

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
POST GRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**DESARROLLO Y EVALUACION DE UNA PRUEBA
INMUNOCROMATOGRÁFICA PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA INFECCION CON *Trypanosoma cruzi***

ALUMNA: MARÍA EUGENIA ACOSTA DE HETTER

TUTORA DE TESIS: DRA. MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ DE NESTOSA

CO-TUTORA DE TESIS: DRA. YVALENA DE GUILLÉN

Índice

Lista de figuras	vi
Lista de tablas	x
Lista de gráficos	xi
Lista de abreviaturas	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1-INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia.....	2
1.2 Epidemiología de la infección de Chagas	2
1.3 El parásito.....	5
1.3.1 Morfología y ciclo vital de <i>T.cruzi</i>	5
1.3.2. Variabilidad genética de <i>T.cruzi</i>	7
1.3.3 Mecanismo de transmisión.....	8
1.3.4 Aspectos clínicos.....	8
1.3.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	10
1.4 Diagnóstico serológico, generalidades	11
1.4.1. Serología	11
1.4.2 Pruebas de diagnóstico serológico convencionales y no convencionales	11
1.4.3 Utilidad del test inmunocromatográfico.....	18
1.5 Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica	20
1.6 Justificación.....	21
2-OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo General	24

2.2 Objetivos específicos.....	24
3-MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Diseño del estudio	26
3.2. Flujograma de trabajo diseñado	26
3.3 Primera Etapa: Diseño del prototipo	27
3.3.1. Selección de muestras:	27
3.3.1. Diseño y construcción del prototipo para una prueba de inmunocromatografía	27
3.3.2. Preparación del oro coloidal.....	28
3.3.3. Caracterización por microscopía electrónica.....	28
3.3.4. Caracterización del oro coloidal por espectrofotometría.....	28
3.3.5. Evaluación de la reactividad de la IgG anti humano de cabra contra la IgG humana por el método de inmunodifusión radial.....	29
3.3.6. Preparación de antígeno de <i>T.cruzi</i> cepa Epsilon (Y)	29
3.3.7. Determinación de las condiciones óptimas para la conjugación IgG de cabra anti-humano con oro coloidal.....	30
3.3.8 Conjugación del oro coloidal con IgG de cabra anti humano.	31
3.3.9. Montaje de la tira inmunocromatográfica	33
3.4. Segunda Etapa: Evaluación del prototipo.	37
3.4.1. Selección de muestras:	37
3.4.2. Comparación del prototipo desarrollado con el método de ELISA.....	38
3.5. Evaluación del prototipo desarrollado para la detección simultánea de infecciones múltiples.....	39
3.5.2. Determinación de las condiciones óptimas de la tira inmunocromatográfica para detección simultánea de dos patologías.....	40
3.6. Asuntos estadísticos y éticos	42

4-RESULTADOS	44
4.1. Primea Etapa	45
4.1.1. Análisis del preparado del oro coloidal.....	45
4.1.2 Caracterización de las partículas de oro coloidal	46
4.1.3. Evaluación de la reactividad de la IgG anti humano de cabra contra la IgG humana por el método de Inmunodifusión radial	47
4.1.4. Preparación de antígeno extracto soluble de T.cruzi cepa Epsilon (Y).....	48
4.1.5. Condiciones óptimas para la preparación del conjugado IgG humana - oro coloidal.....	49
4.1.6. Preparación del conjugado de IgG anti-humano de cabra con oro coloidal.....	51
4.1.6.1.3 Prueba de reactividad del conjugado con suero humano.....	53
4.1.7. Montaje de la tira.....	54
4.1.9. Flujograma de reacción del prototipo diseñado.....	61
4.2. Segunda Etapa.....	62
4.2.1. Comparación del prototipo desarrollado con el método de ELISA.....	62
4.2.2. Reacción cruzada con otras patologías.....	63
4.2.3. Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial.....	64
4.2.4. Determinación de la estabilidad de las tiras inmunocromatográficas por degradación térmica.....	66
4.2.5. Evaluación del potencial diagnóstico del prototipo desarrollado para la detección simultánea de infecciones múltiples.....	67
4.2.6. Determinación de las condiciones óptimas de la tira inmunocromatográfica para detección simultánea dos patologías.	68

5-DISCUSSION	72
5.1. Diseño de una prueba inmunocromatográfica para el diagnóstico del la enfermedad de Chagas	73
5.2. Construcción del prototipo de prueba inmunocromatográfica	74
5.2.1. Preparación y caracterización del oro coloidal.....	74
5.2.2. Conjugación del Anticuerpo con el oro coloidal	75
5.2.3. Utilización del antígeno crudo extracto soluble.	76
5.2.4. Montaje de las tiras inmunocromatográficas.....	76
5.3. Determinación del flujograma de reacción	77
5.4. Evaluación del prototipo desarrollado.....	78
5.5. Efectividad del prototipo desarrollado para la detección de infecciones múltiples	80
5.6. Perspectivas	81
6-CONCLUSIONES	83
7-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85

Lista de figuras

Figura 1. Formas del <i>T.cruzi</i> (Wheeler R, 2006).....	6
Figura 2 Esquema general de los principales componentes de una tira inmunocromatográfica para la detección de antígeno o anticuerpo en la muestra estudiada.	15
Figura 3 Esquema general de la clasificación test inmunocromatográficos según tipo de migración: A) Vertical, la tira es sumergida en la muestra para la reacción. B) Horizontal, la muestra es adicionada directamente a la almohadilla de muestra por medio de una pipeta.....	16
Figura 4 Clasificación de los test inmunocromatográficos según el tipo de reacción A) No competitivo: el antígeno o anticuerpo a ser detectado es capturado en la zona del test B) Competitivo: el metabolito detectado en la muestra es capturado por el conjugado, no en la zona de captura.	17
Figura 5. Test rápido para pacientes con HIV/SIDA. Se observa la detección simultánea de tres enfermedades como TB, HCV y HIV. Este esquema está diseñado para el tamizaje en la población especialmente en zonas rurales (Corstjens et al 2007)	18
Figura 6 Etapas para el desarrollo y evaluación del prototipo	26
Figura 7 Esquema del prototipo no competitivo y de migración vertical diseñado en el laboratorio.....	27
Figura 8 Prueba de reactividad del conjugado. En la reacción con los sueros positivos se observa un punto rojo en el centro de la membrana y con los sueros negativos no se observa color.....	33

Figura 9 Dimensiones de la tira inmunocromatográfica. Se observan el largo y el ancho de la inmunocromatográfica, así como la distancia entre la zona control y la zona de captura.	34
Figura 10 Esquema de las estrategias de reacción. A) incubación de la tira inmunocromatográfica con el suero y conjugado al mismo tiempo e igual volúmenes. B) Incubación de la tira inmunocromatográfica primeramente con el suero, seguido de secado y por último incubación con el conjugado.....	36
Figura 11 Esquema de interpretación de las tiras de detección simultanea con sueros positivos y negativos para la enfermedad de Chagas y toxoplasmosis.	42
Figura 12 Reducción de oro coloidal por el ácido cloro áurico. En la figura se observan los cambios de color durante la reducción, de amarillo claro, negro a rojo vino.	45
Figura 13 Nanopartículas de oro coloidal captadas por el microscopio electrónico de transmisión TEM (JEOL 1011-Japón) teniendo en cuenta una magnitud de 85000 x y un voltaje de 80KV. En la Foto A se observan las partículas del oro coloidal comercial y en la Foto B las partículas del oro coloidal preparado en el laboratorio.	46
Figura 14. Prueba de reactividad de la IgG anti humano de cabra. Reacción inmunológica de la IgG humana con la IgG anti-humano de cabra realizando diluciones hasta 1/32.....	48
Figura 15 Lisado de los epimastigotes de <i>T.cruzi</i> cepa Y para la obtención del extracto soluble por el método del sonicado y determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.....	49
Figura 16 Reactividad del conjugado con la IgG humana purificada. Como control (+) de la reacción se utilizó el conjugado comercial Proteína A-oro coloidal. Control (-) utilizado fue PBS	53

Figura 17 Reactividad del conjugado dilución 1/20 con la IgG anti-T cruzi en suero humano. La señal de la reacción disminuye a medida que aumenta la dilución del suero. No se observó señal con el suero negativo lo que significa que solo se unió a la IgG que reconoció al antígeno pegado a la membrana.....	54
Figura 18 Esquema del prototipo desarrollado, con las características de una tira inmunocromatográfica no competitiva y de migración vertical	55
Figura 19 Prueba de la movilidad del prototipo desarrollado con el conjugado. 1) migración con el conjugado preparado en el laboratorio y 2) la migración con un conjugado comercial.....	56
Figura 20 Reacción en un pas. Las tiras se incubaron con diferentes diluciones de suero positivo (+) y conjugado dilución 1/20.	57
Figura 21 En la zona del test(T) se sembró antígeno soluble de T.cruzi y en la zona del control (C) IgG humana. En A se observa la incubación con los sueros positivo (+) y negativo (-), en B la incubación con el conjugado y visualización de la zona control, en C se observa la reacción final en la que además de la señal en la zona control aparece una débil señal en la zona de captura.	58
Figura 22 Determinación de las condiciones óptimas. a) Determinación de la dilución óptima del suero b) Determinación de la concentración óptima del antígeno.....	60
Figura 23 Estrategia de reacción del test inmunocromatográfico determinado después de varias pruebas del volumen de muestra y conjugado, determinación del tiempo de reacción y secado de la membrana.	61
Figura 24 Comparando con el método de ELISA, debajo de cada tira se observan las densidades ópticas (DO) obtenidas por el método de ELISA. Línea Control (C) y Línea de captura (T).....	62

Figura 25 Determinación de la estabilidad de las tiras inmunocromatográficas por el método de degradación térmica. Reactividad de tiras del mismo lote almacenadas a 4° C y a 37°C de 10 y 31 días con sueros positivo (+) y negativo (-) para Chagas. Línea Control (C) y Línea de captura (T).....	67
Figura 26 Diseño del prototipo para la detección simultánea de dos patologías. Se sembró antígeno crudo (extracto soluble) de ambos parásitos.....	68
Figura 27 Determinación de la concentración óptima del antígeno de <i>T.gondii</i> con la dilución 1/8 no presenta reacción en la zona de captura con el suero negativo. Línea Control (C) y Línea de captura (T).....	69
Figura 28 Evaluación de la reactividad de la dilución 1/8 del antígeno de <i>T.gondii</i> en la membrana inmunocromatográfica. Se observa un aumento de la señal en la zona de captura con los sueros controles negativo (N), positivos (PI, PII, PIII) y una muy buena intensidad con los sueros de pacientes (1,2,3). Línea Control (C) y Línea de captura (T)	70
Figura 29 Evaluación del potencial diagnóstico del prototipo con sueros positivos (+) y negativos (-) para Toxoplasmosis y Chagas. Línea Control (C) y Línea de captura para toxoplasmosis (Tx) y Chagas (CH)	71

Lista de tablas

Tabla 1 Características del oro coloidal preparado y comercial.....	47
Tabla 2 En la tabla se observan los valores de sensibilidad y especificidad del prototipo desarrollado, además del índice kappa que indica la concordancia con respecto al método de ELISA.....	63
Tabla 3 Resultado del prototipo desarrollado para <i>Trypanosoma cruzi</i> en sueros de individuos con otras patologías parasitarias y no parasitarias.....	64
Tabla 4 Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial.....	65
Tabla 5 Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial.....	65

Lista de gráficos

- Gráfico 1** Determinación de la concentración óptima del anticuerpo determinada mediante el test de floculación utilizando NaCl al 10% como agente desestabilizante. La cantidad mínima protectora fue a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se utilizó una concentración de anticuerpo 50% mayor para la conjugación. 50
- Gráfico 2** Determinación del pH óptimo del oro coloidal mediante el test de floculación utilizando concentración constante del anticuerpo IgG de cabra anti-humano y NaCl al 10% como agente desestabilizante. Se observó que a pH alcalino estabiliza la reacción manteniéndose estable la unión del oro con el anticuerpo. 51
- Gráfico 3** Desplazamiento del pico máximo de absorbancia en el conjugado. La curva (a) corresponde al oro coloidal, la curva (b) al conjugado IgG de cabra anti humano-oro coloidal y la curva (c) a la mezcla del anticuerpo y el oro coloidal. 52

Lista de abreviaturas

IICS: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

UNA: Universidad Nacional de Asunción

ELISA: ensayo inmunoenzimático

IFI: inmunofluorescencia indirecta

HAI: hemaglutinación indirecta

T.cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T.gondii: *Toxoplasma gondii*

Y: cepa Epsilon

Ag: Antígeno

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

HIV: Virus de Inmunodeficiencia Humana

TB: *Mycobacterium tuberculosis*

VHC: virus de la hepatitis C

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

NC: tira de nitrocelulosa

RESUMEN

Existen numerosos test inmunocromatográficos A nivel comercial utilizados para el tamizaje para la enfermedad de Chagas, sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estos test varían según la región en la que se utilizan, esta observación plantea la necesidad de desarrollar un test inmunocromatográfico adaptado a las características de cada región. El presente estudio fue diseñado con el objetivo principal de desarrollar un prototipo de prueba inmunocromatográfica para la detección cualitativa de IgG anti *T. cruzi* en suero humano. Este estudio experimental se realizó en dos etapas, en la primera etapa se desarrollaron las tiras inmunocromatográficas utilizando como antígeno el extracto soluble de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Epsilon y en la segunda se evaluó la reactividad de las tiras inmunocromatográficas en relación a otras técnicas convencionales (ELISA) y no convencionales (test rápido comercial) utilizando sueros positivos y negativos para la enfermedad de Chagas provenientes de zonas endémicas. En relación a los resultados obtenidos, se determinó las condiciones óptimas para el montaje y funcionamiento de la tira inmunocromatográfica. A continuación se analizaron 202 sueros (positivos y negativos) y se observó una sensibilidad y especificidad del 97% y 95% respectivamente, así como un índice Kappa de 0,92 en relación al método de ELISA. Así mismo se constató que la sensibilidad y especificidad de nuestra prueba son comparables a otras tiras inmunocromatográficas existentes en el mercado. Por otra parte se evaluó el potencial diagnóstico del prototipo desarrollado para la detección simultánea de infecciones múltiples.

Es necesario seguir optimizando la fase de desarrollo a fin de obtener un test inmunocromatográfico de manufactura propia y a menor costo que se adecue a las necesidades específicas del país.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, test de diagnóstico rápido, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

At commercial level, there are numerous immunochromatographic tests of disease for Chagas used for screening. However, the sensitivity and specificity of these tests changes according to the region in which they are used, this observation confirms the need to develop an immunochromatographic test adapted to the characteristics of each region. This study was designed with the primary goal of developing a prototype of immunochromatographic test for qualitative detection of IgG anti *T. cruzi* in human serum. This experimental study was conducted in two stages, the first stage is the development of immunochromatographic strips using total antigen (soluble extract) of epimastigotes of *T. cruzi* from Epsilon strain. In the second stage immunochromatographic strips was evaluated in relation to other techniques (ELISA and a commercial rapid test) using positive and negative sera from Chagas endemic. Regarding to results obtained, we determined the optimal conditions for constructions an function of our immunochromatographic strips. We analyze 202 sera (positive and negative) and observed of our a sensitivity and specificity of 97% and 95% respectively, Kappa index of 0.92. We observed that the sensitivity and specificity of our strip is comparable to the other tests immunochromatographic those prevailing in the market. On the other hand, we evaluate the diagnostic potencial of our prototype to simultaneously detect multiple infections.

Further optimization of the developnest stage testing is necessary to obtain a cheaper immunochromatographic test own manufacturing and that suits the specific needs of the country.

