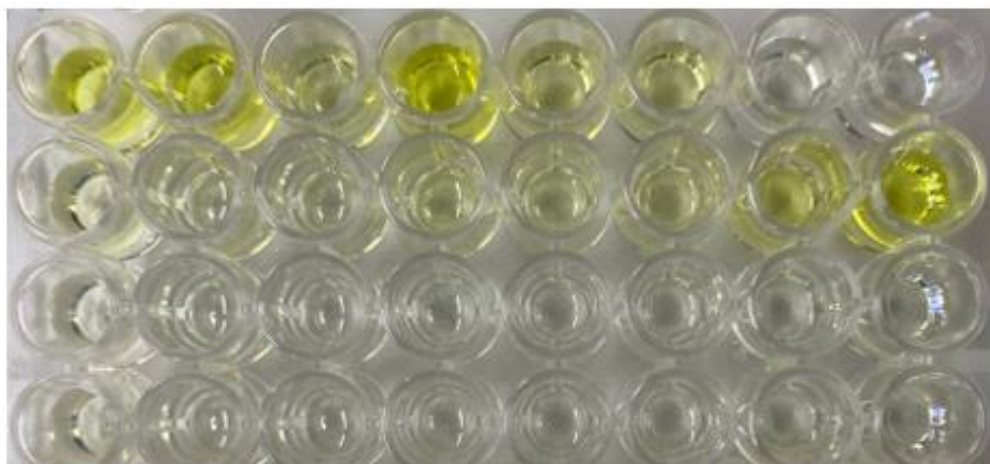
ED02

CP

CP

CN

CN



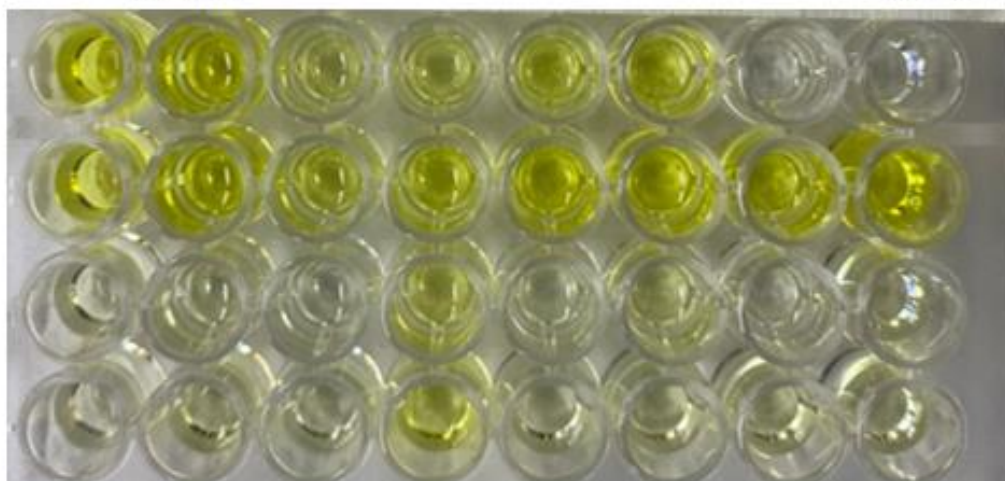
ED04

CP

CP

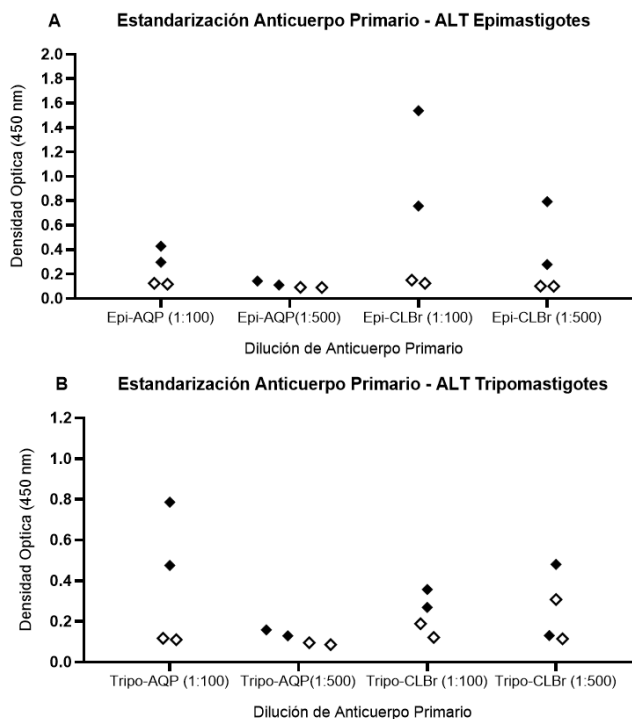
CN

CN



Anexo C

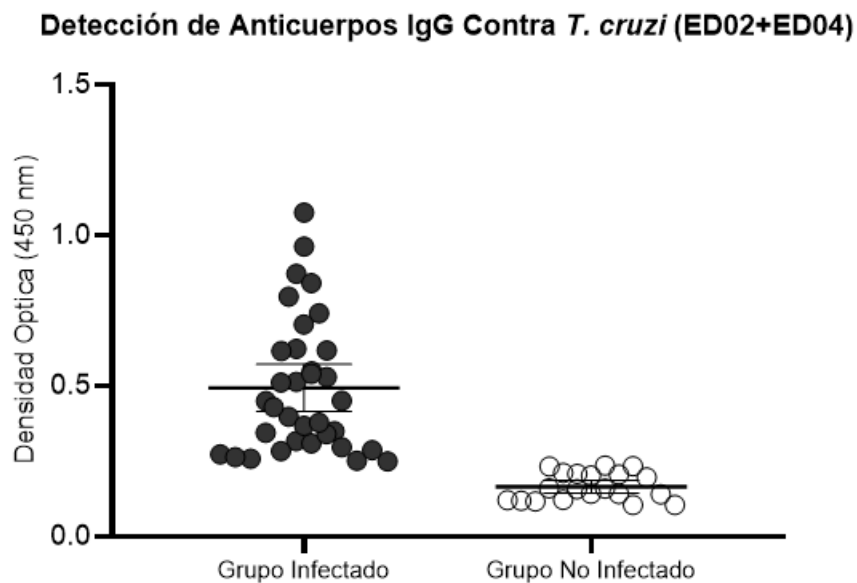
Ensayo con dilución de anticuerpo primario 1:100 y 1:500 empleando antígeno lisado total



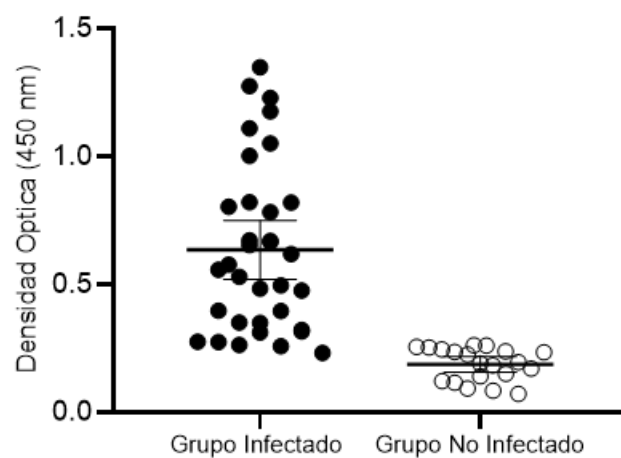
Nota. Rombos negros representan los controles positivos del ensayo y los rombos blancos representan a los controles negativos del ensayo. Cada valor observado representa un promedio de 3 resultados. A. Ensayo con epimastigotes, comparación de valores D.O. entre tipo de antígeno para la cepa AQP no son significativamente diferentes (p valor = 0.1243, SD: 0.1255, IC_{95%}: -0.333 – 0.066), valores de D.O. entre tipo de antígeno para la cepa CLBrener no son significativamente diferentes (p valor = 0.1607, SD: 0.3497, IC_{95%}: -0.881 – 0.232). B. Ensayo con tripomastigotes, comparación de valores D.O. entre tipo de antígeno para la cepa AQP no son significativamente diferentes (p valor = 0.1895, SD: 0.3017, IC_{95%}: -0.735 – 0.225), valores de D.O. entre tipo de antígeno para la cepa CLBrener no son significativamente diferentes (p valor = 0.8143, SD: 0.1893, IC_{95%}: -0.277 – 0.325). Valores significativos con p valor < 0.05.

