

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Utilidad de epimastigotes formolados de
Trypanosoma cruzi en la técnica dot-ELISA para el
serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Inés de los Milagros PASTOR TALLEDO

ASESOR

Irma Adalberta ESPINOZA BLANCO

Lima - Perú

2017

Utilidad de epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* en
la técnica dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad
de Chagas

AUTOR

Bachiller PASTOR TALLEDO, INÉS DE LOS MILAGROS

ASESORA

Blga. ESPINOZA BLANCO, IRMA ADALBERTA

Dedicado a:

Mi madre Socorro, mi motor y ejemplo a seguir, por su amor y apoyo constante.

A mi hermano Julio César, por confiar en mí y animarme a concretar mis metas.

A mi tío Manuel, por ser mi padre y brindarme su apoyo incondicional.

A mi tío Eugenio, que desde el cielo me brinda su protección.

AGRADECIMIENTOS

A *Dios*, por ser mi amparo y apoyo en todo momento, por darme la fuerza para superar cada obstáculo, darme discernimiento en los momentos difíciles, ser mi protector y guía; y sobre todo por colocar grandes personas en mi camino.

A mi *familia*, por ser mi motor y fuerza para seguir adelante en el camino a conseguir mis metas y sueños, los amo.

A mi asesora, *Blga. Irma Espinoza Blanco*, por la amistad, cariño, disponibilidad, incentivo y apoyo en cada momento. Muy agradecida por la confianza depositada.

A mi coasesor, *Mg. William Roldán Gonzáles*, por la amistad brindada en este tiempo, y por adentrarme en el mundo de la investigación; muchas gracias.

A mi amiga *Susana Jiménez Ramírez*, por la amistad y el apoyo constante en esta ardua jornada; muy agradecida.

A mis mejores amigas *Esther Jara García* y *Mayling Bacilio*, gracias por su amistad sincera, cariño y respeto en este tiempo de formación universitaria.

A mis amigos *Richard Laureano* y *Javier Reynoso*, por siempre intercambiar conocimientos y brindarme su amistad, muy agradecida.

A mis amigas *Katherine Yauri Córdor* y *Carmen Cabanillas* por estar conmigo en momentos muy importantes, muchas gracias.

A mis amigas *Verónica Navarro* y *Roxana Mogollón*, que me brindaron su amistad sincera e hicieron mis días de internado más llevaderos, muchas gracias por ello.

A las licenciadas *Melva Bernal Escobar* y *Patricia Rodríguez Tapia*, por el cariño, respeto y la confianza depositada en mi periodo de internado en el Hospital Nacional Dos de Mayo, gracias por su amistad y todas sus enseñanzas.

A mis docentes *Ricardo Rodríguez, Silvia Suárez, Marco Núñez, Oswaldo Sanabria, Kelly Carbonel, Pilar Alva, William Cornejo, María Elena Vilcarromero y Rosa Bardales* por su formación y enseñanzas en mi vida universitaria que serán fundamentales para mi profesión, muy agradecida.

A los licenciados *Daniel Mejía, Segundo León y Justo Alegre*, por complementar mi formación universitaria y brindarme sus consejos, muchas gracias.

A mis amigos *Vilma Chávez, Alex Winnett y Elizabeth Albarrán*; agradezco infinitamente su amistad sincera y sus palabras de aliento en mi estadía por el Laboratorio de Investigación de “Socios en Salud”, muy agradecida.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que estuvieron presentes en mi camino, porque cada uno de ustedes me permitió crecer como persona y profesional.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.1. Antecedentes.....	14
1.2.Importancia de la investigación	18
1.3.Objetivos	20
1.3.1.Objetivo general	20
1.3.2. Objetivos específicos	20
1.4. Bases teóricas	21
1.4.1. Base teórica	21
1.4.2. Definición de términos	31
1.4.3.Formulación de la hipótesis.....	32
CAPÍTULOII: MÉTODOS	33
2.1. Diseño metodológico	34
2.1.1. Tipo de investigación.....	34
2.1.2.Diseño de la investigación.....	34
2.1.3. Población de estudio.....	34

2.1.4.Muestra y muestreo	34
2.1.4.1.Criterios de inclusión.....	34
2.1.4.2. Criterios de exclusión	35
2.1.5. Variables de estudio.....	35
2.1.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	37
2.1.7.Procedimientos y análisis de datos	37
2.1.8.Consideraciones éticas.....	43
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	44
CAPÍTULO IV: DISCUSION.....	56
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
5.1. Conclusiones.....	64
5.2. Recomendaciones	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Sensibilidad y Especificidad de la técnica dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados de <i>T. cruzi</i>	Pág. 50
Tabla 2	Reacciones cruzadas obtenidas en muestras de suero de pacientes con otras enfermedades infecciosas y tropicales mediante la técnica dot-ELISA utilizando epimastigotes de <i>T. cruzi</i> formolados.	Pág. 50
Tabla 3	Tabla de contingencia.	Pág. 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Pág. 22
Figura 2	Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la concentración óptima del antígeno.	Pág. 52
Figura 3	Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la dilución óptima del suero problema.	Pág. 52
Figura 4	Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la dilución óptima del conjugado.	Pág. 53
Figura 5	Precisión intraensayo de la técnica dot-ELISA para sueros reactivos	Pág. 53
Figura 6	Precisión intraensayo de la técnica dot-ELISA para sueros no reactivos	Pág. 54
Figura 7	Precisión interensayo de la técnica dot-ELISA para sueros reactivos	Pág. 54
Figura 8	Evaluación de la estabilidad del antígeno sobre la membrana en 03 mediciones durante un periodo de 6 meses.	Pág. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
IgG	Inmunoglobulina G
GPI	Glucosfosfatidilinositol
Th1	Células T cooperadorastipo 1
PBS	Buffer Fosfato Salino
DAB	Diaminobencidina
LIT	Liver-Infusion-Tryptose
TM	Tripomastigote metacíclico
TS	Tripomastigote sanguíneo
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-17	Interleuquina 17
MHC-I	Complejo mayor de Histocompatibilidad tipo I
MHC-II	Complejo mayor de Histocompatibilidad tipo II
TNF	Factor de necrosis tumoral
NK	Células “ <i>Natural Killer</i> ”
HAI	Hemoaglutinación indirecta

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es endémica en América Latina y afecta a varios países que la conforman. Durante la fase crónica de la enfermedad, el diagnóstico se establece mediante la detección de anticuerpos contra antígenos del parásito a través de pruebas inmunológicas. La búsqueda de un antígeno de fácil producción y alto rendimiento en las pruebas serológicas es una constante en muchos estudios de investigación que proponen la utilidad de diversos antígenos para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Objetivo:** Evaluar la utilidad de epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. **Diseño:** Estudio descriptivo, observacional, transversal. **Material biológico:** Sueros de pacientes chagásicos con anticuerpos anti-*T.cruzi* por IFI y ELISA, sueros de personas aparentemente sanas y sueros de pacientes con otras enfermedades infecciosas. **Lugar:** Laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”. **Métodos:** ELISA, IFI y dot-ELISA. **Principales medidas de resultados:** Se obtuvo una sensibilidad de 98% y especificidad del 95%, VPP y VPN de 84% y 99%, respectivamente. La reactividad cruzada de la técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados fue de 12.66% (10/79), principalmente en sueros de pacientes con leishmaniasis. **Conclusiones:** La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados resulta ser una alternativa sencilla para el serodiagnóstico de tamizaje de la enfermedad de Chagas.

Palabras claves: *T.cruzi*, epimastigotes formolados, dot-ELISA.

ABSTRACT

Introduction: Chagas disease is an endemic tropical infectious disease in Latin America. The diagnosis of Chagas disease in chronic phase is based on detecting antibodies against parasite antigens by serological tests. The search for an antigen of easy production and high performance in serological tests is a constant in many research studies. **Objectives:** To evaluate the usefulness of *Trypanosoma cruzi* formalized epimastigotes in the dot-ELISA technique for the serodiagnosis of Chagas disease. **Study design:** A descriptive, observational, and cross-sectional study. **Biological material:** Serum samples from Chagas's disease with positive results for both IFI and ELISA, sera from apparently healthy people, and sera from patients with other infectious diseases. **Setting:** Laboratory of Parasitology of the Institute of Tropical Medicine "Daniel Alcides Carrión". **Methods:** ELISA, IFI and dot-ELISA. **Results:** A sensitivity of 98% and specificity of 95%, PPV and NPV of 84% and 99%, respectively, were obtained. The cross-reactivity of the dot-ELISA technique using formalized epimastigotes was 12.66% (10/79), mainly in sera from patients with leishmaniasis. **Conclusions:** The dot-ELISA technique using formalized epimastigotes is a simple alternative for the serodiagnosis of Chagas disease.

Keywords: *T. cruzi*, formaldehyde-fixed epimastigotes, dot-ELISA.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y es una de las enfermedades tropicales desatendidas que afectan a más de ocho millones de personas en el mundo, principalmente a personas de bajos recursos económicos [1]. Según la Organización Mundial de la Salud, existen entre 6 a 7 millones de personas infectadas a nivel mundial y la mayoría de ellas pertenecen a países de América Latina, siendo considerada una zona endémica; más de 25 millones están en riesgo de adquirirla y se estima que podría causar la muerte de 10 mil personas anualmente, debido a complicaciones principalmente cardíacas que se presentan en el curso de la enfermedad [2].

La enfermedad de Chagas comprende una fase aguda, una fase indeterminada y una fase crónica. La fase aguda se caracteriza por presentar alta parasitemia, fiebre, reacción inflamatoria en el sitio de inoculación del parásito (chagoma), pudiendo encontrarse también linfadenopatía, hepatomegalia o esplenomegalia. Durante esta fase, el diagnóstico se establece mediante la detección de parásitos circulantes en sangre por técnicas de microscopía, hemocultivo o técnicas moleculares. La carga parasitaria circulante disminuye progresivamente y los síntomas iniciales desaparecen luego de varias semanas e inclusive meses, dando inicio a la fase indeterminada de la enfermedad que suele ser asintomática en el 70% de los individuos infectados, y en la cual la detección de anticuerpos específicos contra el parásito mediante pruebas inmunológicas constituye uno de los principales criterios para el diagnóstico.

La fase crónica ocurre en el 30% y 40% de los individuos infectados debido a que los parásitos han migrado hacia los tejidos del hospedero y se han multiplicado en las células musculares, formando nidos de parásitos en forma de pseudoquistes, dando lugar al desarrollo de una cardiomiopatía difusa grave o dilatación patológica del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) [3].

La presencia del parásito y la liberación de sus antígenos provocan la activación del sistema inmune, generándose una respuesta inmunológica celular y humoral, con

producción de anticuerpos de tipo IgM en la fase aguda y anticuerpos de tipo IgG en la fase crónica. Debido a la ausencia de parásitos en sangre circulante, el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad se basa en la detección de anticuerpos específicos mediante técnicas inmunológicas [4].

Las técnicas inmunológicas más utilizadas en nuestro medio para la detección de anticuerpos contra el parásito son la hemoaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), considerándose a éstas dos últimas como las técnicas de mayor sensibilidad y especificidad para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica.

Estas técnicas se basan principalmente en la detección de anticuerpos IgG en muestras de suero o plasma de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad [4,5]. Por esta razón, la OMS considera que para establecer un serodiagnóstico definitivo, se deben obtener resultados reactivos en por lo menos dos o más pruebas inmunoserológicas diferentes. Sin embargo, en aquellos casos donde se obtenga resultados divergentes en dos pruebas, se recomienda analizar la muestra con una tercera prueba y luego comparar los resultados [6].

En la técnica de IFI, descrita inicialmente por Camargo et al. (1966), se utilizan parásitos fijados y adheridos sobre la superficie de pequeñas áreas circulares de láminas portaobjetos y se incuban con muestras diluidas de suero o plasma. Si las muestras presentan anticuerpos contra el parásito, se formarán inmunocomplejos que luego serán detectados por la adición de anticuerpos anti-humanos conjugados con moléculas fluorescentes. Las láminas se analizan mediante el uso de un microscopio con luz ultravioleta para la emisión de la fluorescencia. La intensidad de fluorescencia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra del paciente [7].

En la técnica de ELISA descrita por Voller et al. (1978), los antígenos del parásito son adheridos a pocillos de placas de microtitulación de poliestireno y luego cada pocillo es incubado con las muestras diluidas de suero o plasma. Si las muestras tienen anticuerpos contra el parásito, éstos formarán inmunocomplejos con los antígenos, los que serán detectados por la adición de anticuerpos anti-humanos

conjugados con enzimas. La reacción enzimática será detectada mediante la presencia de productos coloreados a partir de sustratos y cromógenos solubles, pudiendo ser leídos por un espectrofotómetro a una longitud de onda determinada. La intensidad de color obtenida al final del ensayo es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en la muestra del paciente [8].

Tanto la técnica de ELISA como la de IFI presentan desventajas en su desarrollo, lectura e interpretación. En el caso de la técnica de ELISA, la lectura de la reacción enzimática debe realizarse inmediatamente usando un lector de placas de ELISA así como el software adecuado para la obtención e interpretación de los resultados lo cual permite una correcta discriminación de las muestras de pacientes sospechosos de la enfermedad con aquellos que no la presenten. Igualmente la técnica de IFI necesita de un microscopio de fluorescencia para la visualización de inmunocomplejos formados, así como un personal altamente capacitado en la lectura e interpretación de los resultados, motivo por el cual si bien es la técnica que mejor especificidad posee es una de las que genera mayor costo en su ejecución. Por otro lado, es imprescindible la debida confirmación de los resultados de estas pruebas para evitar un diagnóstico errado, debido a la ocurrencia de reacciones cruzadas en individuos infectados por especies de *Leishmania spp.* o por *T. rangeli*, complicando así el serodiagnóstico [9].