Keywords: Chagas disease, rapid diagnostic tests, *Trypanosoma cruzi*

1-INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

En 1909 el científico brasileño Carlos Chagas encontró enfermos que padecían una sintomatología con características únicas, Chagas acababa de descubrir una nueva enfermedad que más tarde llevaría su nombre (1). Tiempo después, descubrió que el agente causal es el *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*); estudió su ciclo evolutivo y descubrió el papel que desempeña la vinchuca como agente vector. Chagas realizó un triple descubrimiento: una enfermedad, su agente causal y su transmisor. Más tarde, en la Argentina, el médico Salvador Mazza estudió la dolencia en un gran número de pacientes. Sus observaciones fueron de tanta trascendencia que a esta enfermedad se la denomina también Chagas-Mazza (1).

El mal de Chagas-Mazza es una de las principales enfermedades parasitarias del mundo y afecta a toda América. La enfermedad no tratada a tiempo ataca a los órganos vitales del cuerpo infectado y provoca lesiones invalidantes y un lento deterioro que conduce a la muerte (1).

1.2 Epidemiología de la infección de Chagas

La enfermedad de Chagas es la patología parasitaria de mayor importancia en América Latina, tanto por su morbimortalidad como por su importancia económica. Se ubica como la tercera enfermedad infecciosa de importancia en la región después del SIDA y la tuberculosis (2-4).

Actualmente, la enfermedad de Chagas afecta de nueve a dieciséis millones de personas y se estima en cuarenta millones el número de personas bajo riesgo de contraer la infección (4-7).

La transmisión a los humanos por vectores se produce principalmente en las zonas endémicas de México, América Central (Belice, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Panamá), y América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Surinam, Guyana Francesa, Paraguay, Perú, Venezuela) (8).

Los triatomíneos funcionan como vectores de esta enfermedad; sin embargo, en algunas zonas endémicas se han aplicado planes para reducir el contagio por esta vía de transmisión. Uruguay, Chile, y partes de Brasil han sido certificados como libres de transmisión vectorial. A pesar de estos éxitos, la enfermedad de Chagas aún constituye un grave problema de salud en 17 países de América Latina, donde un 20% de la población vive en áreas endémicas (8).

La enfermedad crónica de Chagas es un problema en muchos países de América Latina, a pesar de la aplicación de medidas preventivas e higiénicas. El creciente aumento del flujo migratorio ha incrementado significativamente la posibilidad de transmisión por transfusión sanguínea. La enfermedad crónica se manifiesta de forma evidente en aproximadamente el 20-30% de los individuos infectados. Estas estimaciones varían ampliamente dependiendo de la región geográfica, y la virulencia de la cepa de *T. cruzi*. En muchos países desarrollados el riesgo de transmisión a nivel transfusional se ha convertido en un problema de salud pública importante en muchos países, se calcula que en Estados Unidos y España viven aproximadamente 500 000 personas infectadas (8,9).

En Brasil se considera a la enfermedad de Chagas como un problema prioritario, siendo las zonas del centro, sur, este y noroeste del país las más afectadas. En ciertas zonas los pacientes presentan daño cardíaco severo o muerte súbita en

jóvenes (llamada muerte del leñador). En los estados de Minas Gerais, Sao Paulo y Goias suele observarse, con una frecuencia significativa, megacolon y megaesófago (10).

En Argentina se han realizado estudios sobre la incidencia de la infección y se han detectado 2.5 millones de personas infectadas y 10 millones de personas expuestas (10-11). En Chile y Perú, el número de infectados rebasa a los 350 mil y 80 mil, respectivamente. En Venezuela se estima que 4 millones de personas están expuestas a la infección (10). En Bolivia la enfermedad de Chagas afecta principalmente a Chuquisaca (78,1%), Tarija (60,5%) y Cochabamba (46%) y Santa Cruz tomando en cuenta que el área endémica está entre 300-3000 metros sobre el nivel del mar (8).

En Paraguay se ha logrado interrumpir la transmisión vectorial por *Triatoma infestans* en la Región Oriental, que es la más poblada del país. Aunque se han encontrado especies nativas sin participación demostrada en la transmisión domiciliaria actualmente se está notificando colonización intradomiciliaria por *T. sordida* en algunas localidades. Las dificultades operativas para erradicar la transmisión por *Triatoma infesta* en la región Occidental (Chaco) se han debido por la extensión del territorio, el difícil acceso y problemas relacionados con hábitos culturales propios de la población indígena (11).

En nuestro país la enfermedad de Chagas se diagnostica en forma sistemática durante el control prenatal sólo en zonas endémicas de los departamentos de Cordillera y Paraguari. Se estima que se ha evaluado serológicamente al 70% de las mujeres en edad fértil entre 12 y 49 años de ambos departamentos lo cual corresponde a 12.346 seropositivas según datos basados en el censo de 2002 (12). Además, se ha diseñado al mismo tiempo una estrategia para áreas rurales

endémicas de diagnóstico, tratamiento, y seguimiento control pos tratamiento de niños infectados congénitamente con *T. cruzi*. Este sistema ha permitido analizar pasivamente 6.937 infantes de madres seropositivas desde 1998 hasta la fecha y 354 niños infectados congénitamente han sido tratados con la droga benznidazole (12).

1.3 El parásito

1.3.1 Morfología y ciclo vital del *T.cruzi*

T.cruzi es un flagelado que se caracteriza por la presencia de un flagelo y una única mitocondria en el que está situado el cinetoplasto, unidad especializada que contiene ADN. Pertenece a la familia *Trypanosomatidae* y al subgénero *Schizotrypanum*. El ciclo de vida de *T. cruzi* es relativamente complejo, con diferentes formas evolutivas del parásito (Figura 1), tanto en el insecto vector (redúvidos) como en mamíferos (incluidos los seres humanos y muchas otras especies). En todos los casos parecen estar bien adaptados a sus respectivos entornos, lo que maximiza el potencial de transmisión y de la evasión inmune, por tanto, la supervivencia del parásito a largo plazo (8).

El *T. cruzi* tiene dos ciclos biológicos y distintas etapas morfológicas en los mamíferos. Los tripomastigotes circulan en sangre, donde no se dividen, pero se pueden introducir en diversos tipos de células del huésped. Una vez dentro de una célula huésped, los tripomastigotes de *T.cruzi* se localizan en el citoplasma y se transforman en una forma más redondeada sin flagelo conocida como amastigote. Los amastigotes son la forma de división de *T.cruzi* en los mamíferos. Después de varias divisiones, dentro del citoplasma de las células huésped, los amastigotes se convierten de nuevo en tripomastigotes y salen de la

célula huésped (4-5 días). Estos tripomastigotes liberados, pueden infectar a otras células a nivel local o entrar a la circulación sanguínea e invadir las células de otros tejidos o ser transmitidos a los insectos durante el curso de su alimentación. En el insecto, estos tripomastigotes se convierten rápidamente en epimastigotes que permanecen en el intestino del insecto. En última instancia, después de semanas de replicación en el intestino, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, una etapa similar a la forma tripomastigotes de sangre, y son capaces de iniciar la infección en mamíferos (8,13).

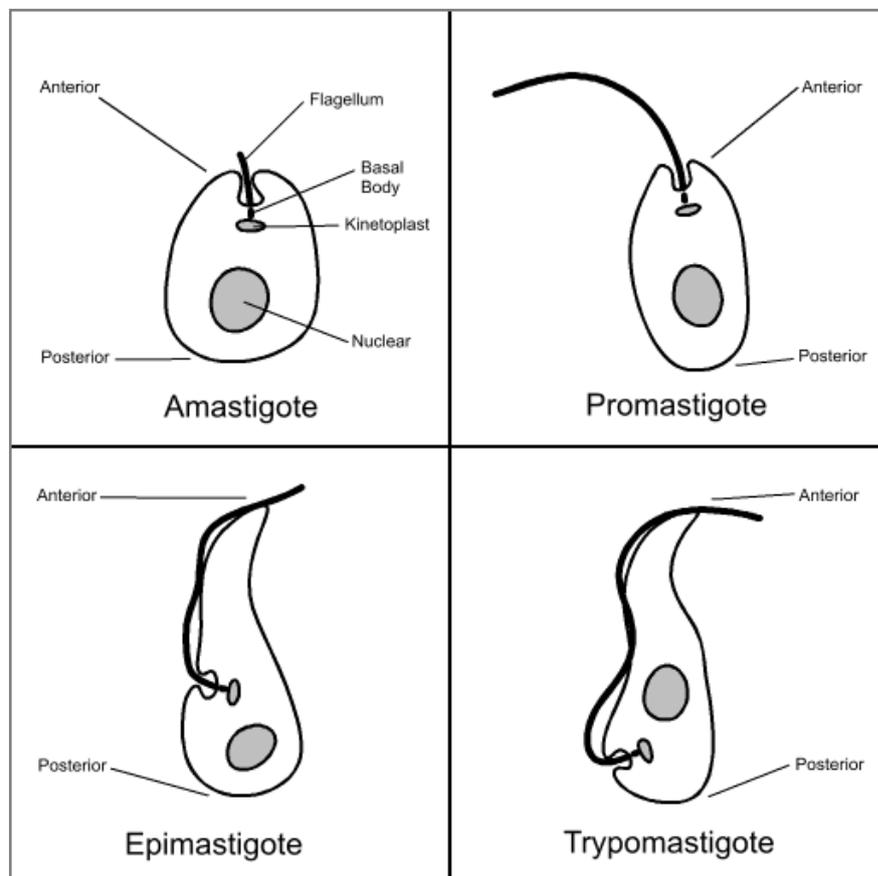


Figura 1. Formas del *T.cruzi* (Wheeler R, 2006)

1.3.2. Variabilidad genética de *T. cruzi*

La población de *T. cruzi* no es homogénea y está compuesta más bien por un grupo de cepas que circulan tanto en el ciclo doméstico como selvático. Dichos ciclos involucran a seres humanos, vectores y reservorios animales del parásito. El aislamiento y estudio de poblaciones de *T. cruzi* de diferentes orígenes confirmó la presencia de una amplia gama de cepas con distintas características. Esta variación intraespecífica ha sido ampliamente caracterizada a nivel biológico, teniendo en cuenta la morfología de las formas, las curvas de parasitemia, la virulencia, la patogenicidad y la sensibilidad a las drogas. La composición antigénica de la población ha sido estudiada por análisis de los componentes de la membrana celular y la distribución de las bandas en electroforesis (SDS-PAGE), así como mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (14).

Las isoenzimas (diferentes formas moleculares de una misma enzima detectada por electroforesis) están siendo ampliamente utilizadas para clasificar a diferentes zimodemos de *T. cruzi* (14).

Los trabajos de epidemiología molecular han permitido desarrollar nuevos sistemas para agrupar cepas, en base a características comunes de genotipos multilocus, en unidades discretas de tipificación (UTD). Este método ha demostrado en forma consistente que existen seis UDTs diferentes: TcI, TcIIa, TcIIc, TcIIId y TcIIe, cada uno con aspectos epidemiológicos y evolutivos diferentes (15).

En Paraguay se han llevado a cabo estudios sobre los genotipos circulantes en marsupiales y triatomíneos silvestres, destacándose el genotipo TcI en la transmisión (16). En cuanto a los genotipos circulantes en humanos y ejemplares de *T. infestans* de regiones endémicas, se ha encontrado el sub-linaje TcIIId en ambas poblaciones (17).

1.3.3 Mecanismo de transmisión

El mecanismo de transmisión vectorial se produce por contacto de las heces infectadas del Triatomíneo en la piel abierta o mucosas. Generalmente esto ocurre en forma mecánica al rascarse después de la picadura del insecto. El período de incubación es de 4 a 15 días. La transmisión no vectorial implica otras formas de infección como transfusión sanguínea, transmisión transplacentaria, trasplante de órganos, etc (8,13).

1.3.4 Aspectos clínicos

Las formas clínicas más conocidas de la enfermedad de Chagas o trypanosomiasis americana son la forma aguda, crónica, portador y congénita.

La fase aguda se hace evidente después de las primeras semanas de la infección con el parásito y se caracteriza por la aparición de un cuadro febril y la presencia o no del chagoma de inoculación como nódulo o úlcera, generalmente en cara o miembros superiores. Ocasionalmente se observan el signo de Romana, que consiste en edema bpalpebral unilateral y ganglio preauricular aumentado en volumen, síntomas cardíacos, alteraciones electrocardiográficas e insuficiencia cardíaca secundaria. Menos frecuentes son las manifestaciones en otros órganos. En esta fase son abundantes los trypomastigotes en sangre y los amastigotes en tejido (18).

La fase crónica se evidencia después de meses o años de ocurrido el ingreso del parásito, las manifestaciones más frecuentes son de naturaleza cardíaca (insuficiencia cardíaca), nerviosa y digestiva (megaesófago, megacolon). En esta fase son escasos los trypomastigotes en sangre y amastigotes en tejidos (18).

La forma indeterminada o de portador se trata de personas, aparentemente sanas, en las que la inoculación del parásito y los síntomas de las formas agudas o crónicas no son manifestadas por el portador del parásito. La situación del portador se evidencia, generalmente, cuando la persona desea donar sangre y el tamizaje demuestra serología positiva para *T. cruzi*. Un portador puede ser asintomático toda la vida o presentar manifestaciones clínicas aún después de muchos años de haberse infectado. En esta forma, son muy escasos los trypomastigotes en sangre y amastigotes en tejidos (18).

La reactivación durante la etapa crónica de la enfermedad resulta infrecuente, pero puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos. En sujetos con enfermedad producida por el virus de la inmunodeficiencia humana VIH/SIDA avanzada puede presentarse como una meningoencefalitis difusa o como una lesión de la masa cerebral ocupante, que resulta indistinguible, clínicamente o a través de las neuroimágenes de otros procesos infecciosos o neoplásicos que pueden comprometer el sistema nervioso central (SNC) de estos pacientes (19,20).

La forma congénita corresponde a niños que nacen infectados por pasaje del parásito a través de la placenta materna. Se trata de niños prematuros que presentan generalmente hepatoesplenomegalia con gran cantidad de trypomastigotes en sangre y amastigotes en tejidos (18).

1.3.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas se realiza generalmente a través de diferentes métodos comerciales que incorporan proteínas recombinantes, al parásito entero o incluso mezclas de complejos antigénicos citoplasmáticos. Debido a la ausencia de una estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad es preciso realizar más de un método de diagnóstico de principios diferentes. Todos los países que están afectados por la trypanosomiasis americana necesitan efectuar tamizajes serológicos poblacionales con el objeto de seleccionar donantes seronegativos e identificar embarazadas y niños menores de 15 para tratamiento médico. Sin embargo estos métodos no siempre ofrecen las facilidades técnicas ni de infraestructura como para aplicarlas en el campo (21)

Esto ha puesto en evidencia la necesidad de cambio en la estrategia de diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*, lo cual puede llevar a cabo mediante la implementación de pruebas de diagnóstico rápido (Inmunocromatografía), asegurando un diagnóstico efectivo y simple en el campo. Los resultados obtenidos en estudios previos demostraron que la Inmunocromatografía resulta ideal como método de tamizaje para la vigilancia y los programas de intervención de la enfermedad de Chagas (7,9, 21,22).

Por la razones arribas expuestas, queda demostrada la necesidad de desarrollar métodos que de alta sensibilidad realizando un primer tamizaje serológico en los puestos de salud, disminuyendo así la perdida de pacientes por falta de diagnóstico.

1.4 Diagnóstico serológico, generalidades

Es esencial comprender conceptos básicos sobre métodos serológicos como antecedente al desarrollo de la técnica objeto del presente trabajo, tanto los fundamentos como ventajas y desventajas de estos métodos se describen a continuación.