Anexo D

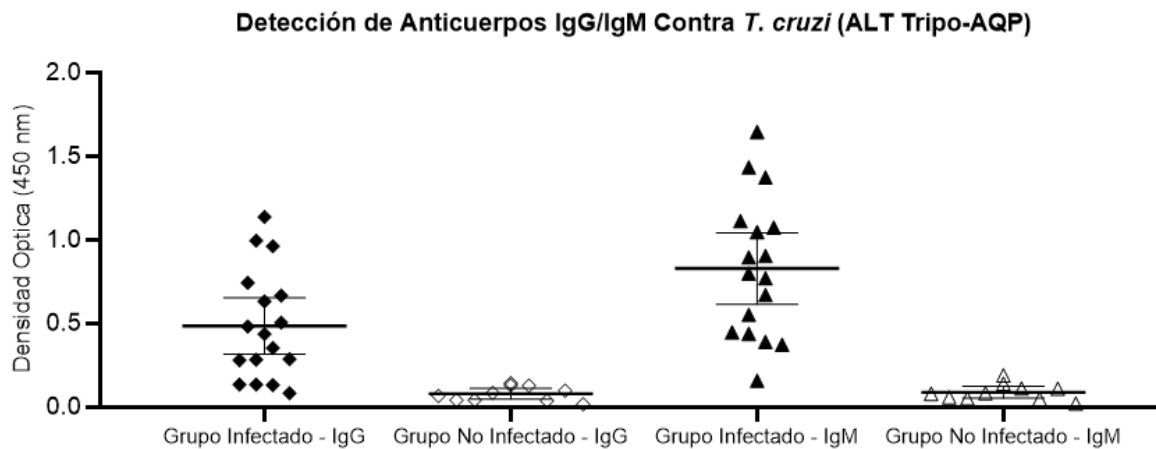
Detección de anticuerpos IgG e IgM contra *T. cruzi* empleando ED02 y ED04



Nota. Se muestran las diferencias en D.O. de cada grupo evaluado para el establecimiento de punto de corte. Grupo Infectado (n:33)*, media: 0.494 ± 0.224 , error DS: 0.038. Grupo no Infectado (n:20)**, media: 0.166 ± 0.046 , error DS: 0.010. *IC_{95%}: 0.4155 – 0.5716, **IC_{95%}: 0.1443 – 0.1871.

Detección de Anticuerpos IgM Contra *T. cruzi* (ED02+ED04)

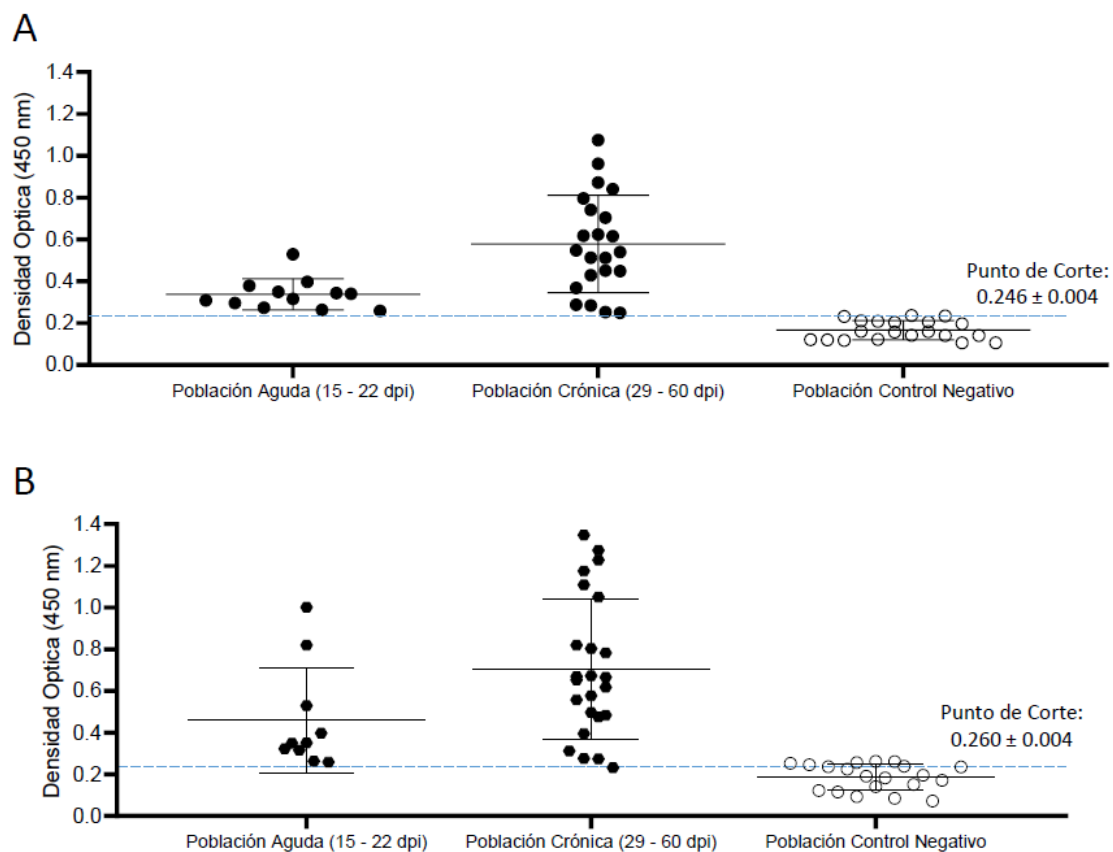
Nota. Se muestran las diferencias en D.O. de cada grupo evaluado para el establecimiento de punto de corte. Grupo Infectado (n:33)*, media: 0.634 ± 0.330 , error DS: 0.057. Grupo no Infectado (n:20)**, media: 0.187 ± 0.064 , error DS: 0.014. *IC_{95%}: 0.5188 – 0.7489, **IC_{95%}: 0.1564 – 0.2165.