Es por ello que en los últimos años se ha puesto atención al desarrollo de alternativas diagnósticas sencillas, que no requieran de equipamiento especializado, que permitan analizar un gran número de muestras, de bajo costo y que puedan ser utilizadas en estudios de campo. Entre ellas, se puede mencionar al dot-ELISA que es una técnica similar a un ELISA con la diferencia que el o los antígenos son adheridos a membranas de nitrocelulosa y utiliza cromógenos precipitables que permiten obtener una lectura visual de los resultados [10].

Desde que Pappas et al. (1988) adaptaron esta técnica para el serodiagnóstico de la leishmaniasis visceral, se hizo evidente que el procedimiento de la técnica es mucho más rápido, sencillo y económico que el propio ELISA, de manera que no necesita de personal y/o equipos especializados. Esta técnica ha sido utilizada en el

serodiagnóstico de diversas parasitosis, incluyendo a la tripanosomiasis americana ya que permite la detección de anticuerpos séricos contra antígenos del parásito [10-13].

Varias de las pruebas inmunoserológicas utilizan como fuente de antígeno al parásito completo o extractos antigénicos del estadio epimastigote, lo que aumenta la sensibilidad de la prueba, pero también la probabilidad de un resultado falso positivo debido a reacción cruzada con especies de *Leishmania* [14]. Por otro lado, los antígenos de excreción-secreción de tripomastigote (TESA) o antígenos recombinantes poseen una elevada especificidad pero requieren de procesos sofisticados y de alto costo económico para su producción u obtención [15-16].

Desde hace décadas se buscan antígenos que sean fáciles de obtener y que no generen elevados costos para su producción. Por ello, varios estudios han optado por la utilización de antígenos somáticos de estadio epimastigote fijados en formol para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sueros humanos mediante técnicas inmunoenzimáticas. Uno de los primeros trabajos con este tipo de antígeno fue el de Hubsch et al. (1988), quienes utilizaron dos preparaciones antigénicas del parásito (extracto citoplasmático y parásitos enteros de estadio epimastigote) para evaluar su aplicabilidad diagnóstica [17]. Del mismo modo, Carbonetto et al. (1989), también utilizaron epimastigotes formolados tanto para la técnica de ELISA como para el dot-ELISA, presentando elevados valores de sensibilidad y especificidad, cercanos al 100% e inclusive la prueba de dot-ELISA obtuvo una sensibilidad del 100%, siendo conveniente su utilidad como una prueba de tamizaje en banco de sangre [18].

En la búsqueda de un antígeno adecuado para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, Berrizbeitia et al. (2004-2006) realizaron un estudio comparativo entre los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes (TESA) y epimastigotes fijados con formol al 2% mediante la técnica ELISA. A diferencia de los TESA que fueron obtenidos a través de cultivo de tripomastigotes en monocapa de células hospederas, procesos de purificación, concentración y caracterización (lo que representó un elevado costo para su producción), los epimastigotes fueron obtenidos a través de cultivo en su fase logarítmica. El punto de corte del ELISA fue de 0.40 y se obtuvo una sensibilidad de 100% y especificidad de 99.9% para el antígeno somático formolado de estadio epimastigote [19].

Posteriormente, se realizó un estudio comparativo entre las tres formas del parásito (tripomastigote, epimastigote y amastigote) fijados en formol al 2% mediante la técnica ELISA en un panel de 435 sueros. Mientras que todas las formas del parásito obtuvieron una sensibilidad del 100%, se obtuvo una mayor especificidad (99.3%) para la forma de tripomastigote, seguido para la forma de epimastigote (98.3%) y luego para las formas de amastigote (97.6%). Además, la estabilidad de los antígenos fue de al menos cuatro meses a 4°C, siendo candidatos adecuados para pruebas de tamizaje en banco de sangre [20].

Estos hallazgos muestran que los epimastigotes fijados con formol pueden ser muy bien utilizados como fuente de antígenos en las pruebas inmunológicas y parecen ser una buena alternativa para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por ello, se plantea el siguiente problema de investigación: ¿Son los epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* útiles para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas mediante la técnica dot-ELISA?

1.2. Importancia de la investigación

La enfermedad de Chagas es considerada una de las enfermedades tropicales desatendidas que presenta una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel de América Latina. Aunque la OMS haya tomado directivas para la disminución de la transmisión de esta enfermedad, los resultados obtenidos no han sido los previstos debido a la situación económica de las zonas endémicas, que son mayormente áreas rurales, de bajos recursos económicos, tal como sucede en nuestro país. [1,2]

Las técnicas serológicas más utilizadas para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en nuestro medio son la hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), considerándose a estas dos últimas como las técnicas de mejor sensibilidad y especificidad para serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica.

Todas ellas se basan principalmente en la detección de anticuerpos de tipo inmunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma sanguíneo de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad.

Tanto la técnica de ELISA como la IFI presentan la desventaja del alto coste económico en equipamiento e infraestructura así como personal altamente capacitado; es por ello que en los últimos años se ha puesto atención al desarrollo de alternativas sencillas que no requieran de equipamiento especializado, que permitan analizar un gran número de muestras a bajo costo y sobre todo para servir como apoyo a estudios de campo.

El dot-ELISA es una técnica que cumple con dichas características, donde el antígeno es depositado en una membrana de nitrocelulosa y los pasos subsiguientes son similares a la técnica de ELISA con la diferencia de que esta técnica utiliza cromógenos precipitables. Esta técnica ha sido utilizada para el serodiagnóstico de diversas parasitosis, incluyendo a la tripanosomiasis americana, pues permite la detección de anticuerpos séricos contra antígenos del parásito.

Es por ello que en base a los resultados obtenidos con el uso de epimastigotes fijados en formol en otros inmunoensayos, como lo es la técnica ELISA e incluso la IFI, se espera obtener resultados similares en la técnica de dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, pudiendo evaluar así la utilidad de este tipo de antígeno en la técnica dot-ELISA ya que su producción resulta ser fácil y económica a diferencia de los antígenos de excreción y secreción de tripomastigotes, los antígenos recombinantes y antígenos purificados que son mucho más difíciles de producir y generan un costo más elevado. Teniendo un antígeno de fácil producción que se adhiere a un soporte, como es la nitrocelulosa, la prueba de dot-ELISA busca ser una alternativa en aquellos lugares en los cuales no se cuenta con gran equipamiento y sobre todo como prueba diagnóstica en estudios de campo en zonas endémicas para un diagnóstico rápido y oportuno.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la utilidad de epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* en la técnica dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica dot-ELISA con epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar el rendimiento clínico de la técnica dot-ELISA con epimastigotes formolados a través de los valores predictivos.
- Establecer el impacto clínico de la técnica dot-ELISA con epimastigotes formolados a través de la razón de verosimilitud.
- Comparar la estabilidad del antígeno (epimastigotes formolados) utilizado en la prueba de dot- ELISA en un periodo de 6 meses con 03 mediciones.
- Determinar la reactividad cruzada en sueros de pacientes con otras enfermedades infecciosas.

1.4. Bases teóricas

1.4.1. Base teórica

1.4.1.1. Ciclo de vida del parásito

Los parásitos del género *Trypanosoma* alternan su ciclo de vida en dos tipos de hospederos: vertebrado e invertebrado. Entre los principales hospederos vertebrados se encuentra el hombre y aproximadamente 33 especies de pequeños mamíferos pertenecientes a seis órdenes incluidos Marsupialia, Carnívora y Primata, a diferencia de los hospederos invertebrados que comprenden 16 especies de insectos hematófagos distribuidos en algunos géneros de la subfamilia Triatominae. De esta manera, *T. cruzi* está circulando tanto en ambiente doméstico y peridoméstico como silvestre [21].

En el caso de *T. cruzi*, se pueden diferenciar tres estadios principales diferenciados por su morfología según su flagelo y la posición del kinetoplasto en relación al núcleo celular del protozoo. El protozoo en estadio amastigote se localiza en el interior de vacuolas acídicas dentro de las células del hospedero tomando una forma redondeada característica. El estadio epimastigote se caracteriza por su forma alargada y poseen la capacidad de dividirse en el intestino del hospedador invertebrado así como en cultivos axénicos. El estadio tripomastigote es la forma flagelada que no se replica en el interior de ambos hospederos. Se denominan tripomastigotes sanguíneos (TS) a las formas circulantes en el hospedero vertebrado y tripomastigotes metacíclicos (TM) a las formas diferenciadas en el hospedero invertebrado, siendo este último la forma infectante del parásito [22].

El ciclo de vida del parásito es complejo e incluye etapas tanto en el vector invertebrado como en el hospedador vertebrado. La infección ocurre mientras el vector se alimenta del hospedero vertebrado. Inmediatamente después de succionar la sangre, el vector defeca liberando los parásitos (TM) en las heces. Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde estos se diferencian a amastigotes, los cuales presentan ciclos de división binaria cada 12 horas. Los amastigotes pueden diferenciarse a tripomastigotes, que reingresan al torrente sanguíneo una vez liberados mediante la lisis de la célula hospedadora [23].

Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células o bien pueden ser ingeridos por el insecto vector durante una nueva picadura al hospedero. En el intestino medio del insecto, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian a epimastigotes (forma replicativa), y en el resto del tracto digestivo se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (estadio infeccioso, no replicativo) completándose de esta manera el ciclo de vida del parásito [23].

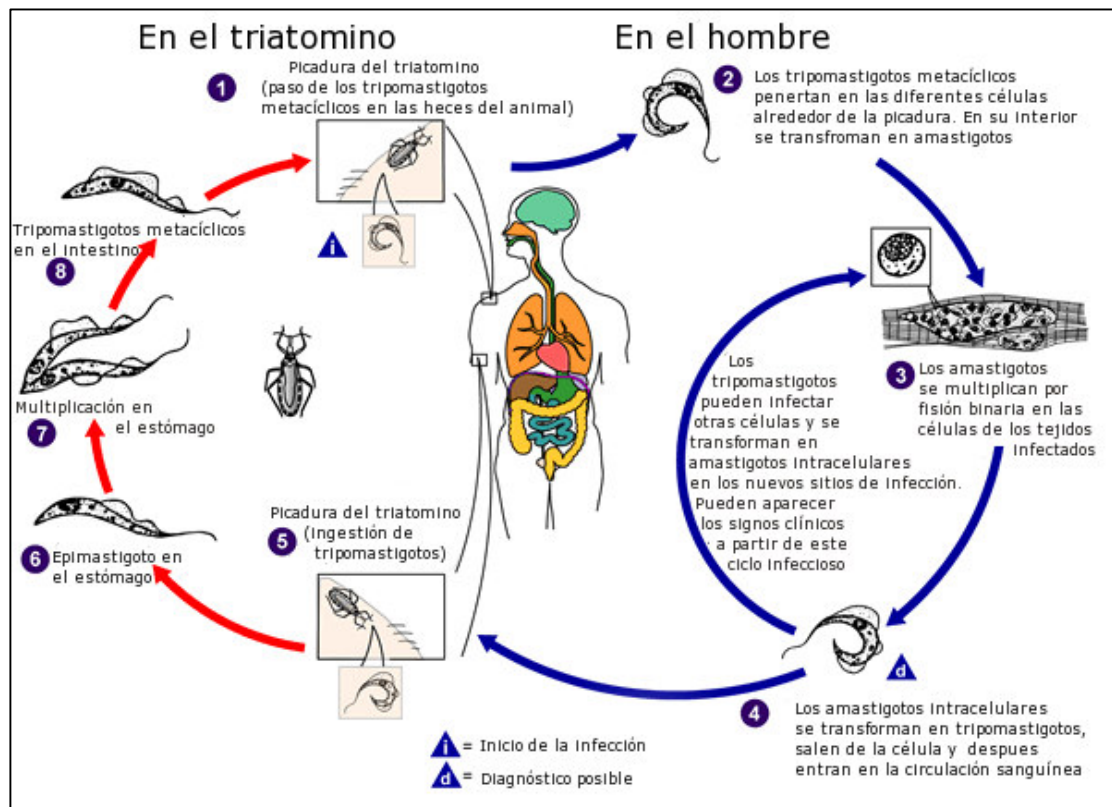


Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centro para el Control y Detección de enfermedades (CDC).

1.4.1.2. Ciclos epidemiológicos de transmisión

Se presentan ciclos silvestres sin participación del hombre y ciclos domiciliarios con su participación, los cuales están integrados y son interdependientes. Hay tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* en los que interviene el vector.