1.4.1. Serología

La serología es una disciplina basada en la detección de anticuerpos específicos contra un determinado microorganismo. Los anticuerpos pueden ser detectados y cuantificados de muchas maneras. No todos los métodos detectan los mismos tipos de anticuerpos, ni con la misma sensibilidad, de modo que a veces es necesario aplicar más de un método para cubrir el conjunto de posibilidades. Una prueba serológica ideal sería la que fuera rápida, barata, y fácil de realizar en una sola fase, no requiriera equipamiento especial ni refrigeración de los reactivos y tuviera una elevada sensibilidad y especificidad. Para que las probabilidades de éxito en el diagnóstico serológico se acerquen a la certeza es imprescindible seleccionar adecuadamente el método a emplear, el momento de la toma de muestra y, asimismo, interpretar adecuadamente los resultados (21).

1.4.2 Pruebas de diagnóstico serológico convencionales y no convencionales

Las pruebas de diagnóstico serológico en general se clasifican en pruebas convencionales y no convencionales. Entre las convencionales se encuentran la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Esta última cuenta con muchas ventajas

operativas de automatización y de registro e interpretación de los resultados, además de ofrecer una alta sensibilidad y especificidad (21).

Las pruebas no convencionales son conocidas también como "pruebas rápidas" de muy fácil ejecución e interpretación, presenta la ventaja de poder realizarse en el campo debido a que no requieren equipamiento especial. La más conocida y evaluada es la Inmunocromatografía, que se caracteriza por su bajo costo y fácil ejecución, por lo que está especialmente indicada como prueba de tamizaje, siempre y cuando presente valores de especificidad y sensibilidad aceptables (21,23).

Los sistemas inmunocromatográficos son sistemas rápidos, basados en la captura inmunológica de un coloide coloreado durante su paso a través de una membrana sobre la cual ha sido inmovilizado un anticuerpo (o un antígeno). Las principales características de estos sistemas son (23):

- **Rápido:** basta añadir la muestra al sistema y esperar entre 5 y 20 minutos.
- **Sencillo:** no requiere ningún instrumental de laboratorio complicado.
- **Fácil de interpretar:** aparece una línea indicando si el sistema es positivo o no.
- **Fiable:** lleva incorporada una línea de control cuya aparición verifica el correcto funcionamiento del ensayo
- **De fácil ejecución:** puede ser realizado por personal no especializado.

La Inmunocromatografía es una técnica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación de oro coloidal o látex en zonas

específicas de la membrana de nitrocelulosa donde previamente se han fijado anticuerpos o antígenos de captura (24).

Teniendo en cuenta las potencialidades del uso de oro coloidal para marcaje de proteínas, este ha tenido un gran desarrollo en los últimos años. Las partículas se pueden fabricar en diferentes tamaños, desde 2-3 nm hasta 150 nm y se adsorben a todo tipo de proteínas formando complejos muy estables que permitan que conserven sus propiedades y su actividad biológica (25-26).

Los componentes principales de una tira inmunocromatográfica se muestra en el esquema de la Figura 2. Cada determinación está compuesta por una tira de nitrocelulosa (NC), con una porosidad que permite el flujo lateral de sustancias, la cual se encuentra adherida a una superficie de plástico que le confiere rigidez, la tira puede estar contenida o no dentro de un casete de plástico. La NC puede ser sensibilizada en una primera línea (zona de captura) con anticuerpo, en el caso de que se pretenda detectar un antígeno en la muestra o con un antígeno, si se pretende detectar anticuerpos. La segunda línea (zona de control) se sensibiliza con un reactivo de control capaz de unir al exceso de conjugado de oro coloidal. La membrana de NC se pone en contacto por el extremo más cercano a la línea de captura con la almohadilla de muestra o una membrana capturadora de eritrocitos si se utiliza como muestra sangre total. A continuación se encuentra una membrana de fibra de vidrio donde se deposita el conjugado de oro coloidal, que puede estar compuesto por anticuerpos-oro coloidal para la detección de antígenos o conjugado de antígeno-oro coloidal si es para la detección de anticuerpos. En el extremo superior de la NC se localiza un material absorbente o mecha, que facilita la migración de la muestra (27).

Cuando se adiciona una muestra de sangre o suero en la almohadilla de muestra, esta se pone en contacto con la membrana. En el caso de utilizar sangre total, los eritrocitos son capturados por un filtro y la parte líquida de la sangre continúa su migración produciendo la solubilización del conjugado. Si la muestra de sangre tiene anticuerpos o antígenos, según sea el caso, estos reaccionan con las inmunoglobulinas conjugadas con las partículas de oro formando inmunocomplejos que migran a través de la NC originándose así la fase móvil del sistema. En presencia del analito en la muestra de sangre, el reactivo fijado en la zona de captura reacciona con el conjugado unido al analito, formando una línea coloreada. Al mismo tiempo el exceso de conjugado, no atrapado en la zona de captura, continúa migrando y es atrapado por un reactivo fijado en la zona control capaz de reaccionar con el conjugado de oro coloidal, formándose una segunda línea horizontal coloreada como demostración de que los reactivos han funcionado correctamente. La línea de control se forma tanto con las muestras positivas, como con las muestras negativas. El ensayo no se considera válido si esta línea no aparece (27).

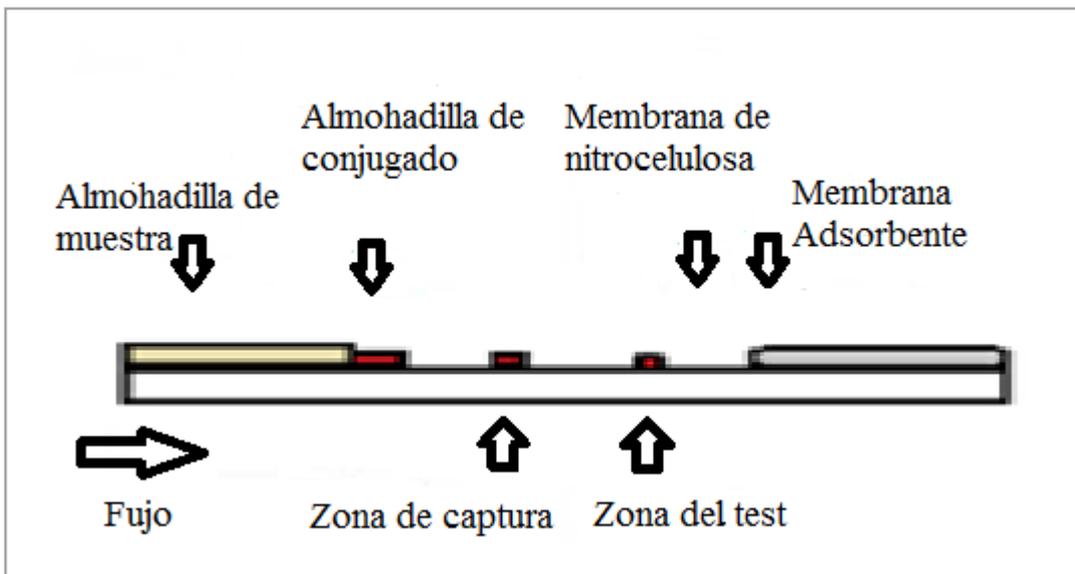


Figura 2 Esquema general de los principales componentes de una tira inmunocromatográfica para la detección de antígeno o anticuerpo en la muestra estudiada.

En la mayoría de las pruebas de diagnóstico rápido se utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. De hecho, la mayoría de las pruebas inmunocromatográficas disponibles en el mercado están preparadas con antígenos recombinantes. Sin embargo, utilizar un antígeno recombinante o un péptido para aumentar la especificidad no siempre proporciona los resultados esperados (21,23). Actualmente se recomienda la utilización de mezclas de recombinantes con el objeto de incrementar la sensibilidad sin resentir la especificidad (23). Recientemente, se ha preconizado la estrategia el empleo de antígenos totales en las pruebas de tamizaje y metodología recombinante para la confirmación, aunque esta estrategia todavía no está protocolizada (21,23)

Los test inmunocromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo al sistema de migración o el tipo de reacción. En cuanto a la forma de migración pueden ser vertical u horizontal (Figura·3).

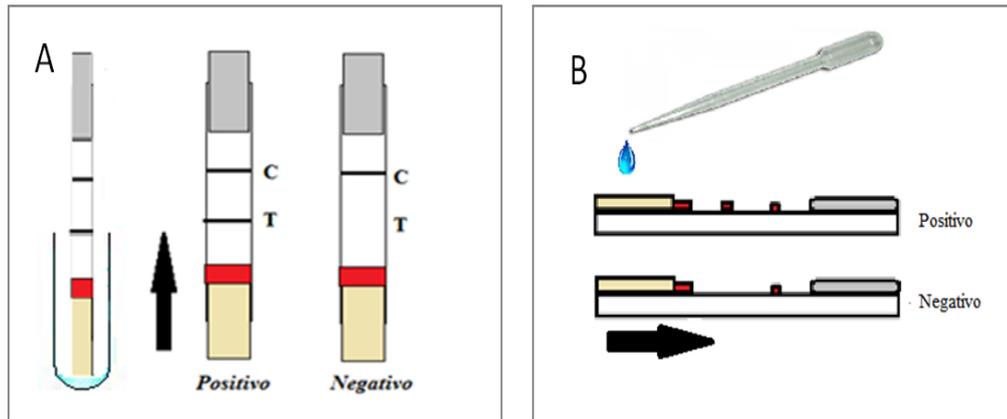


Figura 3 Esquema general de la clasificación test inmunocromatográficos según tipo de migración: A) Vertical, la tira es sumergida en la muestra para la reacción. B) Horizontal, la muestra es adicionada directamente a la almohadilla de muestra por medio de una pipeta

Según el tipo de reacción, los dos enfoques predominantes para las pruebas son el no competitivo (o directa) y el competitivo (o inhibición competitiva) (Figura 4). El esquema de reacción competitiva se usa con más frecuencia cuando se prueba moléculas pequeñas con determinantes antigénicos únicos, que no pueden unirse a dos anticuerpos simultáneamente. Es importante prestar atención a la cantidad de anticuerpo unido a las microesferas, en relación con la cantidad de antígeno libre en la muestra. Si la muestra no contiene un exceso de antígeno libre, solo algunas de las microesferas se unirán a la zona de captura, (señal débil) y darán un resultado ambiguo (24-31).

El formato de doble sandwich de anticuerpos se utiliza en las pruebas para analitos de mayor tamaño con sitios antigénicos múltiples. Algunos ejemplos más conocidos son para la detección de LH, β hCG, y VIH. Algunas de las microesferas no se unirán a la línea de captura y continuarán migrando hacia la línea del segundo anticuerpo inmovilizado, la línea de control (25-31)

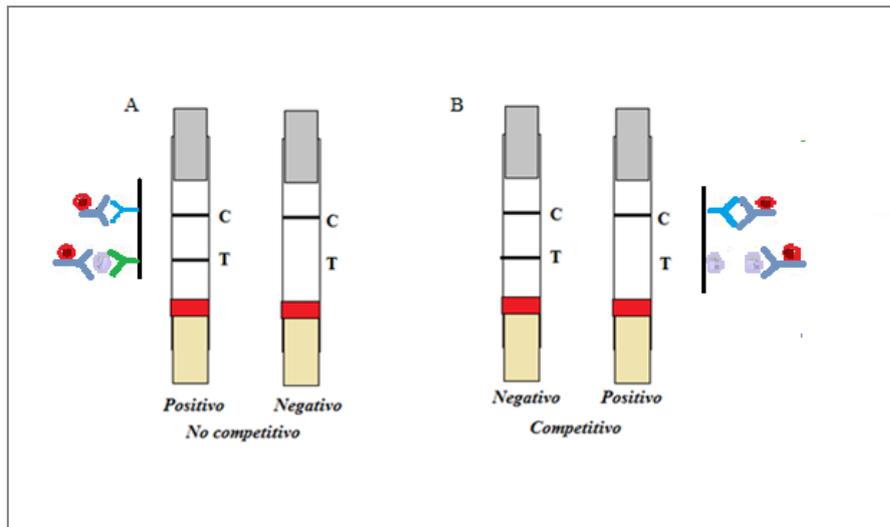


Figura 4 Clasificación de los test inmunocromatográficos según el tipo de reacción A) No competitivo: el antígeno o anticuerpo a ser detectado es capturado en la zona del test B) Competitivo: el metabolito detectado en la muestra es capturado por el conjugado, no en la zona de captura.

Existen nuevas tendencias para detectar más de una patología a la vez utilizando el esquema tradicional de los test rápidos o realizando algunas modificaciones para aumentar la señal de reacción. Inicialmente se han desarrollado diversos test múltiples para detectar drogas, metabolitos en alimentos y enfermedades como el HIV. Para esta enfermedad se ha desarrollado pruebas rápidas con variaciones en el diseño tradicional para la detección simultánea de agentes patógenos asociados a otras enfermedades infecciosas tales como *Mycobacterium tuberculosis* (TB) y el virus de la hepatitis C (VHC), que están consideradas como enfermedades oportunistas en pacientes HIV/SIDA (32). En la figura 5 se observa el esquema utilizado para este test rápido (33).

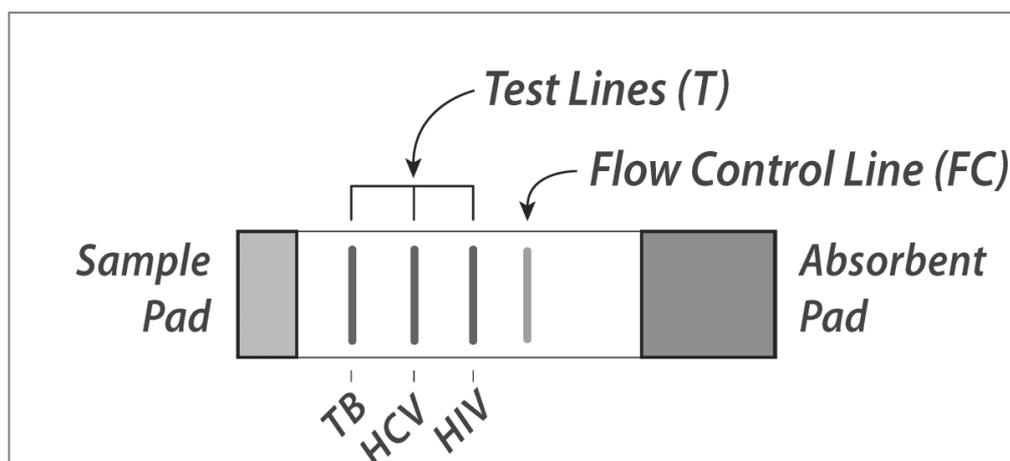


Figura 5. Test rápido para pacientes con HIV/SIDA. Se observa la detección simultánea de tres enfermedades como TB, HCV y HIV. Este esquema está diseñado para el tamizaje en la población especialmente en zonas rurales (Corstjens et al 2007)

1.4.3 Utilidad del test inmunocromatográfico

Las pruebas no convencionales tienen gran relevancia en su utilización siempre que los reactivos comerciales presenten calidad validada y acreditada. Por lo tanto, es importante contar con programas de control de calidad y procedimientos estandarizados (32).

En el área de la salud se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de validar la utilidad de las pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico de diferentes infecciones, los resultados obtenidos han reportado variabilidad en cuanto a la sensibilidad y especificidad de un mismo test aplicado en diferentes regiones, especialmente para la enfermedad de Chagas, debido a la alta variabilidad genética de este parásito (9,21, 33,34).

En la actualidad, la técnica de la inmunocromatografía es ampliamente utilizada en el diagnóstico rápido, a través de la detección de antígenos o anticuerpos en diversos líquidos biológicos, de varias enfermedades, como es el caso de las infecciones por *Streptococcus* β -hemolítico, *Chlamydia* spp, virus de la hepatitis, *Plasmodium* spp, parasitosis por *T.cruzi*, *T.gondii*, *G.lambliia* entre otras (35-42).

Esta prueba se utiliza no sólo para diagnosticar enfermedades sino también para la detección de metabolitos como hormonas, enterotoxinas (alimentos), medicamentos, sustancias tóxicas y drogas de abuso demostrando óptimos resultados (35,43-46).