Nota. Se muestran las diferencias en D.O. de cada grupo evaluado para el establecimiento de punto de corte. IgG contra *T. cruzi*: Grupo Infectado (n:17)*, media: 0.486 ± 0.327 , error DS: 0.079. Grupo no Infectado (n:10)**, media: 0.080 ± 0.045 , error DS: 0.014. *IC_{95%}: 0.3180 – 0.6540, **IC_{95%}: 0.0479 – 0.1121. IgM contra *T. cruzi*: Grupo Infectado (n: 17)*, media: 0.829 ± 0.417 , error DS: 0.101. Grupo no Infectado (n:10)**: media: 0.090 ± 0.050 , error DS: 0.0157. *IC_{95%}: 0.6143 – 1.043, **IC_{95%}: 0.0544 – 0.1256.

Anexo E

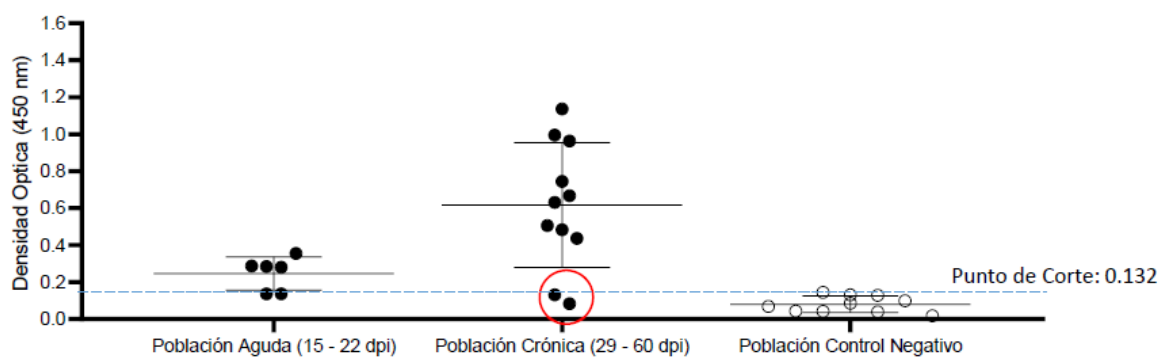
Detección de anticuerpos IgG e IgM de acuerdo a las poblaciones estudiadas



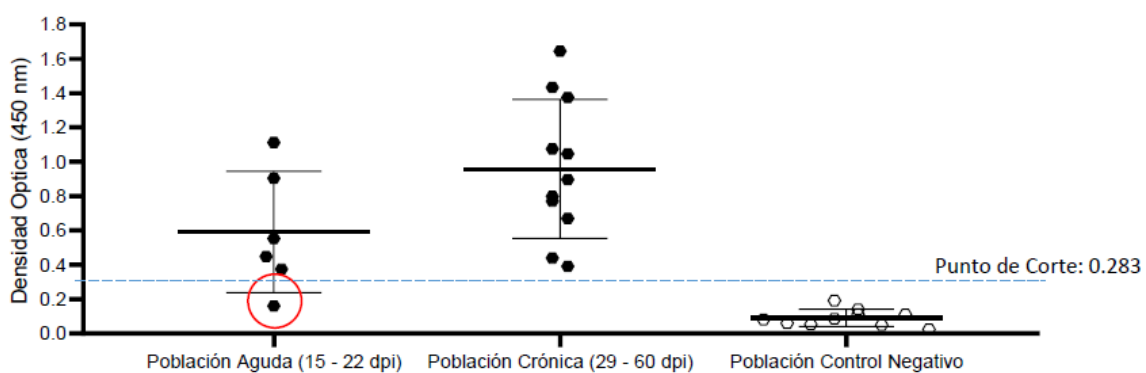
Nota. Evaluación de ambos péptidos sintéticos ED02/ED04 en la población estudiada. A.

Detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. B. Detección de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi*.

A



B



Nota. Evaluación de antígeno lisado total Tripo AQP en la población estudiada. A. Detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. B. Detección de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi*.

Anexo F

Tablas de contingencia para el establecimiento de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA indirecto.

		Condición de Ratón BALB/c			
		Condición	Infectado	No Infectado	Total
ELISA IgM ED02	Positivo		17	0	17
	Negativo		0	10	10
Total			17	10	27

		Condición de Ratón BALB/c			
		Condición	Infectado	No Infectado	Total
ELISA IgM ED04	Positivo		16	1	17
	Negativo		0	10	10
Total			16	11	27

		Condición de Ratón BALB/c			
		Condición	Infectado	No Infectado	Total
ELISA IgM ALT-Tripo- AQP	Positivo		16	1	17
	Negativo		0	10	10
Total			16	11	27

		Condición de Ratón BALB/c			
		Condición	Infectado	No Infectado	Total
ELISA IgG ED02/ED04	Positivo		17	0	17
	Negativo		0	10	10
Total			17	10	27

		Condición de Ratón BALB/c			
		Condición	Infectado	No Infectado	Total
ELISA IgG ALT-Tripo- AQP	Positivo		15	2	17
	Negativo		1	9	10
Total			16	11	27

Anexo G

Tablas de contingencia para el cálculo de índice de concordancia Kappa de Cohen

		Examen de Referencia		
		Examen Directo (Microscopia)		
			No	
Condición		Infectado	Infectado	Total
ELISA IgM ED02/ED04	Infectado	12	0	12
	No			
	Infectado	0	10	10
	Total	12	10	22

		Examen de Referencia		
		Examen Directo (Microscopia)		
			No	
Condición		Infectado	Infectado	Total
ELISA IgM ALT-Tripo- AQP	Infectado	11	0	11
	No			
	Infectado	1	10	11
	Total	12	10	22

		Examen de Referencia		
		ELISA Convencional IgG - ALT		
			No	
Condición		Infectado	Infectado	Total
ELISA IgG ED02/ED04	Infectado	15	2	17
	No			
	Infectado	1	9	10
	Total	16	11	27

Anexo H

Interpretación del índice de concordancia Kappa de Cohen

Kappa	Interpretation	Prevalence	Sample size	Method
$0 \leq \hat{k} < 0.2$	Slight	$0.1 < \hat{P} < 0.9$	$n \geq 20$	BK, FCE
$0.2 \leq \hat{k} < 0.4$	Fair	$0.1 \leq \hat{P} \leq 0.9$	$n \geq 20$	BK, FCE, Jack-knife
$0.4 \leq \hat{k} < 0.6$	Moderate	$0.2 < \hat{P} < 0.8$	$20 \leq n < 40$	Garner
$0.6 \leq \hat{k} < 1$	Substantial to almost perfect	$\hat{P} \leq 0.2; \hat{P} \geq 0.8$ $0.1 < \hat{P} < 0.9$	$n \geq 40$ $n \geq 20$	jack-knife Garner

Nota. Guía para la selección del método para la construcción de intervalos de confianza de Kappa de Cohen como medida adecuada en tamaño muestral pequeño. Tomado de: (Blackman & Koval, 2000).