El ciclo doméstico se produce en la zona rural donde las viviendas son de adobe y material vegetal; aquí habitan los seres humanos, perros y gran cantidad de animales domésticos siendo los principales reservorios del parásito. Los insectos vectores domiciliarios más conocidos son *Triatoma infestans*, principal vector en los países del cono sur del continente y *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países andinos y centroamericanos. El ciclo selvático es característico de América, donde se han descubierto más de 180 especies de pequeños mamíferos silvestres, terrestres o arbóreos que son infectados de forma natural por *T. cruzi*. Intervienen triatominos selváticos que se infectan y a su vez infectan a roedores, marsupiales y otros animales silvestres, tales como armadillos y otros roedores. Varias especies de triatominos conforman el ciclo silvestre de *T. cruzi*, tales como *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius colombiensis* entre otros. El ciclo peridoméstico es el nexo entre el ciclo doméstico y selvático en el cual intervienen gran variedad de mamíferos como roedores, marsupiales y perros; y triatomas selváticos atraídos hacia las casas por la luz y el alimento [24].

1.4.1.3. Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es el vectorial por el contacto con insectos triatominos hematófagos obligados que presentan hábitos nocturnos de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* predominantes en zonas rurales. Los movimientos migratorios de las zonas rurales a urbanas en América Latina a partir de los años sesenta cambiaron el patrón epidemiológico tradicional de transmisión de *T. cruzi*, pues el protozoo podría ser transmitido por transfusión sanguínea. En las últimas dos décadas, el número de donantes con serología positiva ha sido muy alto en los países endémicos; es por ello que actualmente en la mayoría de los países de América Latina la provisión de sistemas para el cribado de donantes de sangre en bancos de sangre ha sido obligatoria por ley para prevenir la transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea. La enfermedad de Chagas congénita no se limita en modo alguno a las zonas rurales, sino que también se informa con una frecuencia creciente en las ciudades donde no existe transmisión

vectorial, sino a la que gran número de mujeres infectadas en edad fértil han emigrado del campo. La transmisión por trasplante de órganos de donadores infectados se ha reportado en casos de trasplante de riñón, corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos, notificándose casos en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela. La transmisión accidental ha sido documentada en técnicos, médicos e investigadores, al manipular diferentes tipos de materiales contaminados, como excretas de triatomos, cultivos de parásitos y sangre infectada de seres humanos y animales. En los últimos años se ha notificado la transmisión oral de la enfermedad de Chagas, luego de la ingesta de alimentos contaminados con triatomos infectados o sus excretas, sobre todo en la Amazonía brasilera [25].

1.4.1.4. Patogénesis y manifestaciones clínicas

El periodo de incubación después de la transmisión vectorial es de 1 a 2 semanas. La característica distintiva de la fase aguda es la alta parasitemia detectada microscópicamente. Los síntomas suelen ser leves e inespecíficos e incluyen fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. En algunos casos se observa un nódulo cutáneo (chagoma) o edema del párpado conocido como “signo de Romana”. La gran mayoría de las infecciones agudas nunca se detectan, por ello, en menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es grave y pone en peligro la vida debido a meningoencefalitis o miocarditis [26]. En las personas que sobreviven a la fase aguda, la respuesta inmune mediada por células controla la replicación del parásito, los síntomas se resuelven espontáneamente y la parasitemia patente desaparece en 4 a 8 semanas [27].

La desaparición de los síntomas marca el inicio de la fase indeterminada, que en un 70% de los pacientes permanece de por vida, la cual viene definida por detección de IgG específicas y/o hallazgos del parásito, ausencia de signos y síntomas de la enfermedad, electrocardiograma normal así como tamaño normal del corazón, esófago y colón. Del resto, dos tercios desarrollarán alguna forma cardíaca y un tercio terminará con una patología gastrointestinal [28].

La fase crónica de la infección por *T. cruzi* se caracteriza porque la mayoría de las personas con sospecha de la enfermedad permanecen asintomáticas, pero están infectadas para toda la vida estimándose que el 20 al 30% de las personas infectadas tienen progresión a la cardiomiopatía crónica de Chagas. Los signos más tempranos son típicamente una reacción fibrótica que daña el músculo cardíaco, defectos del sistema de conducción, especialmente bloqueo de rama derecha o bloque fascicular anterior izquierdo y fallas a nivel del sistema nervioso entérico [29].

Los pacientes afectados eventualmente tienen progresión a la cardiomiopatía dilatada y la insuficiencia cardíaca congestiva. Los aneurismas del ventrículo izquierdo son comunes en cardiomiopatías avanzadas de Chagas. Los pacientes pueden tener derrames u otros eventos tromboembólicos como resultado de la formación de trombos en el ventrículo izquierdo dilatado o aneurisma. Las personas infectadas sin miocardiopatía manifiesta pueden tener anomalías sutiles en la ecocardiografía o pruebas autonómicas, pero el valor pronóstico de estos signos es desconocido [30].

1.4.1.5. Respuesta inmune

Durante el contacto hospedador-parásito interaccionan las glicoproteínas del grupo mucinas presentes en el parásito que se encuentran ancladas en la membrana plasmática del parásito a través de gluco-fosfatidil-inositol (GPI) con los macrófagos y/o células dendríticas próximos al lugar de penetración [31].

Uno de los mecanismos de invasión a macrófagos más utilizados por los tripomastigotes es la fagocitosis, proceso mediado por actina ya que reúne a los lisosomas en el lugar de entrada. Las células no fagocíticas son invadidas por endocitosis, mecanismo activo promovido por el parásito provocando una invaginación de la membrana y una posterior formación de una vacuola que se fusiona con los lisosomas formando un fagolisosoma. Si esta fusión no tiene lugar, el proceso es reversible y el tripomastigote puede volver al medio extracelular [32,33].

El reconocimiento del parásito por macrófagos es a través de receptores tipo Toll (TLRs), los cuales reconocen ácidos grasos de las zonas de anclaje de las mucinas presentes en la membrana del parásito (GPI). El TLR2 reconoce la proteína Tc52 secretada por el parásito induciendo la secreción de citoquinas y moléculas coestimuladoras vía NF- κ B y los GPI de tripomastigotes metacíclicos que poseen ceramida son reconocidos por TLR4 [34,35].

El reconocimiento de los PAMPs del parásito por parte del sistema inmunitario activa los mecanismos de la inmunidad innata que controlan parcialmente la infección, iniciando la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF, quimioquinas quimiotácticas como CCL5 para linfocitos T, células NK, eosinófilos, basófilos y moléculas de adhesión que señalizan el lugar del foco inflamatorio [36].

Todo ello prepara el terreno para la llegada de los elementos de la inmunidad adaptativa especialmente linfocitos T activados, aumentando el proceso inflamatorio y el poder destructor de los componentes del sistema inmunitario para finalmente dar la señal a las células dendríticas para que inicien su proceso de migración a los ganglios. Asimismo, los macrófagos y células dendríticas comienzan a secretar IL-12 que inducirá la producción de IFN- γ en células NK, y proporcionará la señal polarizante para derivar la respuesta hacia el tipo Th1. El IFN- γ producido por linfocitos T activados y células NK induce la activación de las células fagocíticas que efectuarán la “explosión respiratoria” aumentando la eficacia de la respuesta. La producción de IFN- γ resulta crucial para el control de la infección durante la fase aguda, comprobándose un agravamiento de los síntomas y una alta mortalidad tras su bloqueo [36].

Finalmente, llegan también a la zona los linfocitos T citotóxicos, capaces de reconocer y destruir a las células infectadas, produciendo más IFN- γ , que derivará la respuesta aún más hacia el perfil Th1. Actualmente se ha sugerido que IL-17 juega un papel protector en las infecciones por este parásito [37].

Cuando los tripomastigotes son fagocitados por células dendríticas, el péptido generado es exógeno y sigue la ruta normal de presentación a los linfocitos T CD4+ vía CMH-II. Sin embargo, cuando los tripomastigotes rompen la vacuola parasitófora

y se instalan en el citoplasma como amastigotes, las proteínas procedentes del parásito, ya sean secretadas, excretadas o producto de su lisis son interpretadas por la célula como proteínas endógenas y presentadas vía CMH-I a los linfocitos T CD8+. Indistintamente del mecanismo de entrada se formará la vacuola parasitófora, cuya composición está regulada por los lisosomas del parásito ya que forman la membrana de la vacuola, proporcionar el medio ácido adecuado para la fragmentación de la membrana y dotan de los puntos de anclaje para retener al parásito y reducir su alta movilidad, que de otro modo rompería la célula y no se produciría la infección.

Posteriormente el parásito “escapa” de la vacuola debido a la lisis de la membrana, liberando al tripomastigote sanguíneo. Este último elimina residuos de ácido siálico de la membrana vacuolar haciéndola sensible al factor secretado por el parásito denominado Tc-TOX, homólogo al componente C9 del complemento [38].

Mientras el hospedador prepara una adecuada respuesta adaptativa, el parásito se defiende bloqueando a la IL-2, responsable de la expansión clonal de linfocitos T. La inmunosupresión resultante facilita su establecimiento y propagación e inclusive algunas cepas inducen a la apoptosis celular [39].

Como la mayoría de protozoos parásitos, *T. cruzi* induce una fuerte y persistente respuesta Th1. En caso contrario, se produce una multiplicación masiva del parásito que suele terminar con la muerte del hospedador.

1.4.1.6. Diagnóstico de laboratorio

a. Diagnóstico parasitológico

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, durante las dos a ocho primeras semanas después de ocurrida la infección, los parásitos circulan en el torrente sanguíneo y son detectados mediante métodos directos. Durante esta fase, el diagnóstico de laboratorio se basa en la observación del parásito en la sangre infectada de individuos que usan una prueba de sangre fresca parasitológica, así como frotis y gota gruesa coloreados con colorante Giemsa. La prueba directa con

sangre fresca es más sensible que la prueba de frotis teñida, y debe ser el método de elección durante la fase aguda de la infección [40].

Los métodos de concentración de parásitos como el método de Strout y el microhematocrito son necesarios cuando el nivel de parasitemia es bajo. En la técnica de concentración de Strout, los parásitos son concentrados por centrifugación y el sedimento se observa al microscopio en busca de tripomastigotes móviles del parásito. Es una técnica simple y de buena sensibilidad en casos agudos de enfermedad de Chagas y en el seguimiento de casos congénitos. El microhematocrito consiste en concentrar por centrifugación los parásitos de una muestra de sangre colectada en capilares heparinizados. Los tripanosomas presentes en la muestra se ubicarán entre los glóbulos blancos y el plasma. Se debe observar al microscopio la zona del plasma aproximadamente a 10 mm de los glóbulos blancos, buscando las formas tripomastigotes móviles del parásito. También se puede realizar la lectura colocando la muestra entre la lámina y laminilla, quebrando el capilar y dejando caer la muestra en el portaobjetos [41].

El xenodiagnóstico y el hemocultivo (posible sólo en laboratorios especializados) son métodos parasitológicos indirectos clásicos cuya sensibilidad depende del nivel de parasitemia del individuo afectado. El hemocultivo consiste en sembrar una muestra de sangre en medio de cultivo artificial o celular, con la finalidad de amplificar el número de parásitos presentes y confirmar el diagnóstico. Presenta una sensibilidad alta en los casos agudos y congénitos. La limitación de la prueba está en el prolongado tiempo de incubación que se requiere para emitir el informe del resultado. El xenodiagnóstico permite la multiplicación del parásito in vivo y consiste en hacer picar a la persona sospechosa de infección por el vector libre de infección, de preferencia la especie de triatomo de mayor importancia en la región. Cada 15 días se alimenta al triatomo en estadio ninfa y a los 30 días se examina una muestra de heces al microscopio donde se buscará la presencia de epimastigotes o tripomastigotes metacíclicos. Es aplicable tanto en la forma clínica aguda como en la forma crónica de portador [6,41].

Las pruebas moleculares como el PCR se han utilizado en el diagnóstico parasitológico de diversas enfermedades. Esta técnica se basa en la amplificación de

secuencias diana de ADN, que son abundantes y específicas para el parásito en estudio. Para *T. cruzi*, dos secuencias diana han demostrado su utilidad en el diagnóstico: la región variable del minicírculo del ADN cinetoplástico y una secuencia de ADN repetitiva de 195 bp del parásito. Debido a la complejidad de los procedimientos de PCR, este tipo de diagnóstico debe realizarse sólo en laboratorios especializados. La sensibilidad de la técnica es mayor que la del xenodiagnóstico y el hemocultivo, sin embargo, esta sensibilidad también depende del nivel de parasitemia del individuo. Otra aplicación importante de la PCR es la detección de parásitos en los tejidos de individuos crónicamente infectados y en la transmisión congénita [42,43].

b. Serodiagnóstico

El diagnóstico serológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas se basa en la determinación de anticuerpos específicos contra la mezcla antigénica del parásito. Las pruebas serológicas no son útiles para diagnosticar la enfermedad de Chagas en la fase aguda aunque algunos ensayos serológicos detectan anticuerpos IgM e IgA. En la fase crónica, debido a una parasitemia baja y probablemente intermitente, el diagnóstico se basa en la detección serológica de anticuerpos específicos de IgG [44].

En la actualidad se dispone de un amplio número de pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas que se diferencian entre sí por el principio de la técnica o los antígenos que utilizan, factores que condicionan su sensibilidad y especificidad. Varias pruebas de diagnóstico están disponibles, algunas de las cuales son consideradas como convencionales; que han sido ampliamente validado, están disponibles en el mercado, y se utilizan en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, ciertas pruebas que todavía se someten a prueba tienen una mejor especificidad, y algunas de ellas pueden tener una serie de ventajas operativas [45].