En cuanto al diagnóstico prenatal, toda mujer en edad fértil y sobre todo las embarazadas deben conocer su estado de salud en relación a las enfermedades de transmisión congénita y recibir información sobre tratamientos para disminuir la tasa de transmisión durante el embarazo. En el caso de enfermedades como la hepatitis B y rubéola es importante su detección en mujeres de edad fértil con el fin de vacunar a aquellas mujeres que no hayan tenido la infección. De igual manera es importante saber si la paciente ha adquirido toxoplasmosis antes del embarazo y en caso contrario instruirla para en la prevención de la infección para evitar los efectos de la transmisión congénita. Así mismo se debe investigar la presencia de enfermedades de transmisión sexual (sífilis, gonorrea, etc), enfermedad de Chagas, infección por citomegalovirus, así como infecciones odontológicas que deban ser tratadas (35)

Para todas estas enfermedades existen de manera independiente test de diagnósticos convencionales, cuya aplicación en zonas rurales se ve dificultada por la escasa accesibilidad al diagnóstico prenatal en todas estas enfermedades. Actualmente los tests inmunocromatográficos resultan útiles en dichas áreas en el tamizaje serológico de la población rural, pero se presentan dificultades en la obtención de la batería completa para todas las enfermedades mencionadas. Por este motivo actualmente existe una fuerte tendencia hacia el desarrollo de pruebas inmunocromatográficas para la detección de varias enfermedades a la vez (36).

1.5 Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica

Para el desarrollo de un producto como es el caso de un test de diagnóstico, se debe cumplir ciertos pasos antes de proceder a su fabricación y comercialización.

Fases para el desarrollo de un producto comercial

Fase 0: propuesta del producto

Fase 1: factibilidad

Fase 2: diseño y verificación

Fase 3: validación

Fase 4: fabricación y comercialización del producto (22).

Teniendo en cuenta las fases para el desarrollo de un producto, en el presente trabajo se propuso como fase 0, estimular la innovación tecnológica en el país mediante el desarrollo de un método rápido, aplicable y accesible para la salud pública y de producción nacional. En la fase 1 el desarrollo del prototipo está justificado por el conocimiento y experiencia del laboratorio en el desarrollo de pruebas diagnósticas.

El presente trabajo centra en la fase 2, es decir en el diseño y verificación de un prototipo de prueba inmunocromatográfica para la detección cualitativa de IgG anti-*T.cruzi* que en el futuro pueda emplearse para producir test múltiples para la detección simultanea de dos o más enfermedades. En el presente trabajo se diseño y evaluó un test para la detección simultanea de IgG anti *T.cruzi* y *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) en suero humano.

La selección de esta parasitosis se debió a la importancia de ambas enfermedades para la mujer embarazada y a la disponibilidad de ambos antígenos.

A diferencia de la mayoría de las pruebas rápidas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y Toxoplasmosis existentes en el mercado, en el prototipo desarrollado se utilizó extracto soluble del antígeno total en lugar de antígeno recombinante para la detección de anticuerpos (6). Pensamos que la utilización de antígeno total permitirá incrementar la sensibilidad del test, tal como comprobamos en el método ELISA y esto podría ser de gran utilidad para el tamizaje serológico de estas enfermedades (7, 45,46).

En una segunda fase, el prototipo desarrollado podría ser validado en el campo en servicios rurales de zonas endémicas. En caso de éxito, se procederá a la fase 3 y 4 en la fabricación de pruebas inmunocromatográficas para ser comercializadas a nivel nacional (45-49).

1.6 Justificación

Importancia de elaboración de un test no convencional de mayor sensibilidad y especificidad

El objetivo principal de este proyecto de innovación tecnológica es el desarrollo de un producto robusto, de elevada sensibilidad y especificidad, capaz de competir en calidad y precio con productos similares que se ofrecen actualmente en el mercado.

En nuestro país no existen precedentes en el desarrollo de pruebas inmunocromatográficas por lo que este trabajo pretende contribuir a la innovación tecnológica. El desarrollo de esta tecnología nos permitiría aplicar

la técnica de la Inmunocromatografía para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas de importancia en salud pública, tales como sífilis, toxoplasmosis, citomegalovirus, hepatitis, rotavirus, parasitosis intestinales y otras enfermedades de interés nacional, pudiendo incluso utilizarse para el diagnóstico simultáneo de varias enfermedades.

La implementación de la prueba inmunocromatográfica para la detección de la infección con *T. cruzi* y otras enfermedades de transmisión congénita, sería de radical importancia para la prevención en nuestro país. Esta propuesta de diagnóstico rápido y con resultados en menos de 30 minutos, permitiría que las mujeres embarazadas puedan ser detectadas y reciban consejería acerca de la implicancia de la infección para el recién nacido y la necesidad de retornar para controles posteriores.

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar y evaluar un prototipo de prueba inmunocromatográfica para la detección cualitativa de IgG anti *Trypanosoma cruzi* en suero humano.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Diseñar una prueba de inmunocromatografía para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

2.2.2 Determinar la sensibilidad y especificidad del prototipo desarrollado para la detección de IgG anti *T. cruzi* en suero humano

2.2.3 Determinar la estabilidad del prototipo desarrollado

2.2.4 Comparar la utilidad diagnóstica del prototipo desarrollado con relación a otras pruebas convencionales y no convencionales.

2.2.5 Evaluar la utilidad diagnóstica del prototipo desarrollado para la detección simultánea de IgG anti *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* en suero humano.

3-MATERIALES Y METODOS

3.1 Diseño del estudio

El trabajo fue experimental, en cada etapa se realizaron pruebas preliminares para la construcción, estandarización y evaluación del prototipo.

3.2. Flujoograma de trabajo diseñado

El desarrollo y puesta a punto del trabajo se llevó a cabo en dos etapas, la primera se centró en la preparación de los componentes de la tira y el montaje del prototipo inmunocromatográfico. En la segunda etapa se comparó el prototipo desarrollado con otros métodos serológicos para la detección de la enfermedad de Chagas y se comprobó la efectividad del prototipo para el diagnóstico simultáneo de infecciones múltiples. En la figura 6 se detalla el el flujoograma de reacción.



Figura 6 Etapas para el desarrollo y evaluación del prototipo

3.3 Primera Etapa: Diseño del prototipo

3.3.1. Selección de muestras:

En la primera etapa se utilizaron para las pruebas dos sueros controles, uno positivos y otro negativo para Chagas, ambos fueron analizados por dos métodos serológicos ELISA e IFI

3.3.1. Diseño y construcción del prototipo para una prueba de inmunocromatografía

Se diseñó un prototipo de tira inmunocromatográfica de flujo vertical no competitivo para detección de IgG humana anti *T.cruzi*. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa en la cual se sembró en la zona de captura antígeno crudo de *T.cruzi* y en la zona control IgG humana. En la Figura 7 se observa los componentes del prototipo desarrollado.

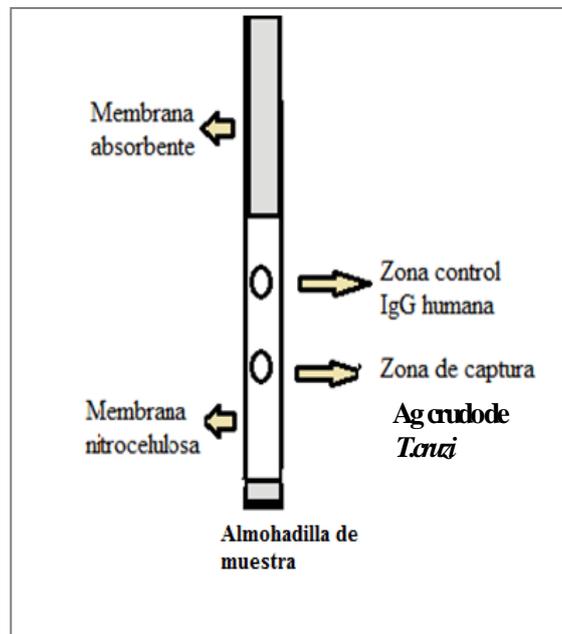


Figura 7 Esquema del prototipo no competitivo y de migración vertical diseñado en el laboratorio.

A continuación se describe los pasos seguidos en la preparación de los reactivos necesarios para el montaje de las tiras inmunocromatográficas.

3.3.2. Preparación del oro coloidal

El tamaño de las partículas de oro coloidal se preparó de acuerdo al método descrito por Grabar et al en 1995(49). Para obtener partículas de oro coloidal con un diámetro de 20 nm se pesó 0,02 g (0.01%) del ácido cloro aúrico (Sigma-Aldrich-USA) y se disolvió en 200 mL de agua del Milli-Q. La mezcla se mantuvo en agitación constante y se calentó a ebullición. A continuación se agregó 3,6 ml de citrato de sodio 1% (Sigma-Aldrich-USA) disuelto en agua de Milli-Q y se verificó el cambio de color pasando por amarillo, negro ,violeta y finalmente rojo vino a partir de los 2 min. La mezcla se calentó durante 5 min más para completar el proceso de reducción y se enfrió gradualmente durante 25-30 min en agitación constante. Se midió el pH final y se almacenó a 4°C hasta la conjugación con la IgG de cabra anti humana (50,51).

Control de calidad del oro coloidal

La calidad del oro coloidal preparado se verificó mediante microscopía electrónica y espectrofotometría (38,39 ,50).

3.3.3. Caracterización por microscopía electrónica

Se enviaron muestras del oro coloidal preparado al departamento de Microscopía Electrónica de la Escuela Superior de Agricultura Luis de Quiroz (Esalq) de la Universidad de San Pablo –Brasil (USP), con el fin de determinar el tamaño y la distribución de las partículas de oro coloidal. Como control se incluyó una muestra de un oro coloidal comercial (Sigma-Aldrich, EEUU). Las muestras se analizaron con un microscopio electrónico (JEOL 1011) empleando una aceleración de voltaje de 80 kv y magnificación mayor a 66000x (38,39).

3.3.4. Caracterización del oro coloidal por espectrofotometría

Se realizó un barrido a diferentes longitudes de onda (200-700 nm) utilizando un el espectrofotómetro UV/visible (Optima SP3000 plus–Corea) para determinar el pico

máximo de absorbancia. Si la formación del coloide es la adecuada, dependiendo de la concentración y el tamaño del oro, se debe observar un pico de absorbancia entre 520-535 nm con una densidad óptica aproximada de 0,9 (52-54).

3.3.5. Evaluación de la reactividad de la IgG anti humano de cabra contra la IgG humana por el método de inmunodifusión radial

El método de inmunodifusión doble Ouchterlony se utilizó con el fin de seleccionar el lote de la IgG anti-humano con mayor reactividad. Para el efecto se evaluó la reacción antígeno-anticuerpo mediante la formación de un inmunoprecipitado en un gel de agarosa (Agar Difco-EEUU) al 1,5 %. Se dejó difundir 5µL de IgG anti humano de cabra de diluciones diluciones (de 1/1 a 1/32 con solución fisiológica en los pocillos) alrededor de la IgG humana purificada durante 48 horas y se utilizó solución colorante de proteína con coomasie blue. Se observó la formación del inmunocomplejo por la aparición de una delgada línea blanca, se utilizó un transiluminador de luz blanca (Fujicolor light box 100v 8W-Japón) para observar el reconocimiento de antígenos (47).

3.3.6. Preparación de antígeno de *T.cruzi* cepa Epsilon (Y)

Para la preparación del antígeno total (fracción soluble) se utilizaron epimastigotes de *T.cruzi* cepa Epsilon (Y) obtenidas a partir de un cultivo de dos semanas de crecimiento en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) adicionando con suero fetal bovino (SFB) al 10%. El cultivo se realizó agregando el doble de volumen de medio LIT-SFB 10% cada 48 hs hasta completar 200 mL de volumen final. Los parásitos se mantuvieron en estufa (Irayama, Japón) a 27-28°C durante su crecimiento. El crecimiento de los parásitos se controló con un microscopio óptico de inversión (Olympus-Japón) empleando un aumento de 20x. La cinética de crecimiento se realizó contabilizando los parásitos con ayuda de una cámara de *Newbauer*. Este procedimiento se realizó hasta obtener una cantidad igual o mayor a 1×10^7 parásitos por mL.

El cultivo de epimastigotes se lavó tres veces con solución fisiológica estéril y el pellet se resuspendió en 5mL de la misma solución. La suspensión del parásito se sonicó (Branson Sonifier 450 analógico) en frío (seis ciclos de un minuto) y la fracción soluble se separó por centrifugación a 3500 rpm durante 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (55). Se añadió un inhibidor de proteasa (Aprotinin, Sigma-Aldrich, EEUU) y se almacenó en viales de 1mL a -20°C hasta su utilización (56).

3.3.7. Determinación de las condiciones óptimas para la conjugación IgG de cabra anti-humano con oro coloidal.

Antes de la conjugación con el oro coloidal se determinó la concentración óptima del anticuerpo y el pH óptimo del oro coloidal para la preparación del conjugado. Se siguió el método descrito por Beesley (57) con algunas modificaciones. La menor cantidad de proteína necesaria para proteger la solución de oro coloidal de la floculación en presencia de sales se denomina: “mínima cantidad protectora”. Después de agregar cloruro de sodio al 10%, la floculación fue vista por el cambio de color rojo (coloide protegido) a color azul (coloide no protegido). La lectura de la placa de micro titulación fue realizada a 540-620 nm en el lector de placa (Awareness Technology Inc EEUU).

3.3.7.1. Determinación de la concentración óptima del anticuerpo

Se mezcló 10 µL del IgG de cabra anti-humano (Producción Bioquímica, IICS-UNA) a diferentes concentraciones (25 a 200 µg/mL) con 100 µL de oro coloidal a pH 7,5. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 10 µL de NaCl al 10% (desestabilizador) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se midió las diferencias de absorbancia entre 540-620 nm, en el lector de placas y se construyó una curva representando la diferencia de la absorbancia entre ambas longitudes de onda. Se determinó la concentración mínima del anticuerpo que cubre la

superficie de las partículas de oro y las estabiliza, inhibiendo la formación de agregados. Para la preparación del conjugado se utilizó una concentración de anticuerpo 50% mayor que la mínima cantidad protectora (57).

3.3.7.2 Determinación del pH óptimo del oro coloidal

Se mezcló 10 μ L de la IgG de cabra anti-humano (150 μ g/ml) con 100 μ L de oro coloidal a diferentes pH (6 a 10). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió 10 μ L de NaCl al 10% (desestabilizador) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 540- 620 nm, en el lector de placas y se construyó una curva representando la diferencia de la absorbancia entre ambas longitudes de onda. Se consideró como óptimo el pH ligeramente alcalino que estabiliza el oro coloidal inhibiendo la formación de agregados (cambio el color) (57).

3.3.8 Conjugación del oro coloidal con IgG de cabra anti humano.

Para la conjugación se utilizó el oro coloidal de pH óptimo y la IgG de cabra anti humana a la concentración previamente determinada mediante la prueba de floculación (apartados 3.4.5.1 y 3.4.5.2). La conjugación se realizó mezclando 100 μ L de la IgG de cabra anti humano a concentración óptima con 1000 μ L de oro coloidal (pH óptimo). Se incubó en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Luego se bloqueó con tampón fosfato BSA 10% pH 7,6 y se incubó durante 30 minutos en agitación.

A continuación se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C en una micro centrífuga refrigerada (Kubota KR-1500-- Japón). Se eliminó el sobrenadante y se reconstituyó el pellet con tampón fosfato BSA 1% pH 7,6 y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. En el último centrifugado se eliminó completamente el sobrenadante y se ajustó el volumen a 50 μ L con el tampón fosfato-BSA 1% pH 7,6. El conjugado se almacenó a 4°C protegido de la luz (38, 39 ,50,54).