Anexo I

Conteo de tripomastigotes en sangre de ratones BALB/c

Ratones BALB/c	Grupo de Infección 1			DS	Grupo de Infección 2			DS
CN 1	0	0	0	0.00	0	0	0	0
CN 2	0	0	0	0.00	0	0	0	0
CN 3	0	0	0	0.00	0	0	0	0
CN 4	0	0	0	0.00	0	0	0	0
CN 5	0	0	0	0.00	0	0	0	0
8 dpi	14	0	0	8.08	0	0	28	16.17
15 dpi	490	434	434	32.33	1106	532	546	327.43
22 dpi	1554	1974	2968	726.16	7028	2912	2968	2360.37
29 dpi	3948	4956	8176	2208.33	5740	5180	4760	491.66
36 dpi	5096	6048	7210	1058.74	†	5950	7714	1247.34
49 dpi	0	0	0	0.00	0	0	0	0
60 dpi	-	-	-	-	0	-	-	0

Nota. (†) ratón BALB/c fallecido, (-) sin individuo representante de grupo.

Anexo J

Valores de densidad óptica de anticuerpos IgG e IgM contra *T. cruzi* para establecimiento de punto de corte, sensibilidad y especificidad

Muestra	D.O. IgG contra <i>T. cruzi</i>		
	Punto de Corte		
	> 0.132 ALT-Tripo AQP	> 0.249 ED02	> 0.243 ED04
CN 1 G1	0.129	0.206	0.196
CN 2 G1	0.086	0.160	0.141
CN 3 G1	0.043	0.117	0.105
CN 4 G1	0.039	0.159	0.142
CN 5 G1	0.018	0.121	0.105
CN 1 G2	0.068	0.232	0.211
CN 2 G2	0.131	0.208	0.203
CN 3 G2	0.099	0.157	0.140
CN 4 G2	0.042	0.234	0.236
CN 5 G2	0.145	0.122	0.119
15 DPI G1.1	0.136	0.349	0.316
15 DPI G1.2	0.136	0.263	0.258
15 DPI G1.3	0.285	0.529	0.397
22 DPI G1.1	0.287	0.296	0.273
22 DPI G1.2	0.280	0.340	0.309
22 DPI G1.3	0.355	0.378	0.344
29 DPI G1.1.	0.437	0.429	0.368
29 DPI G1.2.	0.483	0.540	0.451
29 DPI G1.3.	0.506	0.511	0.449
36 DPI G1.1.	0.996	1.075	0.962
36 DPI G1.2.	0.668	0.704	0.623
36 DPI G1.3.	0.963	0.872	0.796
49 DPI G1.1	1.137	0.841	0.741
49 DPI G1.2.	0.632	0.615	0.513
49 DPI G1.3.	0.745	0.618	0.548
60 DPI G2.1	0.132	0.287	0.249
60 DPI G2.1	0.084	0.284	0.252

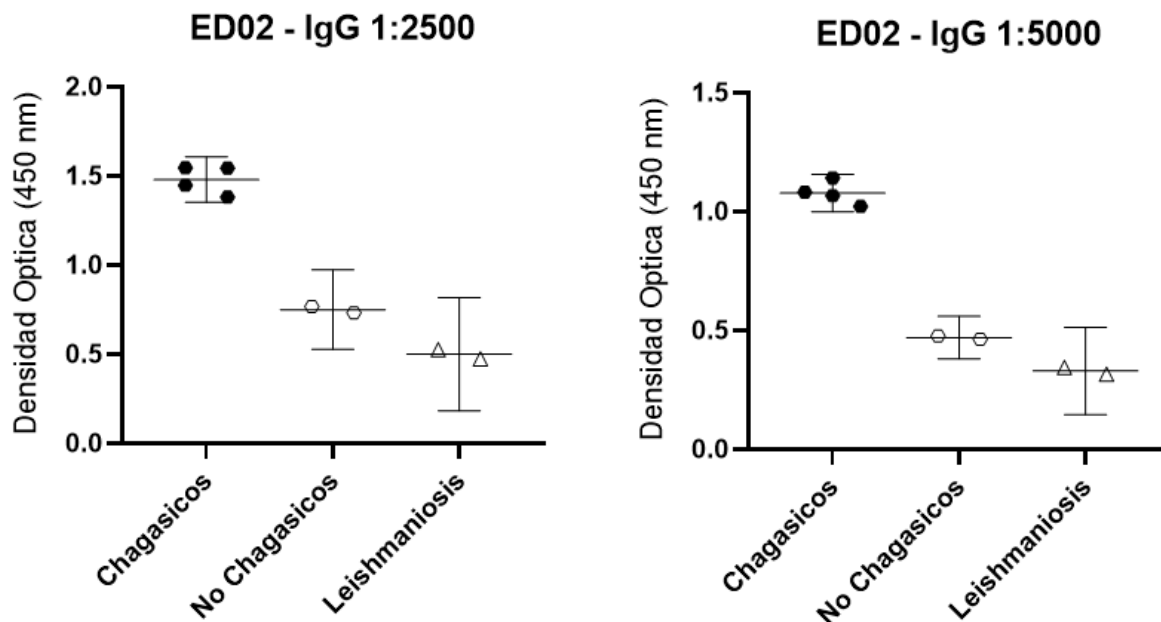
Nota. Valores positivos resaltados en rojo.