Las pruebas convencionales son aquellas que emplean parásitos totales como fuente de antígenos, utilizando antígenos crudos o totales y presentan más reacciones cruzadas, con lo que la especificidad es menor. Las pruebas no convencionales son

aquellas que utilizan antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos, entre ellos tenemos las pruebas rápidas de inmunocromatografía. A pesar de disponer de diversas pruebas serológicas no existe un consenso general en establecer las pruebas de referencia y ningún test está considerado el “gold standard” para confirmar el diagnóstico de infección por este parásito. La serología es una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, pero en ciertas circunstancias ninguna de las técnicas anteriormente descritas sirve como marcador de curación o evolución de la infección, puesto que después de un tratamiento, si hay curación, la seroconversión puede tardar muchos años [6,46].

La hemaglutinación indirecta utiliza glóbulos rojos de carnero previamente tratados con ácido tánico, los cuales cumplen la función de soporte para extracto soluble del parásito (antígeno). Cuando se evalúan muchos sueros es apropiado realizar el tamizaje con la dilución de valor diagnóstico (1/4), la cual permitirá discriminar entre los sueros reactivos y no reactivos. La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón; a diferencia de la reactividad del suero la cual se manifiesta por la formación de una malla de bordes irregulares que cubre al 50-100% del fondo del pocillo. Se considera como positiva la muestra a partir de la dilución 1/4 y se informa con el título de la última dilución positiva. Esta prueba se caracteriza por ser una prueba altamente sensible y específica [41].

La técnica de ELISA emplea antígenos solubles de *T. cruzi* adheridos a soportes inertes (placa de microtitulación) y antiglobulinas humanas conjugadas con enzimas como detectores de la reacción antígeno-anticuerpo. Es un método de gran sensibilidad, pero cuya especificidad está sujeta a la calidad de los antígenos y reactivos empleados por lo que exigen una rigurosa estandarización. La lectura de la reacción se puede realizar de dos maneras, una lectura visual y la otra con lector de ELISA. Si se opta por el primer método de lectura debe considerarse “Reactiva” a aquella muestra con coloración similar al control positivo, y “No reactiva” a toda muestra que no presente coloración o que ésta sea igual que la de los controles negativos. Para que la prueba tenga validez, los controles positivo, negativo y control interno deben reaccionar como tales, es decir que la absorbancia de cada uno de ellos corresponda al valor predeterminado [41].

La IFI emplea como antígeno, epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo y fijados en láminas sobre las que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. La formación de este complejo es evidenciado por una antiglobulina humana marcada con fluoresceína. La lectura se realiza en microscopio fluorescente, primero se examinan los controles positivos donde debe observarse la superficie y el flagelo de los parásitos de un color verde manzana fluorescente y en el control negativo al igual que en el blanco de reactivos, debe observarse el parásito de color rojizo opaco, sin fluorescencia. Si los controles responden como tales, la corrida es válida y se continúa con la lectura de las muestras examinadas. Cuando la superficie o los bordes de los parásitos fluorescen de un color verde manzana se reporta como “reactivo”, si los parásitos se observan opacos entre rojizos y marrones oscuros se informa con “no reactivo” y si se observa una débil fluorescencia no homogénea en los parásitos se considerará como un resultado indeterminado [41,47].

1.4.2. Definición de términos

- Epimastigote: Estadio en el ciclo de vida unicelular, típicamente del protozoo *Trypanosoma cruzi*, donde el flagelo es anterior del núcleo y se fija el cuerpo de la célula por una membrana corta.
- IFI: Técnica de inmunomarcación basada en la detección de anticuerpos específicos contra un determinado antígeno presente en la muestra problema, para ello en una primera etapa del procedimiento se hace reaccionar la muestra antigénica con anticuerpos específicos presentes en la muestra problema. En la segunda etapa se agrega anti-inmunoglobulina humana conjugada a un fluoróforo capaz de evidenciar la reacción a través de la emisión de fluorescencia.

ELISA: Ensayo inmunoenzimático de interacción primaria que utilizan moléculas conjugadas a enzimas para facilitar la detección de algún analito en particular (antígeno, anticuerpo, fármacos u otras moléculas de interés). Estas

pruebas se basan en la detección de complejos antígeno-anticuerpo mediante el empleo de enzimas unidas al antígeno o al anticuerpo, los cuales actúan sobre determinados sustratos para dar origen a productos coloreados que pueden ser medidos espectrofotométricamente.

- dot-ELISA: Variante del ELISA que presenta los mismo principios, con la diferencia de que el antígeno es depositado sobre la membrana de nitrocelulosa y utiliza cromógenos precipitables para que la reacción sea observada a simple vista.

1.4.3. Formulación de la hipótesis

La técnica de dot-ELISA con epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* puede detectar anticuerpos IgG en pacientes infectados con una sensibilidad y especificidad cercanas al 90%, valores predictivos positivo y negativo iguales o mayores al 85%; y un impacto clínico elevado.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1. Diseño metodológico

2.1.1. Tipo de investigación

Estudio cuantitativo de tipo descriptivo y sin intervención.

2.1.2. Diseño de investigación

Diseño observacional retrospectivo de corte transversal.

2.1.3. Población

Sueros reactivos para anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* por lo menos con dos métodos (IFI y ELISA), sueros reactivos para otras infecciones (parasitarias, bacterianas y virales); y sueros no reactivos (negativos) de personas aparentemente sanas; almacenados en la seroteca del Laboratorio de Protozoología de la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”.

2.1.4. Muestra y muestreo

Se incluyeron 248 muestras de suero sanguíneo, las cuales se seleccionaron a través de un muestreo por conveniencia. Se clasificaron en 52 muestras de pacientes con enfermedad de Chagas reactivos a las pruebas de IFI y ELISA, 117 muestras de personas aparentemente sanas que fueron no reactivos a las pruebas anteriormente mencionadas y 79 muestras de pacientes con otras enfermedades infecciosas, las cuales fueron incluidas para evaluar la reactividad cruzada.

2.1.4.1. Criterios de Inclusión

- Muestras de suero que provengan de pacientes individuales (1 muestra por paciente).
- Muestras de suero en óptimas condiciones de almacenamiento.
- Muestras de suero con volumen adecuado para la ejecución del estudio.
- Muestras de suero adecuadamente identificadas con letra clara y legible.

2.1.4.2. Criterios de Exclusión

- Sueros lipémicos.
- Sueros hemolizados.
- Sueros ictéricos.

2.1.5. Variables de estudio

❖ Validez diagnóstica:

- Definición conceptual: La validez de una prueba es la capacidad para distinguir entre los individuos que tienen la enfermedad de aquellos que no la tienen.
- Dimensiones: Inadecuada, adecuada, excelente.
- Definición operacional: grado en que una prueba mide lo que debe medir a través de los valores de sensibilidad y especificidad.
- Indicadores: sensibilidad y especificidad
 1. Inadecuada: Sensibilidad y especificidad <80%.
 2. Adecuada: Sensibilidad >80% y especificidad menor de 95%.
 3. Excelente: Sensibilidad y especificidad >=95%.

❖ Rendimiento clínico:

- Definición conceptual: capacidad de una prueba en brindar resultados concordantes con una prueba de referencia.
- Dimensiones: presencia de reactividad en la técnica dot-ELISA en muestras con resultado serológico de ELISA e IFI conocido.

- Definición operacional: probabilidad de que un resultado “reactivo” presente la enfermedad, y que un resultado “no reactivo” no presente la enfermedad, a través de los valores predictivos.

- Indicadores:

1. Valor predictivo positivo.
2. Valor predictivo negativo.

❖ **Impacto clínico**

- Definición conceptual: probabilidad que evidencia con qué frecuencia un individuo padece una enfermedad cuando tiene un resultado positivo, en relación con otro individuo que no la padece, expresados con la calidad de la prueba.

- Dimensiones: excelente, buena, regular, inútil.

- Definición operacional: probabilidad de tener la enfermedad en oposición a no tenerla, teniendo un resultado del test positivo y la probabilidad de no tener la enfermedad en oposición a tenerla, teniendo un resultado del test negativo.

- Indicadores: Razón de verosimilitud positiva, Razón de verosimilitud negativa.

1. Calidad de excelente: $LR+ >10$; $LR- <0,1$.
2. Calidad de bueno: $LR+$ entre 5 y 10; $LR-$ entre 0,1 y 0,2.
3. Calidad de regular: $LR+$ entre 5 y 2; $LR-$ entre 0,2 y 0,5.
4. Calidad de inútil: $LR+ <2$; $LR-$ entre 0,5 y 1.

2.1.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La recolección de datos fue a través de la observación con una lista de chequeo elaborada para su correcta recolección (Anexo 5).

2.1.7. Procedimientos y análisis de datos

2.1.7.1. Procedimientos

El desarrollo y evaluación de la técnica de dot-ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* se realizó con muestras de suero provenientes de la seroteca del Laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”, los cuales estuvieron almacenados a -20°C. Estas muestras de suero provienen de pacientes con enfermedad de Chagas y con serología reactiva para IFI y ELISA, de individuos aparentemente sanos y de pacientes con otras patologías. Es importante mencionar que estas muestras ya fueron utilizadas en otros estudios y se ha obtenido autorización al laboratorio que posee dicha seroteca para fines de investigación, manteniendo la confidencialidad de la identidad de las muestras de suero a ser utilizadas (Anexo 1).

A continuación se procederá a explicar los procedimientos que fueron realizados en el presente trabajo.

a. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la realización de la prueba de IFI, se siguió la metodología descrita por Vega y Náquira (2006) [48]. Brevemente, se obtuvieron formas epimastigotes de *T. cruzi* a partir de cultivos en medio LIT. Los parásitos fueron lavados tres veces con PBS por centrifugación a 4,000 rpm por 10 minutos y luego fueron fijados con formol al 2% en PBS por 24 horas a 4°C. A continuación, los parásitos fueron lavados con PBS y resuspendidos en PBS para luego ser contados en cámara de Neubauer; la suspensión antigénica fue diluida de tal manera que permitiera observar entre 30-40 parásitos por campo al objetivo 40x del microscopio óptico. A continuación, se procedió a

depositar 25 μ L de la suspensión de parásitos sobre cada una de las 8 áreas circulares de láminas especiales para inmunofluorescencia (Marienfeld GmbH & Co. KG, Germany) y luego fueron puestas a secar a temperatura ambiente por 1 hora. Luego se procedió a fijarlos con acetona fría por 10 minutos y puestas a secar para ser utilizadas en el ensayo o guardadas a -20°C hasta el momento de su uso.

Todas las muestras de suero y los controles (positivo y negativo) fueron diluidos 1/32 en albúmina sérica bovina al 1% en PBS (PBS-BSA) y 15 μ L fueron depositadas en las áreas redondas de la lámina e incubadas a 37°C durante 60 minutos. Las láminas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 80 al 1% durante 5 minutos. A continuación, se procedió a dispensar anticuerpos anti-IgG humano conjugado con isotiacianato de fluoresceína diluido 1/50 en PBS-BSA e incubados a 37°C durante 30 minutos. Las láminas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 80 al 1% durante 5 minutos y luego fueron incubadas con 15 μ L de azul de Evans al 0.01% en PBS-Tween 80 a temperatura ambiente. Las láminas fueron lavadas con agua destilada, puestas a secar y se cubrió con una laminilla cubreobjetos. Las láminas se analizaron bajo el microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) utilizando un filtro banda azul de 470-490 nm.

Según lo descrito por Vega y Náquira (2006), la clasificación de la muestra como positiva o negativa se debe a la presencia o no de parásitos con emisión de fluorescencia de color verde manzana, específicamente en la superficie y el flagelo de los parásitos. Según la intensidad o ausencia de fluorescencia que muestran los parásitos al final del ensayo, una muestra de suero se puede catalogar como “reactivo” cuando la superficie o los bordes de los parásitos fluorescen de color verde manzana, y como “no reactivo”(-) si los parásitos se observan opacos entre rojizos y marrones oscuros. En aquellas muestras de suero sanguíneo que presenten una débil fluorescencia no homogénea en los parásitos será considerado como “indeterminado” [48] (Anexo 2).

b. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (Chagatest ELISA recombinante v. 4.0 – Wiener lab)

Es un ensayo inmunoenzimático comercial en placas de poliestireno para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano con una sensibilidad del 99.13% - 100% y una especificidad de 98.30% - 99.66%. Esta prueba utiliza seis antígenos recombinantes (*SAPA*, 1, 2, 13, 30 y 36) específicos de los estadios epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. Las muestras de suero fueron ensayadas siguiendo el procedimiento descrito en el inserto del inmunoensayo comercial [49].

Brevemente, en cada pocillo de la microplaca se dispuso 100 μ l del diluyente de muestras y luego 20 μ l de las muestras de suero y de los controles positivo y negativo; las muestras y controles fueron incubados a 37°C por 60 minutos. A continuación, los pocillos de la microplaca fueron lavados por un minuto unas 5 veces con 300 μ l de la solución de lavado. A continuación, se dispuso 100 μ L de una solución de anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa y se incubó a 37°C por 30 minutos. Cada pocillo fue lavado 5 veces como ya fue descrito anteriormente y luego se dispuso 100 μ L de una solución de substrato-cromógeno (solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 100 μ L en cada pocillo de una solución de parada (ácido sulfúrico 2 N).