3.3.8.1 Verificación del desplazamiento del pico de absorbancia

Cuando el oro coloidal se conjuga con la IgG anti humano de cabra se observa un desplazamiento del pico máximo de absorbancia. Con el objeto de constatar la correcta preparación del conjugado se utilizó el espectrofotómetro UV/visible (Optima SP3000 plus-Corea) para realizar una curva de absorbancia (520-530nm) (34). Con las siguientes muestras: oro coloidal sin conjugar, y mezcla de oro coloidal conjugado. De acuerdo a la bibliografía, se debe observar además un pico a 280 nm, debido a los residuos de tirosina y triptófano del anticuerpo en la mezcla oro coloidal-anticuerpo que disminuye después de la conjugación (38).

3.3.8.2 Reactividad del conjugado con la IgG humana

Se realizaron diferentes diluciones de la IgG humana purificada (Producción Bioquímica. IICS-UNA) a partir de 0,5 mg/mL hasta una dilución 1/16. Se utilizaron para la prueba membranas de nitrato de celulosa de 0,45 μm de porosidad y 13 mm de diámetro (Advantec-Japón). En el centro de dichas membranas se sembró 3 μL de cada dilución y se secó en estufa a 37°C durante 15 min. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente con 500 μL de PBS-BSA 3% pH 7,6, durante 30 min en agitación suave. Se lavó con PBS pH 7,6 durante 5 min. Las membranas se secaron en estufa a 37°C durante 10 min y se incubaron las membranas con 200 μL de conjugado dilución 1/20 durante 20 a 30 min en agitación suave. Se lavó con 500 μL de agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Se consideró como positiva la aparición de una señal de color rojo en el centro de la membrana. El control positivo de la reacción fue el conjugado de oro coloidal-proteína A (proteína de alta afinidad a la IgG humana) y como control negativo se sembró en la membrana PBS (47,58).

3.3.8.3 Prueba de reactividad del conjugado con suero humano

La eficacia del conjugado se evaluó por la técnica del Inmunodot (58,59). Se utilizaron sueros humanos positivos y negativos para la enfermedad de Chagas, previamente testados por el método de ELISA (Chagas test IICS-UNA, Paraguay) así como por otros métodos serológicos. Se sembraron diferentes diluciones de antígeno (1/1 a 1/8) en membranas de nitrato de celulosa de 0,45 μm de porosidad y 13 mm de diámetro (Avanted, Japón). Se incubó con distintas diluciones de los sueros humanos positivos y negativos para *T. cruzi* (1/25 a 1/400). Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con el conjugado oro coloidal-IgG anti humano (dilución 1/20). Se consideró como reacción positiva la aparición de puntos rojos después de 10 minutos (Figura 8).

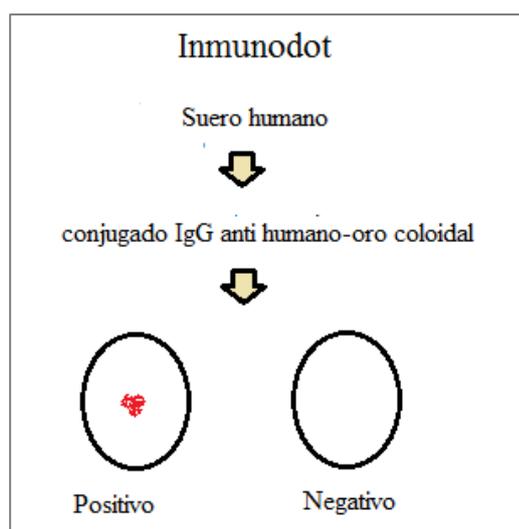


Figura 8 Prueba de reactividad del conjugado. En la reacción con los sueros positivos se observa un punto rojo en el centro de la membrana y con los sueros negativos no se observa color.

3.3.9. Montaje de la tira inmunocromatográfica

La membrana utilizada para las pruebas fue la HF120 mMC100 (Millipore-EEUU). Se activó durante 10 min con agua de Milli Q y 30 min con PBS pH 7,5. Se secó durante 3 horas a 37°C y se guardó a 4°C hasta su utilización (54,60).

La inmovilización del anticuerpo y el antígeno en la superficie de la membrana se realizó por adsorción física. Se aplicaron con pipetas automáticas 1-3 μL de IgG humana (1mg/mL) y 1-3 μL de *T.cruzi* (9,5mg/mL) a diferentes diluciones 1/1 (9,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1/2 (4,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1/4 (2,37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1/8 (1,18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La membrana se secó a 37°C durante 1 hora, antes del bloqueo con PBS-Tween 0,05%, leche descremada al 3% durante 30 minutos. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS-Tween 0,05% durante 5 minutos. La membrana se secó a 37°C durante 3 horas y posterior a esto se pegó en el extremo superior una membrana de celulosa (absorbente). Las membranas fueron cortadas manualmente con las siguientes dimensiones siguientes dimensiones; 0,5 cm de ancho y 4,5 cm de largo. Las tiras se almacenaron en tubos con desecantes a 4°C hasta su utilización (Figura 9) (54).

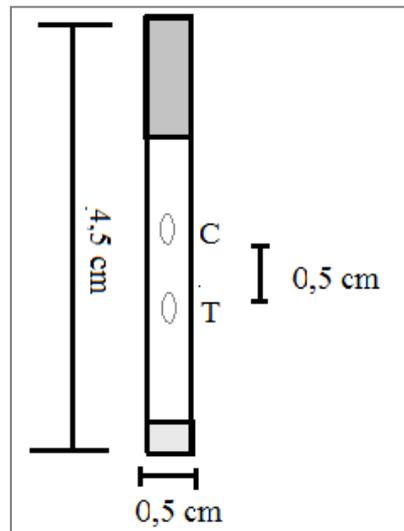


Figura 9 Dimensiones de la tira inmunocromatográfica. Se observan el largo y el ancho de la inmunocromatográfica, así como la distancia entre la zona control y la zona de captura.

3.3.9.1 Determinación de las condiciones óptimas para la utilización del prototipo del prototipo diseñado

Para determinar las condiciones de reacción se llevaron a cabo varias pruebas preliminares que se describen a continuación.

3.3.9.2 Prueba de movilidad en la tira inmunocromatográfica

Con el objeto de verificar la migración a lo largo de la membrana, así como la reactividad en la línea control (IgG humano) se realizó la prueba de movilidad empleando 50 μ L del conjugado IgG anti-humano de cabra–oro coloidal (dilución 1/20) y un conjugado comercial para la verificación de la migración a través de la membrana y la reactividad en la línea control (IgG humana). Como control se utilizó un conjugado comercial.

3.3.9.3 Elección de la estrategia de reacción

Estrategia en un paso

En la estrategia en un paso las tiras se incubaron con volúmenes iguales de sueros a diluciones de 1/40 a 1/220 previamente mezclados con el conjugado diluido 1/20 en el pocillo de reacción. Posteriormente se agregó la tira inmunocromatográfica para observar la reacción (43) (figura 10 A).

Estrategia en dos pasos

En la estrategia en dos pasos primeramente se probó incubado el suero (positivo o negativo) con las mismas diluciones que en paso anterior con la tira inmunocromatográfica, luego se secó la membrana y posteriormente se incubó con el conjugado diluido 1/20 (figura 10 B).

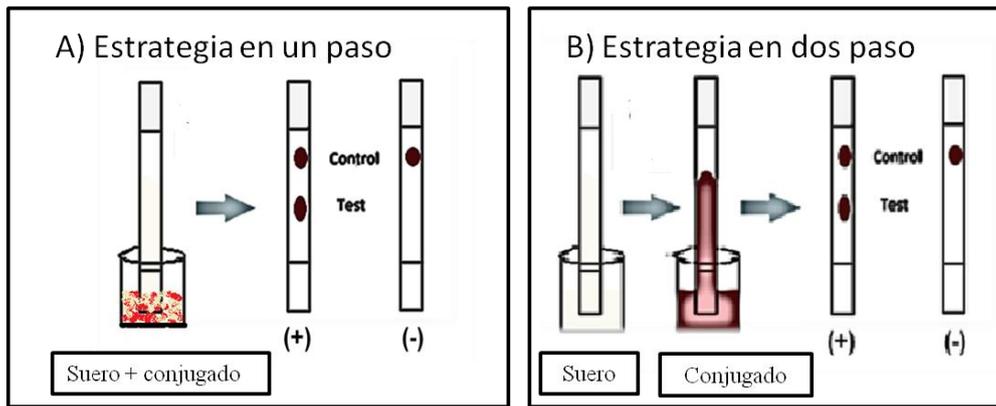


Figura 10 Esquema de las estrategias de reacción. A) incubación de la tira inmuncromatográfica con el suero y conjugado al mismo tiempo e igual volúmenes. B) Incubación de la tira inmuncromatográfica primeramente con el suero, seguido de secado y por último incubación con el conjugado.

3.3.9.4 Determinación de las condiciones óptimas para la reacción inmuncromatográfica

Para determinar las condiciones óptimas de dilución de la muestra y la dilución del antígeno crudo de *T.cruzi* en la línea de captura, se prepararon cuatro grupos de 12 tiras inmuncromatográfica, para cada grupo se utilizó una concentración diferente de antígeno 1/1 (9,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1/2 (4,75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1/4(2,37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1/8(1,18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las tiras de cada grupo se incubaron con diferentes diluciones de suero positivo para Chagas (1/25, 1/50, 1/100, 1/150 ,1/200) y suero negativo diluido 1/50. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente sumergiendo las membranas en el suero de manera vertical durante 10 minutos (min), luego se secaron a 37°C durante 5 min y se incubaron a temperatura ambiente con una dilución 1/20 del conjugado durante 10 min antes de realizar la lectura.

3.3.9.5 Selección del tiempo y volumen mínimo de corrida

Con el objeto de estandarizar los condiciones de reacción se probaron distintos tiempos de incubación con el suero (2 ,5 y 10 min), secado de la tira (5 y 10 min) y revelado con

el conjugado (10 y 20 min). Paralelamente se determinó el volumen óptimo de la muestra y conjugado probando con diferentes volúmenes de 50, 100 y 200 μ L.

3.4. Segunda Etapa: Evaluación del prototipo.

3.4.1. Selección de muestras:

Se seleccionaron 202 sueros de los cuales 97 fueron positivos y 105 negativos para Chagas, determinados por ELISA e IFI para determinar IgG anti *T.cruzi*. Estos sueros fueron almacenados en la seroteca de los departamentos de Biología Molecular y Producción Bioquímica del IICS-UNA. Las muestras seleccionadas provienen de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas de distintas regiones del Paraguay tales como Cordillera, Paraguarí (Región Oriental) y Mariscal Estigarribia (Región Occidental). Los sueros negativos para Chagas y positivos para patologías como toxoplasmosis, sífilis, tuberculosis, factor reumatoideo y hepatitis fueron seleccionados de la seroteca de los departamentos de Producción Bioquímica y Biología Molecular del IICS-UNA.

En la prueba del diseño de infecciones múltiples para la detección de IgG anti *T.cruzi* e IgG anti *T.gondii* se utilizaron 3 sueros controles positivos de diferentes densidades ópticas y 1 negativo para Toxoplasmosis, además de 11 sueros de pacientes ,7 positivos y 4 negativos para toxoplasmosis para determinar las condiciones óptimas del antígeno de *T.gondii* para ser utilizado en la tira inmunocromatográfica. Posteriormente para la evaluación de la tira de detección simultánea de IgG anti *T.cruzi* y *T.gondii* se utilizaron 10 sueros confirmados por el método de ELISA como positivos o negativos para Toxoplasmosis y/o Chagas

3.4.2. Comparación del prototipo desarrollado con el método de ELISA

Para la evaluación del prototipo desarrollado se seleccionaron al azar 202 sueros con serología positiva (97) y negativa (105) para Chagas. Para cada suero se determinó la densidad óptica mediante el método de ELISA indirecto IgG (Chagas test-IICS-UNA) (56) y de manera paralela se analizaron empleando el prototipo de prueba inmunocromatográfica. Se utilizó la estrategia de reacción seleccionada de los apartados 3.3.9.3, 3.3.9.4 y 3.3.9.5.

3.4.3. Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial

Se analizaron 94 sueros con el prototipo desarrollado y el test comercial inmunocromatográfico (SD Bioline-Korea), de los cuales fueron tipificados 51 sueros positivos y 43 negativos para IgG anti T.cruzi por el método de ELISA Chagas test (IICS-UNA)

La prueba con el prototipo se realizó bajo las condiciones descritas en el apartado 4.4. La prueba comercial (SD Bioline-Korea) se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante, se interpretó como resultado positivo la presencia de las dos bandas, correspondientes a la zona control y la zona de captura. La presencia de una sola banda en la zona control se consideró como resultado negativo.

3.4.4. Determinar la estabilidad del prototipo por degradación térmica

La prueba de estabilidad térmica se realizó por triplicado, las tiras inmunocromatográficas se guardaron a 4°C y en estufa a 37°C en tubos cerrados durante 10 y 31 días. Posteriormente se comparó la reactividad de las tiras almacenadas a 37 °C con las de las tiras a 4°C almacenadas durante el mismo período de tiempo. Las tiras se

incubaron con sueros positivos y negativos para Chagas. Se realizó una comparación cualitativa entre las tiras clasificando el resultado como positivo o negativo.

3.5. Evaluación del prototipo desarrollado para la detección simultánea de infecciones múltiples

Esta prueba fue realizada con el objetivo de probar si el conjugado utilizado podría ser aplicado para la detección de otras patologías en simultáneo y de manera individual. Partiendo del prototipo desarrollado para la detección de IgG humano anti-*T.cruzi*, se construyó un prototipo para la detección simultánea de infecciones de Chagas y Toxoplasmosis. En la figura 11 se describe los componentes de este prototipo.

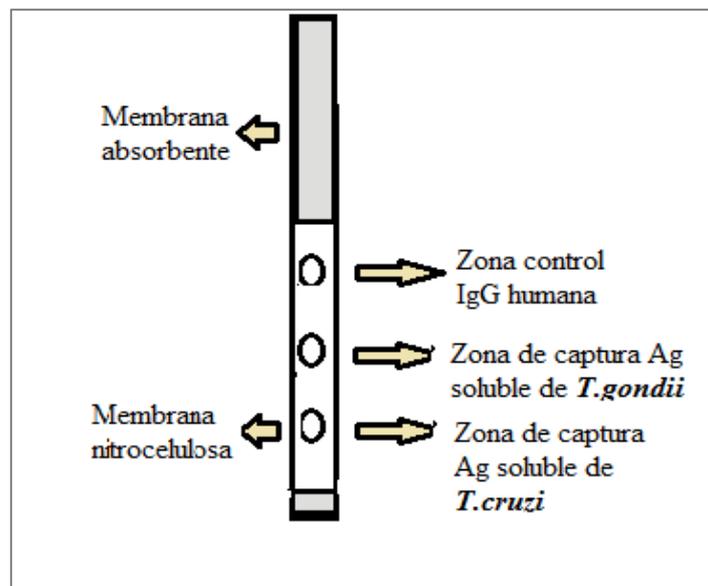


Figura 11 Prototipo propuesto para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas y Toxoplasmosis.

3.5.1. Preparación de Antígeno de *T.gondii*

El parásito de *T.gondii* se obtuvo en ratones albinos mediante la inoculación intraperitoneal de taquizoitos de la cepa RH, después de tres días de la inoculación, se extrajo del peritoneo del ratón el exudado por medio de lavados. La preparación del

antígeno crudo de *T.gondii* se realizó de manera similar al antígeno de *T.cruzi*, siguiendo los pasos del apartado 3.3.6

3.5.2. Determinación de las condiciones óptimas de la tira inmunocromatográfica para detección simultánea de dos patologías.