Muestra	D.O. IgM contra <i>T. cruzi</i>		
	Punto de Corte		
	> 0.283 ALT	> 0.262 ED02	> 0.257 ED04
CN1.1	0.110	0.183	0.191
CN1.2	0.191	0.225	0.195
CN1.3	0.059	0.115	0.084
CN1.4	0.084	0.171	0.141
CN1.5	0.052	0.093	0.072
CN 1 G2	0.049	0.235	0.238
CN 2 G2	0.112	0.151	0.122
CN 3 G2	0.080	0.261	0.256
CN 4 G2	0.023	0.262	0.253
CN5 G2	0.140	0.245	0.236
15 DPI G1.1	0.447	0.349	0.316
15 DPI G1.2	0.159	0.263	0.258
15 DPI G1.3	0.374	0.529	0.397
22 DPI G1.1	0.552	0.351	0.322
22 DPI G1.2	1.112	1.002	0.819
22 DPI G1.3	0.904	0.803	0.666
29 DPI G1.1.	0.770	0.496	0.395
29 DPI G1.2.	1.374	1.274	1.051
29 DPI G1.3.	0.896	0.672	0.557
36 DPI G1.1.	1.074	0.820	0.653
36 DPI G1.2.	1.434	1.348	1.228
36 DPI G1.3.	1.047	0.782	0.669
49 DPI G1.1	1.645	1.175	1.109
49 DPI G1.2.	0.670	0.276	0.232
49 DPI G1.3.	0.799	0.312	0.274
60 DPI G2.1	0.390	0.618	0.483
60 DPI G2.1	0.439	0.577	0.475

Nota. Valores positivos resaltados en rojo.

Anexo K

Ensayo piloto para la detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en población humana.



Nota. ED02-IgG 1:2500. Chagásicos: promedio 1.480 (IC_{95%}: 1.352 – 1.608), No Chagásicos: promedio 0.749 (IC_{95%}: 0.527 – 0.972), paciente con leishmaniosis: promedio 0.500 (IC_{95%}: 0.182 – 0.818). ED02-IgG 1:5000. Chagásicos: promedio 1.078 (IC_{95%}: 0.999 – 1.157), No Chagásicos: promedio 0.470 (IC_{95%}: 0.381 – 0.559), paciente con leishmaniosis: promedio 0.330 (IC_{95%}: 0.146 – 0.514).

Anexo L

Protocolo para la prueba de ELISA indirecto empleando péptidos superficiales sintéticos

Sensibilización

1. Diluir péptido sintético a concentración de trabajo, de acuerdo a la siguiente ecuación.

Concentración stock 1 de péptido sintético en 1 ml de agua grado molecular (H₂O_{gm}): 0.8 g/ml

Concentración stock 2 (8.10⁴ µg/ml)

$$- 0.8 \text{ g/ml} = 8000000 \text{ µg/ml} (8 \times 10^6)$$

$$8.10^6 \times \text{Volumen Inicial} = 8.104 \times 1000 \text{ µl}$$

Volumen Inicial = 1 µl de Stock 1 + 999 µl de H₂O_{gm}

Concentración de trabajo (540 µg/ml)

$$- 8.10^4 \times \text{Volumen Inicial} = 540 \times 1000 \text{ µl}$$

Volumen Inicial = 6.75 µl de Stock 2 + 993.25 µl de H₂O_{gm}

2. Sensibilizar microplaca de ELISA Nunc Maxisorp con 50 µl de péptido a 0.075 µg/pozo (concentración 1.5 µg/ml) de acuerdo a la siguiente ecuación:

540 x Volumen Inicial = 1.5 x (50 µl x número de pozos a sensibilizar), enrazando el volumen necesario con Buffer Carbonato/Bicarbonato

3. Posterior al dispensado de péptido sintetizado proteger la microplaca con parafilm.
4. Incubar a 4 °C toda la noche.

Bloqueo

5. Descartar contenido de la microplaca.
6. Realizar 4 lavados con PBS 1X + Tween 0.05 % de manera consecutiva con intervalos de 2 minutos y secando la microplaca entre lavados.
7. Dispensar 200 μ l de albumina sérica bovina (BSA) al 5 %, preparada de la siguiente manera:

Formula: Stock 10 % BSA x Volumen Inicial = 5 % BSA x (200 μ l x Número de pozos a bloquear), enrazando el volumen necesario con Buffer PBS 1X.
8. Proteger microplaca con parafilm e incubar a 37 °C por 2 horas.