Las absorbancias de cada pocillo (expresadas en densidad óptica – D.O.) fueron leídas en un lector de ELISA (ELx800 Absorbance Reader, BioTek Instruments, Inc., USA) a una longitud de onda de 450 nm. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado y en cada ensayo se incluyó un blanco de reactivos, cuyo valor de absorbancia fue restado de todos los valores de las muestras. Se tomó en cuenta las recomendaciones de validación del ensayo descritos en el inserto del kit comercial. La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* fue determinada relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del punto de corte (cut-off), que se define

como el promedio de las D.O. del control negativo más 0.200 (valor proporcionado por el kit comercial). Una muestra es considerada como “no reactiva” cuando la absorbancia es menor al cut-off, mientras que una muestra es considerada como “reactiva” cuando la absorbancia es mayor o igual al cut-off (Anexo 3).

c. Cultivo de parásitos y preparación del antígeno para la técnica de dot-ELISA

Para la preparación de los epimastigotes formolados como fuente de antígenos para la prueba dot-ELISA, se utilizó una cepa de *T. cruzi*, aislada de un paciente proveniente de la ciudad de Arequipa, denominada “cepa P”, la cual viene siendo mantenida por pasajes sucesivos en el medio de cultivo NNN y en ratones en el Laboratorio de Protozoología de la Sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM. Posteriormente estos tripomastigotes sanguíneos se cultivaron en medio LIT a 26°C durante 7 a 10 días y se cosecharon formas epimastigotes del parásito para ser lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) estéril por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos. Los parásitos fueron resuspendidos en 5 ml de formol al 2% diluido en PBS (solución fijadora) e incubados a 4°C durante 2 horas [19,20]. La solución fijadora fue eliminada por centrifugación y los parásitos fueron lavados tres veces con PBS, como ya fue anteriormente descrito; a continuación, los parásitos fueron contados en una cámara de Neubauer y el contenido fue ajustado a una concentración de 30×10^7 epimastigotes/mL y luego fueron almacenados en alícuotas a 4°C hasta el momento de su uso.

d. dot-ELISA

La detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, se realizó siguiendo la técnica de dot-ELISA tipo “dipstick” descrita por Pappas et al. (1988) [10], con algunas modificaciones. Se procedió a modificar la técnica utilizando placas de microtitulación para sumergir las membranas de nitrocelulosa (NC) en los diferentes reactantes. Las membranas de NC fueron adheridas a tiras de micas de plástico para

colocar el código del paciente y también para manipularlas mejor durante el desarrollo del ensayo. Al sumergir completamente la membrana de NC donde se encuentra el antígeno, se evitó la reacción inespecífica por desecación de los reactantes durante el ensayo.

Con estas nuevas condiciones, la prueba de dot-ELISA fue estandarizada a temperatura ambiente, realizando una serie de ensayos para determinar la concentración óptima de parásitos formolados como fuente de antígenos, la dilución óptima de la muestra de suero y del anticuerpo conjugado, los tiempos óptimos de incubación para cada reactante y el tiempo óptimo de lavado luego de la incubación de cada reactante (muestra de suero y anticuerpo conjugado). A continuación, se describe el procedimiento del dot-ELISA con las condiciones óptimas luego del proceso de estandarización.

Tiras de NC de 0.5 cm x 1cm fueron sensibilizadas con 20,000 parásitos formolados, suspendidos en un volumen de 2 uL, las que luego fueron secadas a 37°C durante 30 minutos y bloqueadas a 4°C con una solución de leche descremada al 5% diluida en PBS por 24 horas. A continuación, las tiras de NC fueron lavadas durante 5 minutos con PBS con Tween 20 al 0.3% (PBS-T) y luego fueron incubadas con las muestras de suero diluidas 1/50 con leche descremada al 5% en PBS-T durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las tiras de NC fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con PBS-T y luego fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG humano conjugado con peroxidasa a una dilución 1/3,000 con el diluyente de muestras a temperatura ambiente por 30 minutos. Las tiras de NC fueron nuevamente lavadas, como ya fue descrito anteriormente, y luego fueron sumergidas en una solución de substrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno al 0.05% y diaminobenzidina al 0.005% en buffer citrato 0.01 M, pH 6.0) e incubadas por 1 minuto en constante agitación. La reacción enzimática fue detenida mediante cuatro lavados con agua destilada en constante agitación (Anexo 4).

e. Determinación de la sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de la prueba dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados, se analizó un panel de 52 muestras de suero de pacientes con enfermedad de Chagas con serología positiva a las pruebas de IFI y ELISA comercial para anticuerpos IgG.

f. Determinación de la especificidad

Para determinar la especificidad de la prueba dot-ELISA utilizando epimastigotes de *T. cruzi* formolados, se analizó un panel de 196 muestras de suero, conformado por 117 muestras de individuos aparentemente sanos y 79 muestras de pacientes con otras infecciones causadas por otros agentes infecciosos (parásitos, bacterias y virus).

g. Determinación de reacciones cruzadas

Para la determinación de posibles reacciones cruzadas se utilizó específicamente 79 sueros con otras infecciones causadas por otros agentes infecciosos (parásitos, bacterias y virus).

h. Precisión intraensayo

Para determinar la precisión intraensayo, se eligió al azar 3 muestras de suero reactivos del panel de pacientes con enfermedad de Chagas y 3 muestras de suero no reactivos del panel de individuos aparentemente sanos y se procedió a realizar 10 ensayos repetidos utilizando un solo lote de tiras de NC que contienen los epimastigotes formolados.

i. Precisión interensayo

Para determinar la precisión interensayo se eligió al azar tres muestras de suero reactivos del panel de pacientes con enfermedad de Chagas y se procedió a realizar un total de cinco ensayos repetidos utilizando un solo lote de tiras de NC que contiene a los epimastigotes formolados en diferentes días.

2.1.7.2. Análisis de datos

Todos los datos obtenidos fueron almacenaron en una base de datos en una hoja Excel y luego se realizó el análisis estadístico descriptivo, que incluye el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos, razones de verosimilitud y precisión (Anexo 6).

2.1.8. Consideraciones éticas

En el presente estudio, todos los ensayos se realizaron con muestras de suero que fueron almacenados en una seroteca perteneciente al Laboratorio de Protozoología de la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” (Se adjunta el documento respectivo). En este estudio, no se mencionan los datos personales de los pacientes ni de los individuos de donde proceden dichas muestras de suero, manteniendo la confidencialidad, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica. Es importante mencionar que no existen conflictos de interés entre la autora de este trabajo y la asesora o el coasesor (Anexo 1).

CAPITULO III
RESULTADOS

3.1. Estandarización del dot-ELISA

3.1.1. Determinación de la concentración óptima de antígeno

La suspensión antigénica tuvo una concentración inicial de 30 millones de epimastigotes/mL, posteriormente se realizaron diluciones obteniéndose concentraciones de 20 millones, 10 millones, 1 millón y 100 mil epimastigotes/mL, en un volumen de inoculación de 2 μ L. Cada concentración antigénica fue enfrentada a un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (sueros control positivo) y un pool de sueros de individuos aparentemente sanos (sueros control negativo). Todos estos sueros fueron previamente evaluados por las técnicas de ELISA (ChagaTest) e IFI “in house” para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* de clase IgG.

La formación de una coloración oscura se consideró como un resultado “reactivo”, en el cual se visualizó un reconocimiento evidente con todas las concentraciones probadas, pero a medida que la concentración de antígeno era menor también lo fue la señal. Para el suero control negativo no se observó reacción con las concentraciones probadas, obteniéndose un resultado “no reactivo”.

La concentración óptima de parásitos formulados para la sensibilización de las tiras de NC fue de 10 millones de epimastigotes/mL (equivalente a 20,000 epimastigotes/dot), ya que concentraciones mayores a la mencionada presentaron reacciones de fondo inespecíficas con los sueros control negativos (Fig. 2).

3.1.2. Determinación de la dilución óptima del suero problema

Para la determinación del título diagnóstico de los sueros se realizaron diluciones sucesivas al medio a partir de la dilución 1/32; ya que este es el título diagnóstico en la prueba de IFI hasta la dilución 1/128. Sin embargo, estas diluciones no mostraron buenos resultados ya que hubo reacciones inespecíficas o reacciones débiles generando una inadecuada interpretación de los resultados. Posteriormente, se modifican las diluciones y se realizaron diluciones de suero de 1/25, 1/50 y 1/100.

Se observaron los resultados de cada dilución y se determinó que la mejor dilución fue la de 1/50, en la cual se observó una reacción circular de color marrón para el pool de sueros positivos, en cuanto que no hubo reacción alguna para el resultado del pool de sueros negativos no presentó reacción de fondo, a diferencia de la dilución siguiente que si la presentó (Fig. 3).

3.1.3. Determinación de la dilución óptima del conjugado

Se probaron diferentes diluciones (1/1,000, 1/2,000, 1/3,000 y 1/4,000) de anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa y diluidas en PBS-T con leche descremada al 5%, observándose que la dilución óptima fue la de 1/3,000 ya que generó una buena reacción cromogénica en la muestra de suero control positivo mientras que la muestra de suero control negativa no generó ninguna reacción inespecífica de fondo (Fig. 4).

3.1.4. Determinación del tiempo de incubación y número de lavados

Al modificarse las diluciones de suero problema a 1/25, 1/50 y 1/100 los tiempos a probar fueron de 40 minutos de incubación para el suero problema y 15 minutos para el conjugado, 40 minutos de incubación para el suero problema y 20 minutos para el conjugado y finalmente 40 minutos de incubación para el suero problema y 30 minutos para el conjugado.

El tiempo de incubación óptimo resultó ser de 40 minutos para el suero problema y 30 minutos para el conjugado, con el cual se visualizó correctamente un resultado “reactivo” y “no reactivo”.

En relación al número de lavados se probó 3 lavados, 4 lavados y 5 lavados posteriores a la incubación de la tira de nitrocelulosa en el suero problema y con el conjugado. Se determinó que 3 lavados de 5 minutos cada uno fueron suficientes

para conservar la señal de un resultado “reactivo”, ya que con 4 lavados se observó la disminución de la intensidad de la señal de reacción con los sueros control positivo.

3.2. Determinación de la sensibilidad de la prueba

La Organización Mundial de la Salud no establece una prueba de referencia para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas por lo que recomienda que la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* sea a través de dos pruebas serológicas de diferente principio o con antígenos de diferente origen. Cada prueba a ser utilizada para el serodiagnóstico debe tener las siguientes características: la primera prueba debe poseer alta sensibilidad para el tamizaje de la infección y la segunda debe poseer una elevada especificidad en la detección de anticuerpos frente al parásito para que complemente y ratifique el resultado “reactivo” obtenido en el tamizaje. Es por ello que las pruebas indicadas por la OMS son la prueba de ELISA e IFI respectivamente, ya que en conjunto alcanzan el 95-98% de sensibilidad y especificidad.

En consecuencia, se considera que un individuo ha sido infectado o expuesto a los antígenos del parásito cuando tiene un resultado “reactivo” para las dos pruebas serológicas mencionadas anteriormente, y siguiendo estas recomendaciones, en este trabajo se utilizaron como sueros positivos aquellos sueros que tuvieron un resultado positivo para IFI y ELISA.

De las 52 muestras de suero de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Chagas con resultado reactivo tanto para IFI (in house) como para ELISA (Chagatest ELISA recombinante 4.0, Wiener Lab), sólo una muestra de suero no resultó positiva, obteniéndose una sensibilidad de 98% para la técnica de dot-ELISA con epimastigotes formolados (Tabla 1).

3.3. Determinación de la especificidad de la prueba

Para evaluar la especificidad de la prueba, se trabajó con un panel de 196 sueros con resultado “no reactivo” para las prueba de IFI y ELISA. De este total de 196 muestras de suero conformados por 117 muestras de personas sanas y 79 muestras de pacientes con otras enfermedades infecciosas (considerados negativos por IFI y ELISA) se observó que 10 muestras tuvieron un resultado “reactivo” al dot-ELISA, obteniéndose una especificidad del 95% (Tabla 1).

En relación a las 79 muestras de suero de pacientes con otras enfermedades infecciosas, se encontró que 8 de las 20 muestras de suero de pacientes con leishmaniasis cutánea, 1 de las 23 muestras de suero de pacientes con VIH y 1 de las 6 muestras de sueros de pacientes con toxocariasis tuvieron un resultado positivo al dot-ELISA. (Tabla 2)

3.4. Precisión intraensayo e interensayo

Las tiras de NC sensibilizadas con el antígeno a una concentración de 20,000 epimastigotes/dot se almacenaron a -20°C protegidas de la luz. Para la determinación de la precisión intraensayo se realizaron diez ensayos repetidos frente a 3 sueros seleccionados al azar de pacientes chagásicos y personas sanas, no observándose variabilidad en los resultados. (Fig. 5)

La precisión interensayo se determinó a partir de 3 muestras reactivas escogidas al azar las cuales fueron ensayadas en 05 repeticiones en diferentes tiempos, bajo las mismas condiciones pero por diferentes operadores. Al igual que la precisión intraensayo no se observó variabilidad notoria en los resultados. (Fig. 6)

3.5. Estabilidad del antígeno

La estabilidad del antígenofue evaluada en un periodo de seis meses (3 mediciones cada 2 meses) con un pool de tres muestras de suerode pacientes chagásicos (control

positivo). Se realizó un ensayo al inicio del trabajo siguiendo el protocolo de trabajo del dot-ELISA dando como resultado una fuerte señal en la zona de reacción para el control positivo. Posteriormente las tiras de nitrocelulosa sensibilizadas fueron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz para realizarse un nuevo ensayo a los 3 meses y a los 6 meses posteriores a la sensibilización de la membrana con los epimastigotes formolados. Con el pasar de los meses se observó una disminución en la intensidad de la señal de reacción para el control positivo (Fig. 8).