Para este prototipo se realizaron pruebas adicionales para cada parásito, a fin de determinar la concentración óptima del antígeno de *T.gondii* a ser utilizada en la tira inmunocromatográfica de detección simultánea

3.5.3. Sensibilización de las membranas con el antígeno de *T.gondii*

Se sembró con pipeta automática el antígeno de *T.gondii* y la IgG humana sobre la membrana de nitrocelulosa (HF120 Millipore). Se aplicaron 1 μ L de IgG humana (1mg/ml) y 1 μ L de *T.gondii* (7.29mg/ml) diferentes diluciones 1/1 (7,29 μ g/ μ L), 1/2 (3,6 μ g/ μ L), 1/4 (1,8 μ g/ μ L), 1/8 (0,9 μ g/ μ L). Las membranas se secaron a 37°C durante 1 hora, luego se bloquearon con PBS-Tween al 0,05% leche descremada al 3% durante 30 minutos. Posteriormente las membranas se lavaron 2 veces con PBS-Tween 0,05% durante 5 minutos. Las membranas se secaron a 37°C durante 3 a 4 horas, y se cortaron manualmente con las siguientes dimensiones; 0,5 cm de ancho y 4,5 cm de largo. Se agregó la membrana adsorbente y se almacenaron en tubos con desecante a 4°C hasta su utilización (54).

3.5.4. Determinación de las condiciones óptimas para la reacción inmunocromatográfica

Se procedió a determinar la concentración óptima del antígeno y la dilución del suero. Las tiras de cada grupo (distintas concentraciones de antígeno) Se incubaron con distintas diluciones de sueros controles 3 positivos y 1 negativo para Toxoplasmosis. La

reacción se llevó a cabo siguiendo la estrategia determinada en los apartados 3.3.9.3, 3.3.9.4 y 3.3.9.5.

Una vez determinada la dilución óptima se confirmó probando 4 sueros controles y 11 sueros de pacientes ,7 positivos y 4 negativos para toxoplasmosis para verificar el funcionamiento de las tiras.

3.5.5. Montaje del prototipo para detección múltiple

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa HF 120 mMC100 (Millipore-USA) previamente activadas (apartado 3.3.9). Se sembró 1 μ L de los antígenos solubles de *T.cruzi*. (4,8 μ g/ μ L) y *T.gondii* (1,8 μ g/ μ L). Los antígenos de *T. cruzi* y *T.gondii* se fijaron a una distancia de 1,5 y 1 cm del extremo inferior de la tira, respectivamente. En la zona de control se sembró 1 μ L IgG humana (1mg/ml) a una distancia de 2 cm del extremo inferior de la tira.

La membrana se secó a 37°C durante 1 hora, luego se bloqueó con PBS-Tween 0,05% leche descremada 3% durante 30 minutos. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS Tween 0,05% durante 5 minutos. La membrana se secó a 37°C previo marcado de las mismas durante 3 a 4 horas.

A la membrana sensibilizada se le agregó la membrana adsorbente (fibra de celulosa Millipore-EEUU) en el extremo superior luego se cortaron tiras de 0,5 cm de ancho y 4,5 cm de largo. Las tiras fueron almacenadas en tubos con desecantes a 4°C hasta su utilización.

3.5.6. Prueba preliminar del prototipo de infección múltiple con suero humano

La estrategia utilizada para la prueba con los sueros es la misma de los apartados 3.3.9.3, 3.3.9.4 y 3.3.9.5. Las tiras se incubaron con sueros diluidos 1/50 durante 10 min, se secaron a 37°C durante 5 min y se incubaron con el conjugado IgG anti humano

oro coloidal diluido 1/10. La interpretación de los resultados fue de manera cualitativa. Se consideró como resultado positivo para una o ambas patologías la aparición uno o dos puntos rojos en las zonas de captura. La ausencia de puntos rojos en la zona control invalidó la reacción. Para probar la reactividad de las tiras se procesaron 10 sueros confirmados como positivos o negativos para Toxoplasmosis y/o Chagas por el método de ELISA (Chagas IICS y el ELISA Toxo IICS). En la Figura 12 se observa el esquema de reacción y la interpretación del mismo.

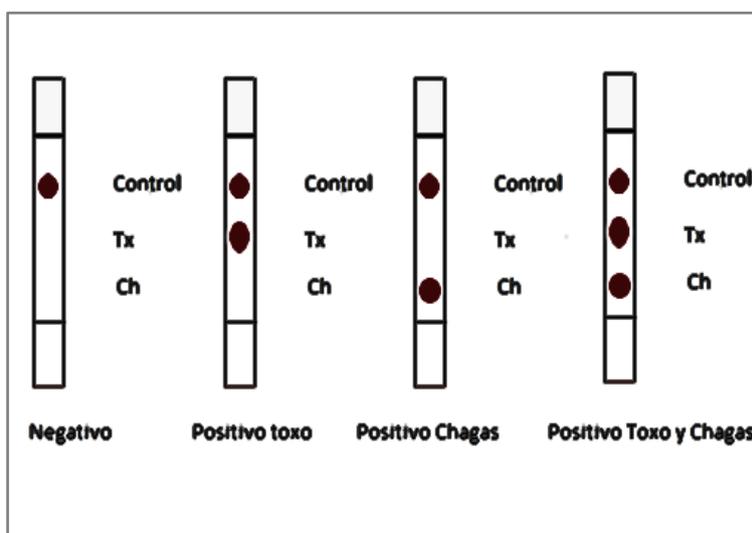


Figura 11 Esquema de interpretación de las tiras de detección simultanea con sueros positivos y negativos para la enfermedad de Chagas y toxoplasmosis.

3.6. Asuntos estadísticos y éticos

Estadísticos

Los datos fueron introducidos y almacenados en una base de datos utilizando una planilla electrónica, los valores se expresaron en positivos o negativos, se calculó la concordancia expresada en el índice Kappa (Landis y Koch) del prototipo desarrollado con respecto al método de ELISA y el test inmunocromatográfico comercial. Para esto

se construyeron tablas de contingencia de 2x2. Se calculó además de manera preliminar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del prototipo desarrollado con respecto al método de ELISA. Estos datos fueron analizados en el programa estadístico de Epidat (versión 3.1).

Éticos

Se utilizaron sueros de la seroteca del departamento de Producción Bioquímica y Biología Molecular. Estos sueros se encuentran codificados, sin datos personales, como nombre, edad y procedencia, de los pacientes. Los datos obtenidos de los análisis se incluyeron en una base de datos mediante la asignación de un número que se utilizó para la evaluación del prototipo de test inmunocromatográfico desarrollado en este trabajo.

El protocolo de este trabajo fue aprobado por los comité Científico y Ético del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.

El beneficio que se obtendrá será a futuro para el país, debido a que se podrá contar con la implementación de una nueva herramienta diagnóstica, la cual no se ha desarrollado hasta el momento a nivel nacional.

4-RESULTADOS

4.1. Primea Etapa

4.1.1. Análisis del preparado del oro coloidal.

El oro coloidal se preparó por métodos químicos utilizando la reducción controlada del ácido cloro áurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). El ácido cloro áurico se reduce a átomos de oro con citrato de sodio y muchos de los átomos de oro se acumulan formando una solución coloidal. Al cabo de 1 min de la adición de la solución de citrato de sodio al 1% se observó un cambio gradual en la coloración de amarillo, pasando por negro y finalmente al rojo vino (Figura 12). El coloide se obtuvo en el tiempo estimado según la metodología aplicada.



Figura 12 Reducción de oro coloidal por el ácido cloro áurico. En la figura se observan los cambios de color durante la reducción, de amarillo claro, negro a rojo vino.

4.1.2 Caracterización de las partículas de oro coloidal

La caracterización del oro coloidal preparado en el laboratorio se realizó empleando microscopía electrónica y espectro UV/Vis. Se utilizó como control un oro coloidal comercial de 20 nm.

4.1.2.1. Evaluación por microscopía electrónica

El tamaño y la distribución de las partículas de oro coloidal se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET). En las imágenes obtenidas se observó buena dispersión de las partículas de oro coloidal, así como un diámetro uniforme, comparable al del oro coloidal comercial de 20 nm (figura 13).

En este trabajo los resultados obtenidos demuestran que las partículas de oro reducidas en el laboratorio son adecuadas para la producción del conjugado oro coloidal – anticuerpo.

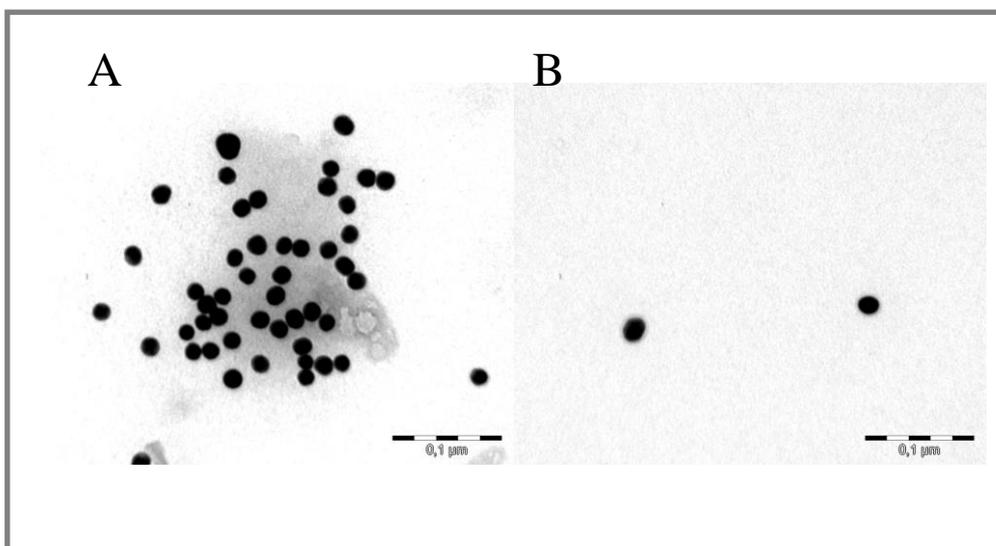


Figura 13 Nanopartículas de oro coloidal captadas por el microscopio electrónico de transmisión TEM (JEOL 1011-Japón) teniendo en cuenta una magnitud de 85000 x y un voltaje de 80KV. En la Foto A se observan las partículas del oro coloidal comercial y en la Foto B las partículas del oro coloidal preparado en el laboratorio.

4.1.2.2. Caracterización de las partículas de oro coloidal por espectrofotometría

UV/visible

El estudio de la curva de absorbancia del oro preparado y el oro comercial entre 400 y 700 nm se observó un pico de absorbancia de 530 nm para ambas muestras (Tabla 1)

Tabla 1 Características del oro coloidal preparado y comercial

CARACTERÍSTICAS		
	Oro coloidal IICS	Oro coloidal comercial
Tamaño	20nm	20nm
Color	Rojo oscuro	Rojo claro
Pico de absorbancia (nm)	530	530
Densidad óptica	0,903	0,928
Concentración	0,01%de H _{Au} CL ₄	0,01%de H _{Au} CL ₄

En conjunto los resultados obtenidos demuestran que las partículas de oro reducidas en el laboratorio son adecuadas para la producción del conjugado oro coloidal-anticuerpo.

4.1.3. Evaluación de la reactividad de la IgG anti humano de cabra contra la IgG humana por el método de Inmunodifusión radial

Se analizaron por IDR 13 lotes de IgG anti humano de cabra del departamento de Producción Bioquímica (IICS-UNA) de los cuales 12 presentaron títulos de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$, el lote 13 presentó título $\frac{1}{8}$. Se eligió el lote 13 (27 mg/mL) para la conjugación con el oro coloidal por tener una mayor reactividad (Figura 14)

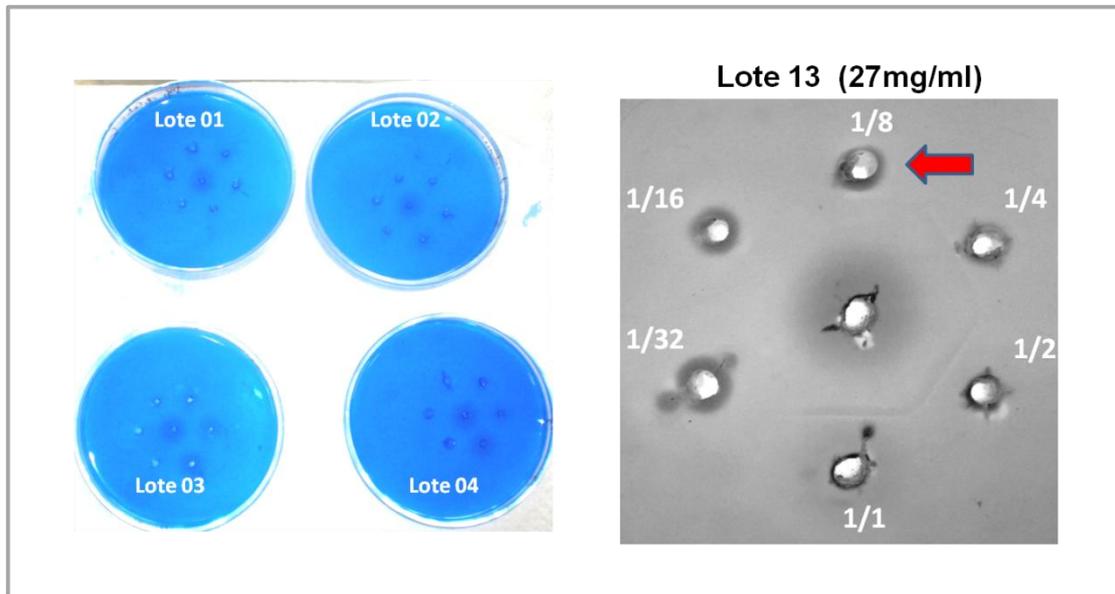


Figura 14. Prueba de reactividad de la IgG anti humano de cabra. Reacción inmunológica de la IgG humana con la IgG anti-humano de cabra realizando diluciones hasta 1/32.

4.1.4. Preparación de antígeno extracto soluble de *T.cruzi* cepa Epsilon (Y)

Se preparó el antígeno a partir de 3ml de cultivo de 1×10^7 parásitos/mL en solución fisiológica, se sonicó y centrifugó obteniéndose 3 ml de antígeno (fracción soluble) a una concentración de 17,44 mg/ml. Este antígeno fue utilizado para la prueba de reactividad del conjugado por el método del inmunodot y para el montaje del prototipo diseñado. En la figura 15 se observan los pasos realizados para la preparación.

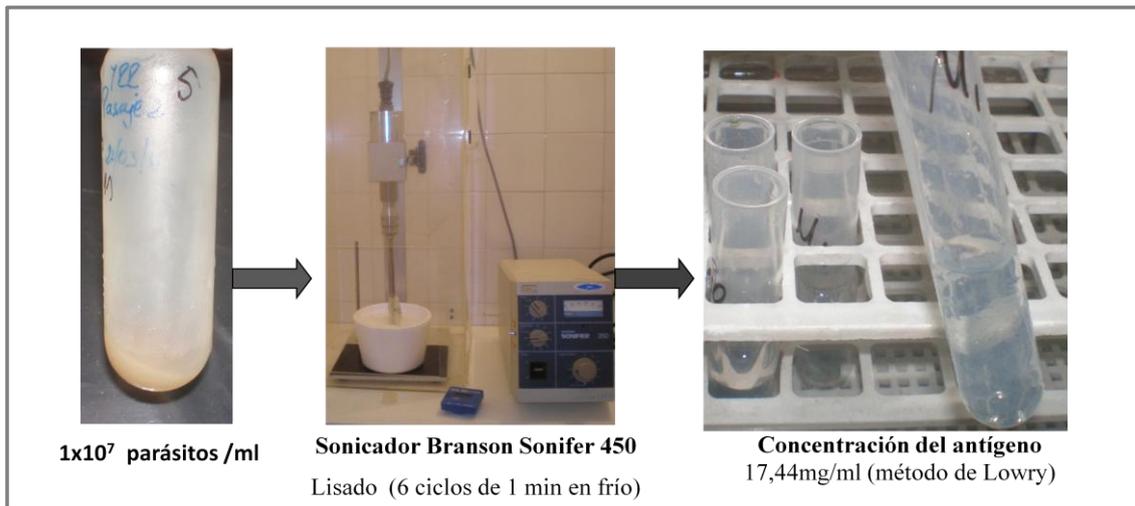


Figura 15 Lisado de los epimastigotes de *T.cruzi* cepa Y para la obtención del extracto soluble por el método del sonicado y determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.