Detección

9. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.
10. Realizar 4 lavados con PBS 1X + Tween 0.05 % de manera consecutiva con intervalos de 2 minutos y secando la microplaca entre lavados.
11. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.
12. Dispensar 50 μ l de anticuerpo primario (suero de humano) en dilución 1:50 con BSA al 2.5 %.

Formula: Stock 10 % BSA x Volumen Inicial = 2.5 % BSA x (100 μ l x cantidad de muestras a evaluar), enrazando el volumen necesario con Buffer PBS 1X.
13. Proteger la microplaca con parafilm e incubar a 37 °C por 1 hora.
14. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.

15. Realizar 4 lavados con PBS 1X + Tween 0.05 % de manera consecutiva con intervalos de 2 minutos y secando la microplaca entre lavados.
16. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.
17. Dispensar 50 μ l de anticuerpo secundario (Conjugado Anti-human IgG) en dilución 1:5000 con BSA al 2.5 %.

Formula: Stock 10 % BSA x Volumen Inicial = 2.5 % BSA x 5000 μ l, enrazando el volumen necesario con Buffer PBS 1X.

18. Proteger la microplaca con parafilm e incubar a 37 °C por 1 hora.
19. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.
20. Realizar 4 lavados con PBS 1X + Tween 0.05 % de manera consecutiva con intervalos de 2 minutos y secando la microplaca entre lavados.
21. Descartar contenido de microplaca y secar empleando papel absorbente.

Revelado

22. Dispensar 100 μ l de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) de acuerdo a la cantidad de pozos a revelar.
23. Cubrir la microplaca con aluminio y esperar la reacción por 15 minutos.
24. Detener reacción dispensando 50 μ l de solución de parada (Ácido Sulfúrico 0.5 M).
25. Obtener valores de densidad óptica en lectora de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

Anexo M

Preparación de soluciones de ELISA

Solución Madre A: Na₂HPO₄ – 0.1 M, pH: 9.0

$$M = \frac{m (g)}{PM \times V(L)}$$

$$m = 0.1 \times 141.96 \times 0.3$$

$m = 4.258 \text{ g}$ de Na₂HPO₄ en 300 ml de agua destilada

Solución Madre B: NaH₂PO₄ – 0.1 M, pH: 4.0

$$M = \frac{m (g)}{PM \times V(L)}$$

$$m = 0.1 \times 137.99 \times 0.3$$

$m = 4.139 \text{ g}$ de NaH₂PO₄ en 300 ml de agua destilada

Solución Fosfato Salino 0.01 M 1X

Solución	1000 ml	500 ml
Sol. A	77.2	38.6
Sol. B	22.8	11.4
NaCl	8.77 g	4.385 g

Solución Fosfato Salino 0.01 M 1X + Tween 0.05 %

Solución	Tween 20	%
PBS 1X - 1000 ml	500 µl	0.05
PBS 1X - 500 ml	250 µl	0.05
PBS 1X - 100 ml	50 µl	0.05

Solución Carbonato/Bicarbonato

1. Pesar cantidades

Carbonato de sodio anidro (Na ₂ CO ₃)	Bicarbonato de sodio anidro (NaHCO ₃)	Agua destilada
0.398 g	0.735 g	250 ml
0.795 g	1.465 g	500 ml
1.590 g	2.930 g	1000 ml

2. Agregar reactivos previamente pesados a un *beaker*, dispensar agua destilada de la siguiente manera: para volumen final de 250 ml, dispensar solo 200 ml; para 500 ml dispensar solo 400 ml y para 1000 ml dispensar solo 800 ml.
3. Adicionar pastilla para homogenizar.
4. Homogenizar en agitador magnético durante 10 minutos.
5. Ajustar pH a 9.6 empleando soluciones de hidróxido de sodio 0.5 M o ácido clorhídrico 5 M de acuerdo a las necesidades.
6. Transferir la cantidad faltante de agua destilada.
7. Almacenar a 4 °C.