3.6. Valores predictivos y razón de verosimilitud

La evaluación del rendimiento e impacto clínico de la prueba fueron evaluados por los valores predictivos y la razón de verosimilitud respectivamente. Para obtener estos valores se elaboró una tabla de contingencia con los resultados obtenidos en las pruebas de IFI y ELISA, y la técnica dot-ELISA (Tabla 3).

Para la serie de muestras estudiadas, el valor predictivo positivo de la prueba resultó ser de 0.84 y el valor predictivo negativo obtuvo un valor de 0.99, estos valores indican que un resultado “reactivo” tiene un 84% de probabilidad de presentar la enfermedad y un resultado “no reactivo” posee un 99% de probabilidad de no presentar la enfermedad.

La razón de verosimilitud positiva de la prueba fue de 19.22 y la razón de verosimilitud negativa dio un valor de 0.02. Esto significa que existe una probabilidad de 19.22 veces de tener la enfermedad en oposición a no tenerla, teniendo un resultado “reactivo” o “positivo” de la prueba en estudio. De la misma manera existe una probabilidad de 0.02 veces de no tener la enfermedad en oposición a tenerla, teniendo un resultado “negativo” o “no reactivo” de la prueba en evaluación.

TABLA 1. Sensibilidad y Especificidad de la técnica dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados de *T. cruzi*

dot-ELISA	Pacientes chagásicos*	Personas sanas y pacientes con otras enfermedades infecciosas**	Total
Reactivos	51	10	61
No reactivos	1	186	187
Total	52	196	248

* IFI + ELISA positivos ** IFI + ELISA negativos.

TABLA 2. Reacciones cruzadas obtenidas en muestras de suero de pacientes con otras enfermedades infecciosas y tropicales mediante el dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados

Sueros	N° sueros	dot-ELISA	
		Reactivo	No reactivo
Infección bacteriana			
Sífilis	2	0	2
Infecciones parasitarias			
Leishmaniasis	20	8	12
Toxoplasmosis	3	0	3
Himenolepiasis	7	0	7
Toxocariasis	6	1	5
Estrongiloidiasis	5	0	5
Cisticercosis	1	0	1
Paragonimiasis	1	0	1
Infección fúngica			
Histoplasmosis	5	0	5
Infecciones virales:			
Mononucleosis infecciosa	1	0	1
Dengue	1	0	1
Hepatitis A	2	0	2
Hepatitis B	2	0	2
VIH	23	1	22
Total	79	10	69

TABLA 3

Tabla de contingencia

dot-ELISA	Enfermedad de Chagas		Total
	Reactivo	No reactivo	
Reactivo	51	10	61
No reactivo	1	186	187
Total	52	196	248

Según los resultados obtenidos podemos evaluar la calidad de las pruebas con un $LR+ >10$: prueba excelente, $LR+$ entre 5 y 10: prueba bueno, $LR+$ entre 5 y 2: prueba regular, $LR+ < 2$: prueba inútil, $LR-$ entre 0,5 y 1 prueba inútil, $LR-$ entre 0,2 y 0,5: prueba regular, $LR-$ entre 0,1 y 0,2: prueba bueno, $LR- < 0,1$: prueba excelente [54].

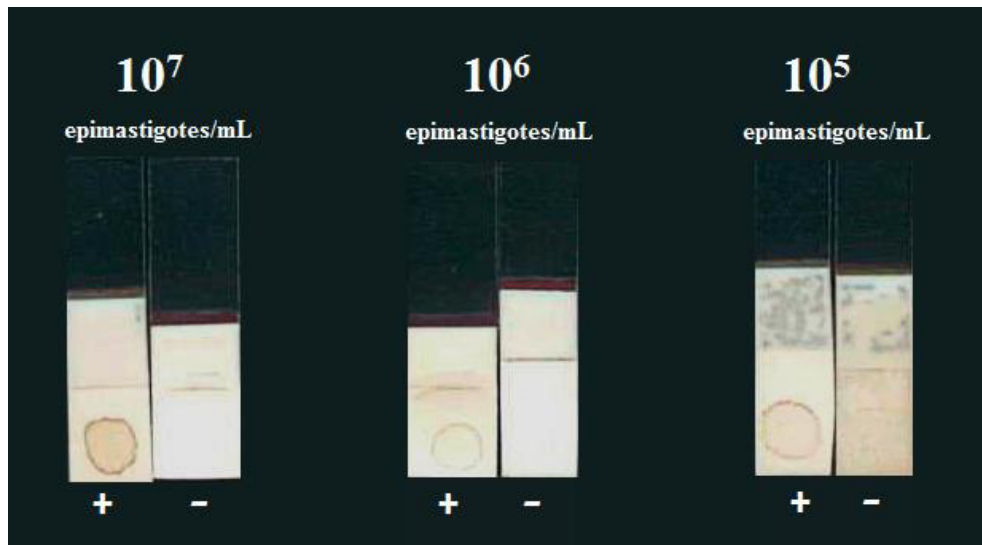


Figura 2. Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la concentración óptima de antígeno.

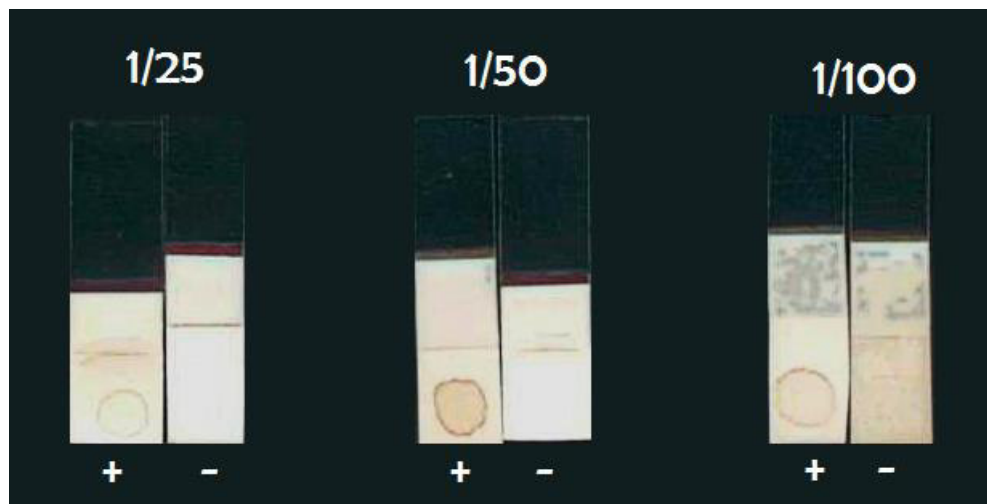


Figura 3. Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la dilución óptima del suero problema.

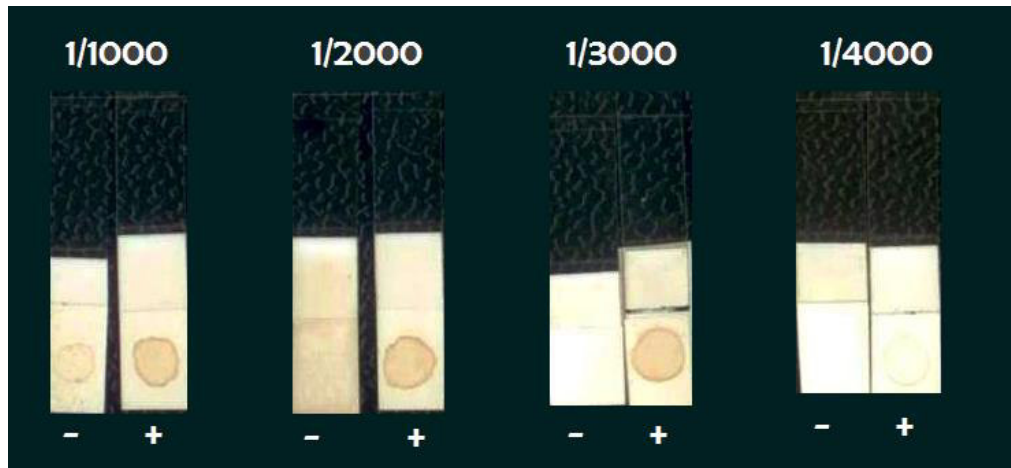


Figura 4. Estandarización del dot-ELISA. Determinación de la dilución óptima del conjugado.

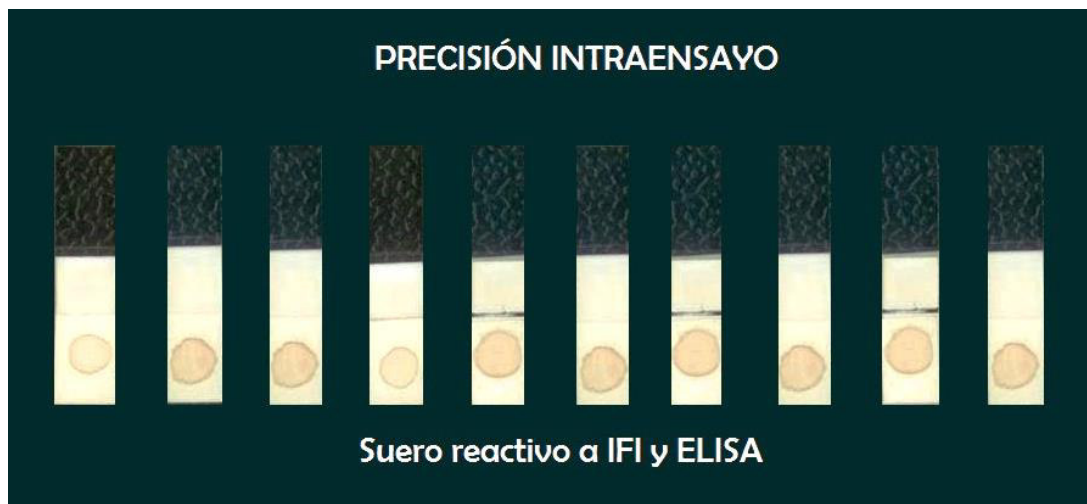


Figura 5. Precisión intraensayo de la técnica dot-ELISA con un suero reactivo a IFI y ELISA.

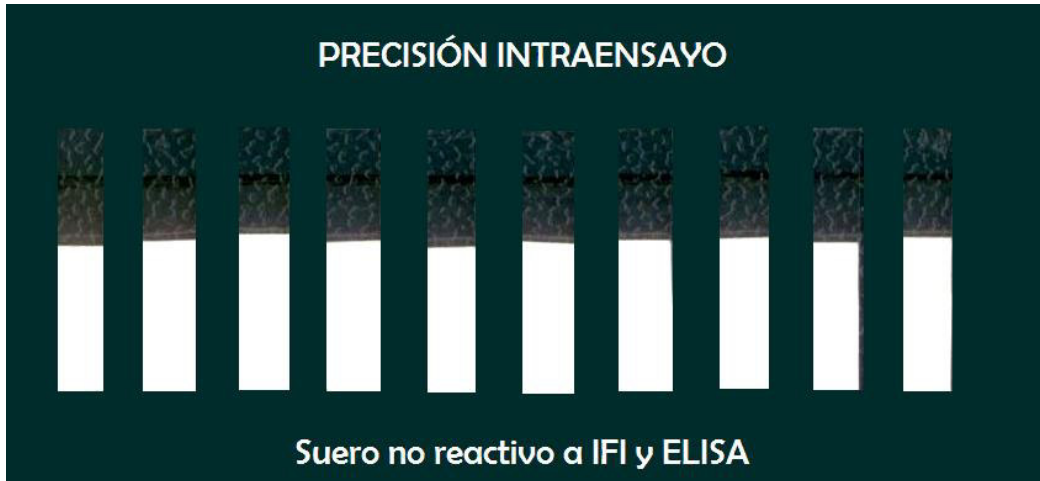
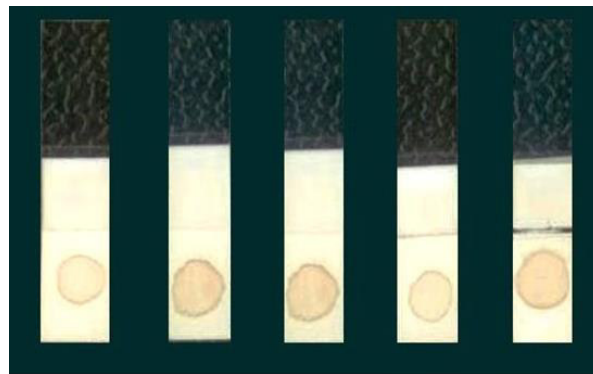
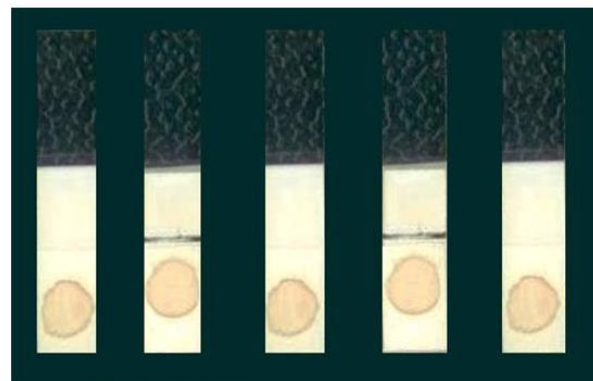


Figura 6. Precisión intraensayo de la técnica dot-ELISA con un suero no reactivo a IFI y ELISA.