4.1.5. Condiciones óptimas para la preparación del conjugado IgG humana - oro coloidal.

Se determinó la concentración ideal del anticuerpo IgG anti humano de cabra (lote 13) y el pH óptimo para la conjugación empleando el test de floculación descrito en el apartado 3.3.7 de materiales y métodos.

4.1.5.1 Determinación de la concentración óptima del anticuerpo

La mínima concentración de IgG de cabra anti-humano se determinó añadiendo NaCl al 10% a las partículas de oro coloidal mezcladas con diferentes cantidades del anticuerpo. Se observó que a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG de cabra anti-humano las partículas de oro coloidal se estabilizan (Grafico 1). Para la preparación del conjugado se utilizó una concentración 50% mayor que el valor mínimo (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la curva de reacción de las diferentes concentraciones del anticuerpo a pH 7,5.

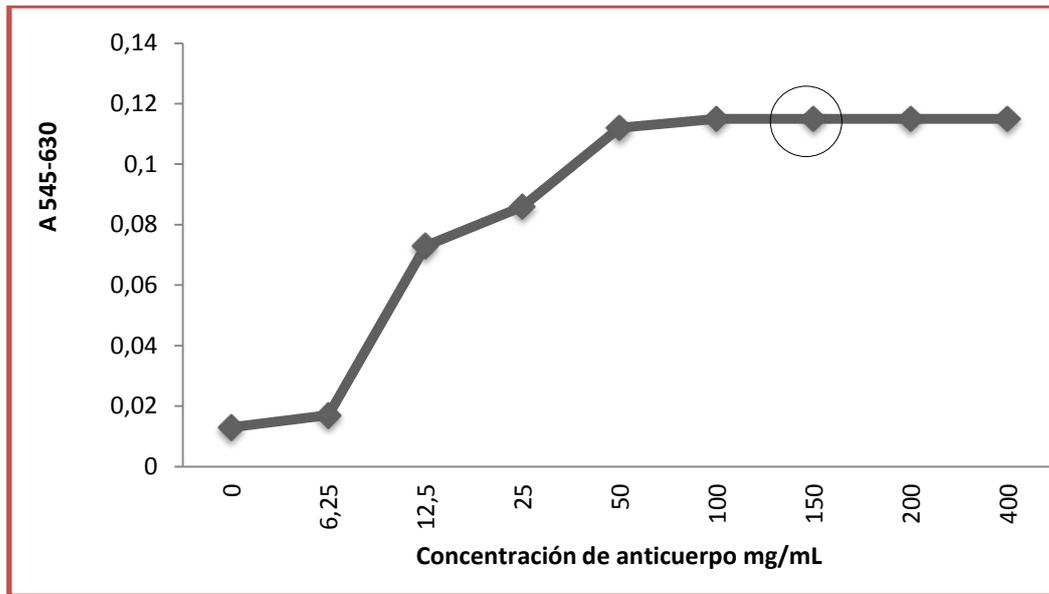


Gráfico 1 Determinación de la concentración óptima del anticuerpo determinada mediante el test de floculación utilizando NaCl al 10% como agente desestabilizante. La cantidad mínima protectora fue a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ y se utilizó una concentración de anticuerpo 50% mayor para la conjugación.

4.1.5.2. Determinación de la concentración óptima del anticuerpo

Se determinó el valor de A540–620 para cada valor de pH (Gráfico2). No se observaron cambios significativos entre los valores de pH de 7 a 10, aunque se pudo constatar un ligero aumento del grado de agregación a medida que las condiciones se vuelven más alcalinas. Para la preparación del conjugado se utilizó un pH 7,5-8.

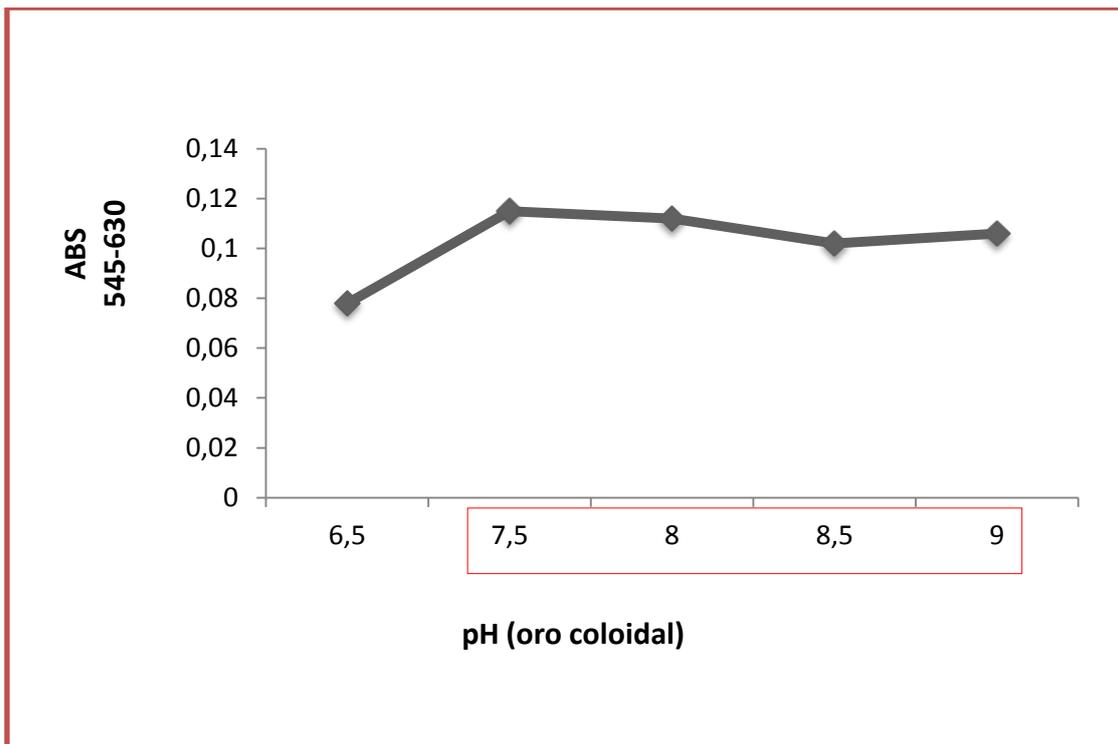


Gráfico 2 Determinación del pH óptimo del oro coloidal mediante el test de floculación utilizando concentración constante del anticuerpo IgG de cabra anti-humano y NaCl al 10% como agente desestabilizante. Se observó que a pH alcalino estabiliza la reacción manteniéndose estable la unión del oro con el anticuerpo.

4.1.6. Preparación del conjugado de IgG anti-humano de cabra con oro coloidal

Una vez preparado, el conjugado se guardó a 2-8°C hasta su utilización. Para el control de calidad del conjugado se realizó una dilución 1/20 con 1x PBS pH 8/BSA 1%.

4.1.6.1 Control de calidad del conjugado:

Para el control de la preparación del conjugado se realizó la caracterización del complejo oro coloidal IgG anti –humano se evaluó por espectrofotometría (desplazamiento del pico de absorbancia) y se evaluó reactividad con IgG humana.

4.1.6.1.1. Caracterización del conjugado oro coloidal-anticuerpo por espectrometría UV/visible

La absorbancia máxima obtenida en la muestra de oro coloidal se registró a 530 nm (Gráfico 3a) mientras que la muestra del anticuerpo y el oro coloidal se observó un pico

de adicional a 280 nm propio de proteínas y asociado a la presencia de de aminoácidos aromáticos como triptófano y tirosina (Gráfico 3c). En el conjugado se observó una disminución de la absorbancia a 280 nm debido a que después de la conjugación y re suspensión del conjugado IgG anti-humano de cabra-oro coloidal se reduce la concentración de oro coloidal y anticuerpos libres en la solución, también se observa el desplazamiento del pico de absorbancia de 530 a 535nm correspondiente a la conjugación (Gráfico 3b). Este desplazamiento se asocia a la formación del conjugado IgG de cabra antihumano-oro coloidal.

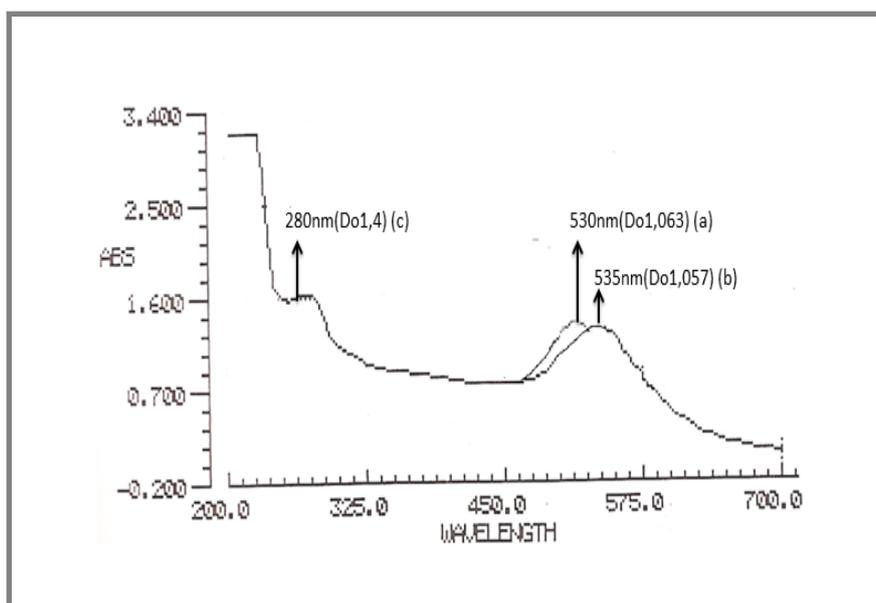


Gráfico 3 Desplazamiento del pico máximo de absorbancia en el conjugado. La curva (a) corresponde al oro coloidal, la curva (b) al conjugado IgG de cabra anti humano-oro coloidal y la curva (c) a la mezcla del anticuerpo y el oro coloidal.

4.1.6.1.2. Reactividad del conjugado con IgG humana

Para evaluar la reactividad del conjugado se realizaron diferentes diluciones de la IgG humana partiendo de la concentración de 0,5 mg/ml, se pudo observar que el conjugado IgG de cabra anti-humana oro coloidal fue capaz de reaccionar con la dilución hasta 1/64. Sin embargo, la intensidad de la señal disminuye significativamente en la última

dilución. Es importante mencionar que no se observó reacción en la membrana sensibilizada con PBS (control negativo). Para confirmar la reacción se utilizó como control positivo una conjugado comercial proteína A-oro coloidal. También se analizó las señales del conjugado utilizando dos diluciones del conjugado 1/10 y 1/20 observándose reacciones similares con la IgG humana dilución 1/8. Por lo tanto, se optó por la dilución 1/20 para las siguientes pruebas. En la figura 16 se puede observar las reacciones de las diferentes diluciones de la IgG humana con el conjugado (dilución 1/20 y 1/10).

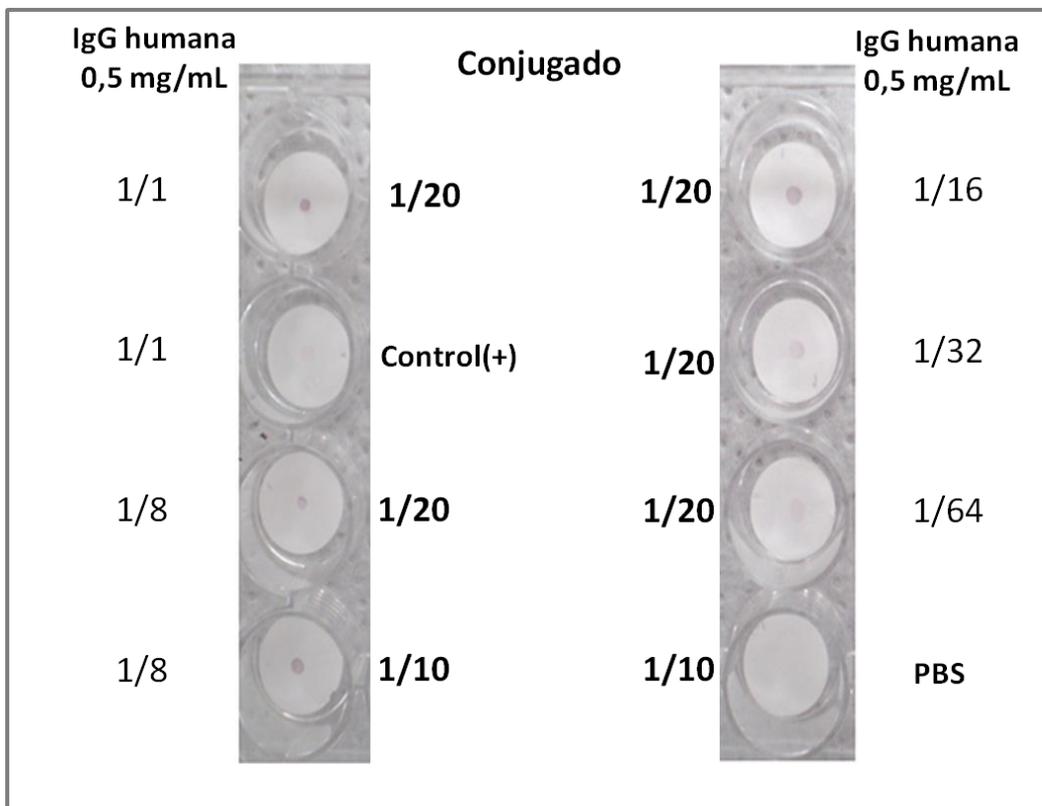


Figura 16 Reactividad del conjugado con la IgG humana purificada. Como control (+) de la reacción se utilizó el conjugado comercial Proteína A-oro coloidal. Control (-) utilizado fue PBS .

4.1.6.1.3 Prueba de reactividad del conjugado con suero humano.

Las membranas se sensibilizaron con antígeno extracto soluble de *T cruzi* preparado en el apartado 3.3.6. Las membranas fueron incubadas con distintas diluciones del suero

humano positivo para Chagas así como con suero humano negativo para Chagas dilución 1/25. Se observó reacción positiva en las diluciones 1/25 y 1/50 del suero positivo y no se observó reacción con el suero negativo (figura 17). Este resultado demuestra que nuestro conjugado reconoce las IgG anti *T cruzi* unidas al antígeno en la membrana y que no se une de manera inespecífica al antígeno solo, como se evidencia en el caso del el suero negativo demostrando que este no presenta reacción cruzada con el mismo.

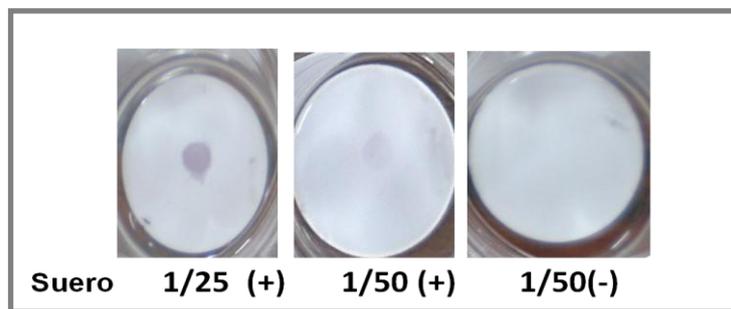


Figura 17 Reactividad del conjugado dilución 1/20 con la IgG anti-*T cruzi* en suero humano. La señal de la reacción disminuye a medida que aumenta la dilución del suero. No se observó señal con el suero negativo lo que significa que solo se unió a la IgG que reconoció al antígeno pegado a la membrana.