Operador 1



Operador 2

Figura 7. Precisión interensayo



Figura 8. Evaluación de la estabilidad del antígeno en la membrana a los 0, 3 y 6 meses post-sensibilización de la membrana en la técnica de dot-ELISA con una concentración de 20000 epimastigotes/dot.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la etapa crónica se basa principalmente en la detección de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* mediante el uso de pruebas inmunoserológicas que utilizan componentes antigénicos del parásito. Entre las pruebas serológicas se pueden incluir a la inmunofluorescencia indirecta que utiliza como antígeno la forma epimastigote del parásito fijado sobre un soporte, mientras que la hemaglutinación pasiva utiliza extractos antigénicos de epimastigote adheridos a los glóbulos rojos.

Las técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA utilizan antígenos purificados o recombinantes de las formas epimastigote o tripomastigote del parásito para la detección de anticuerpos de tipo IgM o IgG. Este tipo de técnicas es mejor aceptada en comparación con las pruebas anteriormente mencionadas debido a su simplicidad, mayor sensibilidad y eficiencia en la detección de anticuerpos. Sin embargo, la utilización de antígenos purificados o recombinantes hace difícil la estandarización de esta técnica en laboratorios que no cuentan con los recursos para poder obtener dichos antígenos.

En Sudamérica, dot-ELISA se ha sugerido como técnica adecuada para realizar el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas y realizar encuestas seroepidemiológicas debido a su sencillez y fácil procesamiento, sobre todo en zonas donde no se tiene acceso a laboratorios especializados. Debido a su gran versatilidad ya ha sido utilizada en la detección de infecciones por bacterias, virus y otros parásitos [47,50].

Respecto a la estandarización de la técnica dot-ELISA con epimastigotes formolados, la concentración óptima del antígeno depositado en cada tira de nitrocelulosa fue de 20 mil epimastigotes por dot, el título diagnóstico del suero fue 1/50 y la dilución del conjugado fue 1/3,000, con tiempos de incubación de 40 y 30 minutos respectivamente a temperatura ambiente. Con estos resultados se observó que la técnica se desarrolló fácilmente a temperatura ambiente, con tiempos de incubación cortos y cantidades óptimas tanto de suero como antígeno.

La obtención de antígenos somáticos de la forma epimastigote resultó ser más simple y rentable, pues se obtuvo una cantidad de 30 millones de parásitos por mililitro; lo

que nos indica que las formas epimastigotes se reproducen fácilmente en medios de cultivo, y su posterior fijación en una solución de formol le permite ser un antígeno alternativo para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas que ha sido utilizado en varios estudios de campo y en diferentes técnicas serológicas.

De Hubsch et al. (1988) utilizaron dos preparaciones antigénicas del *T. cruzi* en la técnica dot-ELISA, una preparación citoplasmática y otra en su forma epimastigote previamente fijados con formol para evaluar su aplicabilidad diagnóstica. La sensibilidad para los antígenos fue del 100% pero la especificidad del antígeno citoplasmático fue de 96% a diferencia del antígeno somático formolado que tuvo una especificidad del 100% para el segundo; mientras que la sensibilidad fue de 100% para ambas [17].

Sánchez et al. (2000) utilizaron como antígeno un extracto de epimastigotes formolados de cepas mexicanas para la técnica de ELISA, en la cual obtuvieron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96%, dándose una reacción cruzada con sueros de pacientes con Leishmaniasis. La prueba mostró un valor predictivo positivo del 90% y un valor predictivo negativo del 100% [57]

Berrizbeitia et al. (2004), compararon diferentes antígenos en inmunoensayos enzimáticos para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, correspondiente a los 3 estadios del parásito (tripomastigote, epimastigote y amastigote) los cuales se encontraban fijados en formol al 2%, a través de un panel de 435 sueros. Todos los ensayos consiguieron una sensibilidad del 100% pero una especificidad de 97.6% para amastigotes, 98.3% para epimastigotes y 99.3% para tripomastigotes; considerándose al antígeno epimastigote formolado como una buena opción de fuente antigénica para los inmunoensayos debido a su rápida obtención y bajo costo de producción [20]

Farfán-García et al.(2009) realizaron un estudio cuyo objetivo fue establecer una concordancia entre un ELISA casero y la Inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* empleando eluidos sanguíneos, utilizando como pruebas de referencia la técnica de IFI y ELISA con antígeno epimastigotes de *T. cruzi* fijados con formol al 2%. La mayor eficiencia de la prueba se obtuvo con un

punto el corte de 0,5 en donde la prueba mostró una sensibilidad de 97,2 % y una especificidad de 93,7 % [51].

Alvarez et al. (2014), estandarizaron la técnica de aglutinación directa como prueba alternativa para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, utilizando antígeno somático de la forma epimastigote fijado en solución de formaldehído al 2% a una concentración de 500×10^6 parásitos/mL coloreados con solución de citrato de sodio al 1 % más azul brillante de Comassie al 0,02 %. El colorante permitió visualizar las formas de aglutinación y así discriminar los sueros control positivo y sueros control negativo. El punto de corte para la dilución de suero fue de 1/50, mostrando índices diagnósticos de sensibilidad de 94,3 % y de especificidad de 96,3 %; encontrándose reacción cruzada en tres sueros de individuos con leishmaniasis visceral, con valores pronóstico positivo y negativo de 91,7 % y de 97,5 % respectivamente [52].

Cervantes et al. (2014), estandarizaron la técnica dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* utilizando como antígeno al parásito lisado a una concentración 5×10^6 células/mL. Se obtuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 89%, debido a la presencia de reactividad cruzada principalmente con *Leishmania spp.* A la par, esta técnica se comparó con las técnicas de ELISA y Western Blot obteniéndose un índice kappa de 0.79 lo cual corresponde a un buen grado de concordancia entre el resultado obtenido por el dot-ELISA y las pruebas anteriormente mencionadas [53].

Los resultados obtenidos indicaron que el uso de epimastigotes formolados como fuente de antígenos para la técnica de dot-ELISA permite la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 95%, demostrando la utilidad del antígeno en la técnica de dot-ELISA.

Una limitación de la prueba dot-ELISA con este tipo de antígeno es la ocurrencia de reacciones cruzadas, razón por la cual se observa una disminución en la especificidad de la técnica, sobre todo con sueros de pacientes que presentan leishmaniosis cutánea, debido a que 8 de las 20 muestras del grupo de pacientes con leishmaniasis (40%) tuvieron un resultado “reactivo” para la prueba. Este hecho ya fue descrito por otros autores en la literatura internacional, cuando se utiliza las formas epimastigote

del parásito, probablemente por la similitud en la morfología y en el perfil antigénico con las formas promastigote de los parásitos del género *Leishmania* [55].

La ocurrencia de resultados “reactivos” para dot-ELISA en sueros de pacientes con otras infecciones con resultado “no reactivo” para IFI y ELISA se produjo en un suero de paciente con toxocariasis y en un suero de paciente VIH positivo. Esta aparente reactividad podría deberse a que los sueros pertenecen a individuos provenientes de la ciudad Arequipa, considerada área endémica de la enfermedad de Chagas.

El rendimiento clínico se evaluó a través de los valores predictivos tanto positivo como negativo, cuyos valores fueron de 0.84 y 0.99 respectivamente. Este resultado nos indicó que un resultado “reactivo” tuvo un 84% de probabilidad de presentar la enfermedad y un resultado “no reactivo” tuvo un 99% de probabilidad de estar sano. El valor predictivo positivo no es el satisfactorio y esto se debe a la presencia de reacciones cruzadas con sueros de pacientes con leishmaniosis cutánea, motivo por el cual este valor se ve disminuido.

Los epimastigotes formolados son considerados una buena opción como antígenos para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas por su fácil y rápida obtención, en comparación con otros antígenos como los antígenos de excreción-secreción de epimastigotes del parásito utilizados en el diversos estudios como el de Escalante et al. (2014), donde la sensibilidad de la técnica Western Blot que utilizaron fue del 95,4% en la detección de una a ocho bandas específicas, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 93,7%. Si bien estos valores son altos, la obtención de los antígenos en mención es muy compleja y requiere equipos costosos [56].

Igualmente en el estudio realizado por Berrizbeitia et al. (2006) se utilizaron epimastigotes formolados de una mezcla de cepas en ensayos inmunoenzimáticos obteniéndose un valor predictivo positivo del 86.67% y un valor predictivo negativo del 95.46%. Estos valores fueron bajos debido a que las cepas no compartían antígenos inmunodominantes para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi*, a pesar que se obtuvo valores de sensibilidad del 100% y especificidad del 99.9% [20].

El impacto clínico de la técnica se evaluó con la razón de verosimilitud o *likelihood ratio* (LR), la cual describe la probabilidad de tener la enfermedad en oposición a no tenerla teniendo un resultado “reactivo”; y la probabilidad de no tener la enfermedad en oposición a tenerla teniendo un resultado “no reactivo”. Los valores obtenidos para el dot-ELISA fueron de 19.22 y 0.02 para la razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN) respectivamente, los cuales determinan que el dot-ELISA posee la calidad de excelente para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que los valores óptimos para la RVP deben ser mayores a 10 y la RVN debe tener valores menores a 0.1 para considerar un prueba en calidad de excelente. La ventaja de utilizar la razones de verosimilitud frente a los valores predictivos en una técnica de diagnóstico radica en que no dependen de la proporción de enfermos en la muestra, sino solo de la sensibilidad y especificidad de la técnica evaluada [54].

Adicionalmente se evaluó la estabilidad del antígeno en membranas sensibilizadas las que se almacenaron a -20°C y se protegieron de la luz, observándose que la membrana en estas condiciones se mantiene estable y funcional durante al menos 3 meses, ya que a los 6 meses posteriores a la sensibilización se observa una notoria disminución en la intensidad de la señal con control positivo. Estudios recientes han evaluado la estabilidad del antígeno en membranas sensibilizadas almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz, observándose que la membrana en estas condiciones se mantiene estable y funcional durante al menos 4 meses, lo que es una mejoría al uso de antígenos que tienen que ser congelados, permitiendo el uso de estas membranas en regiones que carecen de refrigeración [53].

Finalmente, la técnica dot-ELISA con epimastigotes formolados ha mostrado ser altamente sensible y accesible, debido a que no requiere equipo especializado como en el caso de ELISA, Western blot o IFI. La interpretación de resultados es sencilla y se puede utilizar un extracto total de epimastigotes del parásito como antígeno, que según lo reportado en este trabajo es de fácil obtención y presenta un buen tiempo de estabilidad del antígeno sobre la membrana de nitrocelulosa. Por todas estas ventajas, dot-ELISA es una buena técnica para un diagnóstico que podría utilizarse como un

primer cribado en zonas endémicas o para estudios de campo y posteriormente confirmarse empleando otras técnicas como IFI o Western Blot.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados fue estandarizada para ser ensayada a temperatura ambiente en muestras de suero diluidas 1/50, utilizando se anticuerpo anti IgG humano marcado con peroxidasa diluido 1/3000 y con tiempos de incubación de 40 y 30 minutos, respectivamente.
2. La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados tiene una sensibilidad y especificidad de 98% y 95%, respectivamente.
3. El valor predictivo positivo y negativo de la técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados fue de 84% y 99%, respectivamente.
4. La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados obtuvo una razón de verosimilitud positiva de 19.22 y una razón de verosimilitud negativa 0.02, considerando la prueba en calidad de excelente.
5. Los epimastigotes formolados adheridos a membranas de nitrocelulosa fueron estables durante al menos 4 meses de almacenamiento a -20°C.
6. La reactividad cruzada de la técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados fue de 12.66% (10/79), principalmente en sueros de pacientes con leishmaniasis.
7. La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados resulta ser una alternativa sencilla para el serodiagnóstico de tamizaje de la enfermedad de Chagas, sobre todo en zonas donde no hay acceso a equipos especializados ya que no los requiere.

5.2. Recomendaciones

1. La estabilidad de los epimastigotes formolados en membrana de nitrocelulosa debe ser evaluado a temperatura ambiente.
2. La técnica de dot-ELISA utilizando epimastigotes formolados debe ser evaluada en estudios de campo para conocer su eficiencia en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hotez et al. Control of Neglected Tropical Diseases. The New England Journal of Medicine. 2007; 357(10): 1018-1027.
2. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical disease: Third WHO report on neglected tropical diseases.2015. Chapter 4,The diseases; 75–81.
3. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases. 2001; (1):92–100.
4. Ministerio de Salud y Protección Social-Federación Médica Colombiana. Enfermedad de Chagas: Memorias. 2013. Módulo III, Diagnóstico; 12-14.
5. Brener Z, Gazzinelli R. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. International Archives of Allergy and Immunology. 1997; (114):103-10.
6. World Health Organization. Control of Chagas disease:Second report of the WHO Expert Committee. 2002. Chapter 2, Basic information on Chagas disease; 24-29.
7. Camargo M. et al. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 1966; 8(5): 227-235.
8. Voller A. et al. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. Journal of Clinical Pathology. 1978; 31(6):507-20.
9. Campos Y., Briceño L., Reina K., Figarella K, Pérez J., Mosca W. Serological diagnosis of Chagas disease: Evaluation and characterization of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009; 104(6):914-917.
10. Pappas et al. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. Veterinary Parasitology. 1988; 29:105–29.
11. Santos J.et al. A multianalyte dot-ELISA for simultaneous detection of malaria. Chagas disease and syphilis-specific IgG antibodies. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 2007; 58(2):223–30.

12. Montenegro S., De Almeida A., Carvalho L. Standardization of the Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) for experimental plague. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1993; 88(1): 119–123.
13. Roldán W., Espinoza Y., Huapaya P. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Perú determined by Dot-ELISA test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2009. 51(2):67–71.
14. Camargo M., Hoshino S., Siqueira G. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1973. 15(2): 81-85.
15. Umezawa E., Nascimento M., Stolf A. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2001. 39(3): 169-176.
16. Da Silveira J., Umezawa E., Luquetti A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitology*. 2001; 17(6): 286-291.
17. De Hubsch R., Chiechie N., Comach G. El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988; 83:277–85.
18. Carboneto C., Malchiodi E. y colaboradores. Empleo de epimastigotes formolados para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante técnicas inmunoenzimáticas. *Revista argentina de Microbiología*, 1989; 21: 79-83.
19. Berrizbeitia M. et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfusion Medicine*. 2006; 16, 419-431.

20. Berrizbeitia M. et al. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *Journal Clinical Microbiology*. 2004; 42(4):1766-1779.
21. Díaz L., González I. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*.2014; 46(2):177-188.
22. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*. 1973; 27:347-382.
23. García E., Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosomacruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*.1991; 7(9): 240-244.
24. Guhl F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. 2009; 20:228-234.
25. World Health Organization. Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee. 2002. Chapter 6, Epidemiology and incidence trends; 59-68.
26. Bern C., Martin D., Gilman R. Chagas Disease, Part A. *Advances in Parasitology*.2011. Chapter 2: Acute and congenital Chagas disease;75:19-47.
27. Rassi A., Marcondes J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease).*Infectious Disease Clinics of North America*. 2012; 26(2): 275–291.
28. Pereira J. Development of chronic human Chagas cardiopathy in the hinterland of the Paraíba State, Brazil, in a 4.5-year period. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*.1990; 23:141-147.
29. Rassi A., Dias J., Marin-Neto J. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *British Medical Journal: Heart*. 2009;95(7):524-534.
30. Carod-Artal F. Trypanosomiasis, cardiomyopathy and the risk of ischemic stroke. *Expert Reviews of Cardiovascular Therapy*.2010;8(5):717-728.
31. Buscaglia C., et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*.2006; 4:229-236.

32. Tanowitz H., et al. Studies of in Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*: I. Ultrastructural Studies on the Invasion of Macrophages and L-cells. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.1975; 24(1):25-33.
33. Andrade L., Andrews N. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention, Nature Reviews Microbiology. 2005. 3, 819-823. Almeida I., Camargo M., et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. The European Molecular Biology Organization Journal.2000;19(7):1476-1486.
34. Oliveira A., Peixoto J. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositol-phospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. Journal of Immunology.2004;173, 5688-5696.
35. Junqueira C., Caetano B., Bartholomeu D. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert Reviews in Molecular Medicine.2010; 12(29):1-10.
36. Miyazaki Y.; Hamano S., Wang S. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. The Journal of Immunology.2010;185:1150-1157.
37. De Souza W; De Carvalho T., Barrias E. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International Journal of Cell Biology.2010.
38. De Souza E.et al. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo models. Cell and Tissue Research. 2003; 314:223-235.
39. Gomes Y., Lorena V., Luquetti A. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009; 104(1):115-121.
40. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Trypanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). 2005. Capítulo 5: Técnicas de concentración. 37-40.
41. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, 2000; 2:344–378.

42. Russomando G et al. Treatment of congenital Chagas's disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 59:487–491.
43. Moncayo A, Luquetti A. Multicentric double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1990, 85:489–495.
44. Riera C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Sociedad Española de Química Clínica*. 2013, 16: 82-92.
45. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Chagas por Laboratorio. 2015, 1: 1-52.
46. Rassi A., Rassi Jr., Marin-Neto J. Chagas disease. *The Lancet*. 2010; 375: 1388-1402.
47. Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot enzyme-linked Immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101(1):7-14.
48. Vega S., Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). 2006; 26(2): 1-106.
49. Wiener Lab. Chagatest ELISA recombinante v.4.0. 2000; 1-12.
50. Biswas R, Parija SC, Narayan SK. Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004; 46: 249–52.
51. Farfán-García A., Castellanos-Domínguez Y. Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista de Salud Pública*. 2013, 15 (2): 208-219
52. Alvarez Y, Lares M. Viettri M. Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*. 2014; 34: 308-17.
53. Cervantes A., Martínez I. Estandarización de la técnica dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enfermedades Infecciosas & Microbiología. Clínica*. 2014; 32 (6):363–368.

54. Aznar-Orovai E., Mancheño-Alvaro A, García-Lozano T. Razón de verosimilitud y nomograma de Fagan: 2 instrumentos básicos para un uso racional de las pruebas del laboratorio clínico. *Revista de Calidad Asistencial*.2013, 28(6):390-393.
55. Berrizbeitia M., Aguilera G. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2010; 30: 55-60
56. Escalante H. et al. Estandarización de la técnica de Western Blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2014; 31 (4): 644-51.
57. Sánchez B. et al. Standardization of Mycro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of Medical Research*. 2001; 32 (1): 382-88.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1** Declaración de consentimiento de uso de material biológico para estudios de investigación.
Declaración de conflicto de intereses.
- Anexo 2** Protocolo de trabajo de IFI.
- Anexo 3** Protocolo de ELISA.
- Anexo 4** Protocolo de dot-ELISA.
- Anexo 5** Ficha de recolección de datos.
- Anexo 6** Análisis estadístico.

Anexo 1

Declaración de consentimiento de uso de material biológico para estudios de investigación

Yo, Irma Espinoza Blanco, identificada con DNI N° 08724910, docente investigadora del departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina, UNMSM, doy mi consentimiento a la srta. Inés de los Milagros Pastor Talledo, como alumna de la escuela de Tecnología Médica, identificada con código 12010538, para que pueda hacer uso de las muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Protozoología de la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM, en la realización de la tesis titulada “Utilidad de epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* en la técnica dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas”.

Lima, 20 de junio del 2016.

DNI: 08724910

Declaración de conflicto de intereses

Yo, Irma Espinoza Blanco, identificada con DNI N° 08724910, docente investigadora del departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina, UNMSM y asesora de la tesis “Utilidad de epimastigotes formolados de *Trypanosoma cruzi* en la técnica dot-ELISA para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas”, cuya autora es la srta. Bach.TM Inés de los Milagros Pastor Talledo, declaro bajo estos términos que no existe ningún conflicto de interés en la realización y publicación del presente estudio.

Lima, 02 de junio del 2017.

DNI: 08724910

Anexo 2

Protocolo de trabajo de IFI

1. Fijar las láminas con 25 uL de la suspensión del parásito y dejarlas secar.
2. Realizar la dilución 1/32 de cada suero y de los controles en PBS-BSA al 1%.
3. Dispensar 15 uL de suero diluido en cada círculo correspondiente en la lámina.
4. Colocar la lámina en cámara húmeda e incubar en estufa a 37°C por 30’
5. Lavar las láminas con PBS-Tween 80 al 1% durante 5 minutos por 3 veces seguidas y luego secarlas a temperatura ambiente.
6. Agregar 15 uL de conjugado anti-IgG humano marcado con isotiocianato de fluoresceína en cada círculo e incubar a 37°C por 30’.
7. Lavar las láminas por 3 veces seguidas con PBS-Tween 80 al 1% y realizar un cuarto lavado con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
8. Agregar 15 uL de solución diluida de Evans en cada pocillo y dejar durante 05 minutos a temperatura ambiente.
9. Enjuagar la lámina con agua destilada y secar a temperatura ambiente.
10. Colocar una gotita de glicerina tamponada y sobre ella una laminilla cubreobjetos.
11. Conservar la lámina en oscuridad hasta la lectura.

1	2	3	4	5	6	
S1	S2	S3	S4	S5	S6	
S7	S8	CN	B	CI	CP	
7	8	9	10	11	12	

S1-S8: Sueros problemas CP: Control + CN: Control -
B: Blanco CI: Suero control interno

INTERPRETACIÓN	RESULTADO
Cuando la superficie o los bordes de los parásitos fluorescen francamente de un color verde manzana	Reactivo
Si los parásitos se observan opacos entre rojizos y marrones oscuros	No Reactivo
Se observa una débil fluorescencia no homogénea en los parásitos	Indeterminado

Anexo 3

Protocolo de trabajo de ELISA

1. Preparación de la solución de lavado.
2. Agregar 100 uL de diluyente de muestras en cada pocillo donde se adicionará 20 uL de muestras, control positivo y control negativo donde corresponde.
3. Cubrir los pocillos e incubar durante 30 +/- 2 minutos a 37°C.
4. Lavar cada pocillo con 300 uL de Buffer de lavado (5 veces).
5. Preparación del conjugado (1x) y agregar 100 uL de conjugado diluido a cada pocillo.
6. Cubrir los pocillos e incubar durante 30 +/- 2 minutos a 37°C.
7. Lavar cada pocillo con 300 uL de Buffer de lavado (5 veces).
8. Agregar 100 uL de revelador a cada pocillo.
9. Incubar durante 30 +/- 2 minutos entre 18-25°C.
10. Agregar 100 uL de Stopper y leer en espectrofotómetro.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

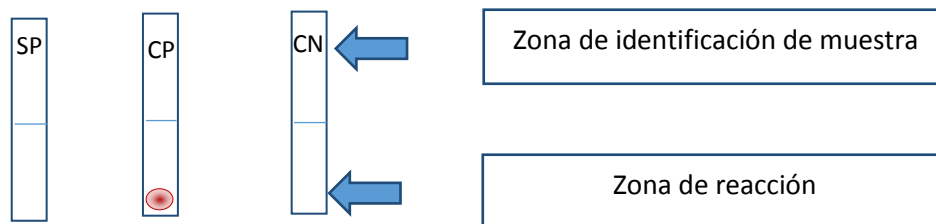
A: BLANCO B, C = CONTROL (+) D, E, F = CONTROL (-)

INTERPRETACIÓN		RESULTADO
Instrumental óptico	Interpretación visual	
Absorbancias mayores al Cut-off	Reactivo	POSITIVO
Absorbancias menores al Cut-off	No Reactivo	NEGATIVO

Anexo 4

dot-ELISA

1. Preparar el formato de las tiras de nitrocelulosa para la técnica de dot-ELISA
2. Depositar 2uL de antígeno formulado en cada tira y secar a 37°C por 30 minutos.
3. Sumergir las tiras en solución bloqueadora por 24 horas a 4°C y rebloquearlas a 48°C.
4. Lavar en PBS-Tween20 para luego ser secadas a 37°C por 30 minutos.
5. Depositar 300uL de suero diluido (1/50) en pocillos de placas de titulación donde se sumergirán las tiras de nitrocelulosa por 40 minutos a temperatura ambiente.
6. Realizar 3 lavados sucesivos con PBS-Tween20 al 0.3% por cada 5 minutos igualmente en pocillos de placas de titulación.
7. Adicionar anti-IgG humana conjugada con peroxidasa diluido 1/3000 por 30 minutos. Se procederá a un nuevo ciclo de 3 lavados.
8. Sumergirlas tiras de nitrocelulosa en una solución de substrato-cromógeno de peróxido de hidrógeno y DBA por 1 minuto en constante agitación hasta observar reacción en las tiras del control positivo.



SP: Suero problema **CP:** Control Positivo **CN:** Control Negativo

INTERPRETACIÓN	RESULTADO
Formación de una mancha marrón en la zona de reacción	REACTIVO
No se observa la formación de una mancha marrón en la zona de reacción	NO REACTIVO

ANEXO 5

Ficha de recolección de datos

Código de muestra	DIAGNOSTICO PRESUNTIVO	IFI RESULTADO	ELISA RESULTADO	dot-ELISA RESULTADO
01	Enfermedad de Chagas	Reactivo	Positivo	Reactivo
ABC	Enfermedad de Chagas	No reactivo	Negativo	No reactivo
361106	Leishmaniasis	Reactivo	No Reactivo	Reactivo

ANEXO 6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla de contingencia

	Prueba de referencia+	Prueba de referencia -	Total
Prueba +	Verdadero positivo (A)	Falso positivo (B)	A+B
Prueba -	Falso negativo (C)	Verdadero negativo (D)	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

Sensibilidad:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C}$$

Especificidad:

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{D + B}$$

Valor predictivo positivo:

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{A}{A + B}$$

Valor predictivo negativo:

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{D}{D + C}$$

Razón de verosimilitud positiva: Probabilidad de tener un resultado positivo en un paciente enfermo.

$$\text{Razón de verosimilitud positiva} = \frac{S}{1 - E}$$

Razón de verosimilitud negativa: Probabilidad de tener un resultado negativo en un paciente sano.

$$\text{Razón de verosimilitud negativa} = \frac{1 - S}{E}$$