4.1.7. Montaje de la tira

Una vez preparados todos los componentes de la tira como la IgG humana (zona control), extracto soluble de *T.cruzi* (zona de captura) y el conjugado se procedió al ensamblaje del prototipo siguiendo el esquema de la figura 18:

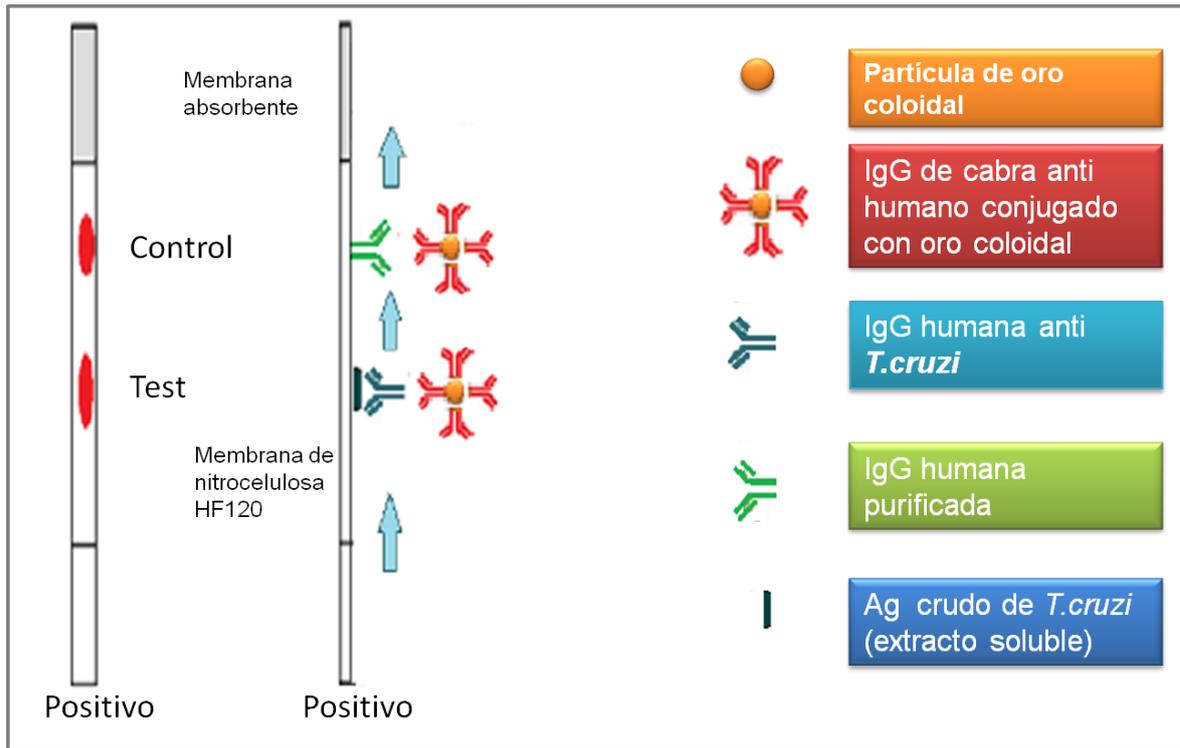


Figura 18 Esquema del prototipo desarrollado, con las características de una tira inmunocromatográfica no competitiva y de migración vertical

4.1.8. Determinación de las condiciones óptimas para el test de diagnóstico inmunocromatográfico.

Para lograr la estandarización de la reacción se realizaron varias pruebas para verificar el funcionamiento del prototipo desarrollado.

4.1.8.1. Prueba de movilidad en las tiras inmunocromatográfica

La movilidad y reactividad de la tira inmunocromatográfica fue verificada mediante la incubación del conjugado con el prototipo desarrollado. Se verificó el funcionamiento de la tira y la reactividad del conjugado observándose una señal en la zona control a partir del primer minuto de corrida. Como control se utilizó un conjugado comercial, con ambos conjugados se observó una excelente migración en la membrana y reactividad en la zona control (figura 19).

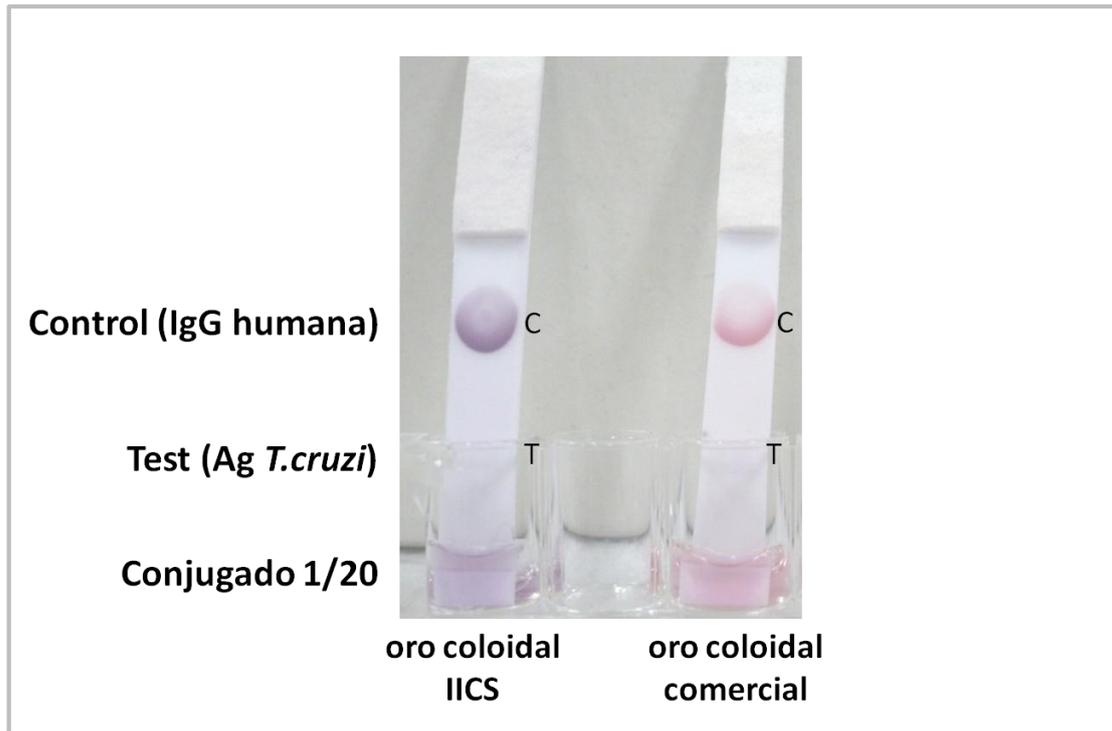


Figura 19 Prueba de la movilidad del prototipo desarrollado con el conjugado. 1) migración con el conjugado preparado en el laboratorio y 2) la migración con un conjugado comercial.

4.1.8.2. Elección de la estrategia de reacción

En primer lugar se planteó una reacción en un solo paso en la que el suero positivo y el conjugados previamente mezclados en partes iguales se incubaron con la tira inmucromatográfica. Esta prueba se realizó diluyendo la muestra hasta 1/220. Empleando este procedimiento, no se detectó reacción positiva en la zona de captura ni en la zona control, lo que significa que la reacción no es válida. En la figura 20 se observa el resultado de la reacción en un solo paso.

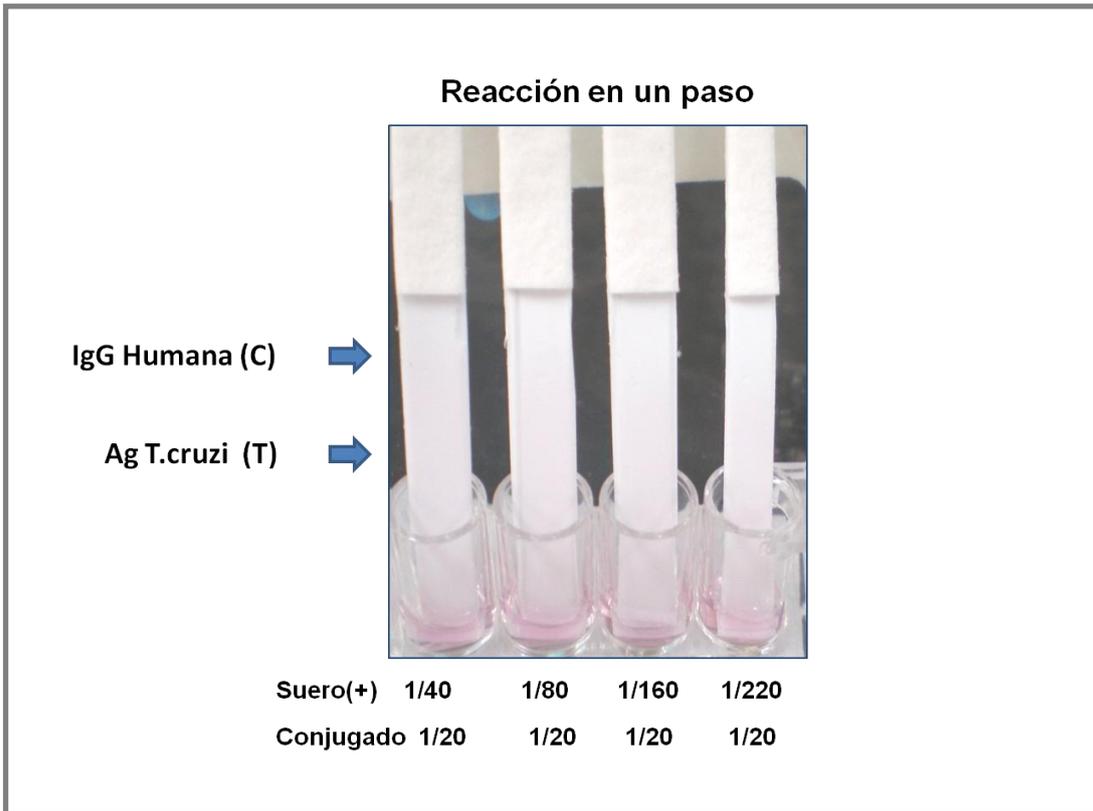


Figura 20 Reacción en un pas. Las tiras se incubaron con diferentes diluciones de suero positivo (+) y conjugado dilución 1/20.

Debido a que la estrategia en un solo paso no funcionó se optó por probar una segunda estrategia de reacción basada en dos pasos. En primer lugar, se incubó la tira con el suero (positivo o negativo) y a continuación se reveló con el conjugado oro coloidal-anticuerpo (dilución 1:20). Se observó una reacción débil en la zona de captura y fuerte en la zona control (figura 21). Estos resultados sugieren que esta estrategia funciona mejor que la primera con el prototipo desarrollado en el laboratorio. Posteriormente se realizaron distintas pruebas para optimizar las condiciones de reacción, con la finalidad de obtener reacción más intensa en la zona de captura.

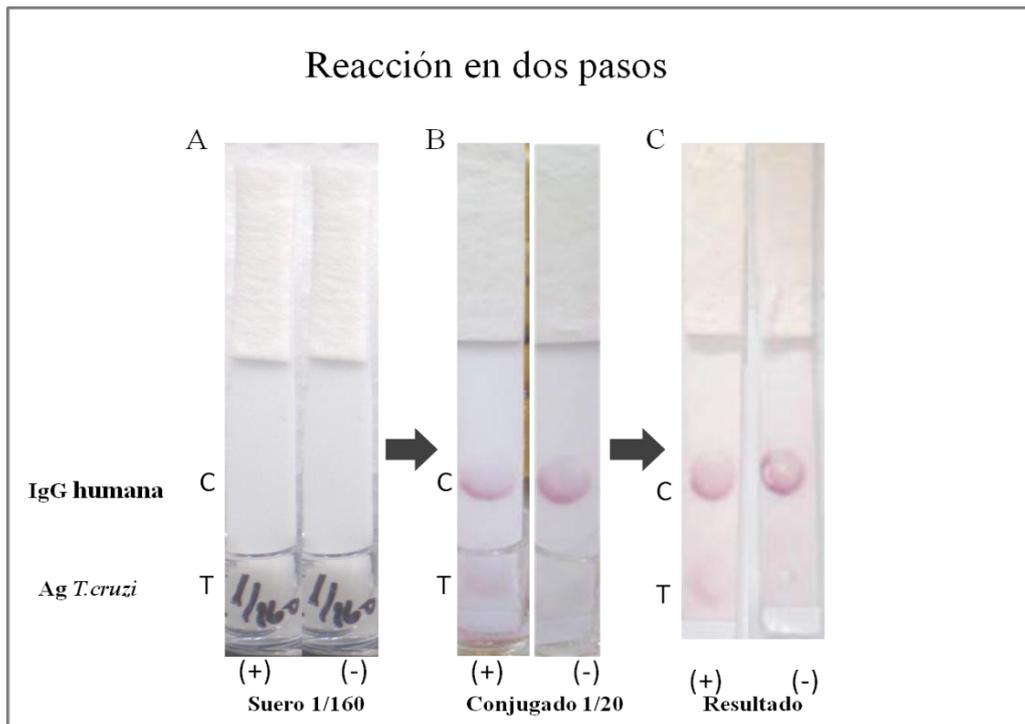


Figura 21 En la zona del test (T) se sembró antígeno soluble de *T. cruzi* y en la zona del control (C) IgG humana. En A se observa la incubación con los sueros positivo (+) y negativo (-), en B la incubación con el conjugado y visualización de la zona control, en C se observa la reacción final en la que además de la señal en la zona control aparece una débil señal en la zona de captura.

4.1.8.3. Determinación de la dilución del suero y concentración del antígeno de *T. cruzi* para la reacción

En la reacción de dos pasos se pudo observar con nitidez la reacción en zona control, sin embargo en la zona de captura la señal fue más débil. El siguiente paso consistió, por lo tanto, en determinar la dilución del suero y la concentración óptima del antígeno para la obtención de una señal nítida en la zona de captura.

Para el efecto se sensibilizaron membranas con diferentes diluciones de antígeno y se incubaron con distintas diluciones de suero. Se observó buena reactividad con las diluciones 1/2 y 1/4 del antígeno y las diluciones 1/200 y 1/50 del suero, respectivamente (figura 22 a). Teniendo en cuenta que la mayoría de las pruebas

inmunocromatográficas utilizan la menor dilución posible de la muestra se eligió la dilución 1/50 del suero.

Para confirmar la concentración óptima del antígeno para la dilución 1/50 del suero se realizó la titulación del antígeno de *T.cruzi* (fracción soluble). Se partió de una concentración de 17,3mg/mL (1/1) realizando diluciones seriadas 1/2(8,65mg/mL), 1/4(4,33 mg/mL) y 1/8 (2,16 mg/mL). Las tiras sensibilizadas se incubaron con una dilución 1/50 de suero negativo o positivo y se revelaron con una dilución 1/20 del conjugado. Como se puede observar en la figura 22 b, con el suero positivo (dilución 1/50) se detectó reacción, tanto en la zona control como la de captura, con todas diluciones del antígeno. La señal más intensa se obtuvo la dilución 1/4 del antígeno, detectándose una señal más fuerte en ambas zonas. Con el suero negativo (dilución 1/50) no se observó reacción en la zona de captura pero si en la zona control. Por lo tanto, se concluyó que la concentración óptima del antígeno fue la de dilución 1/4 (4,33 mg/mL) (figura 22 a y b).

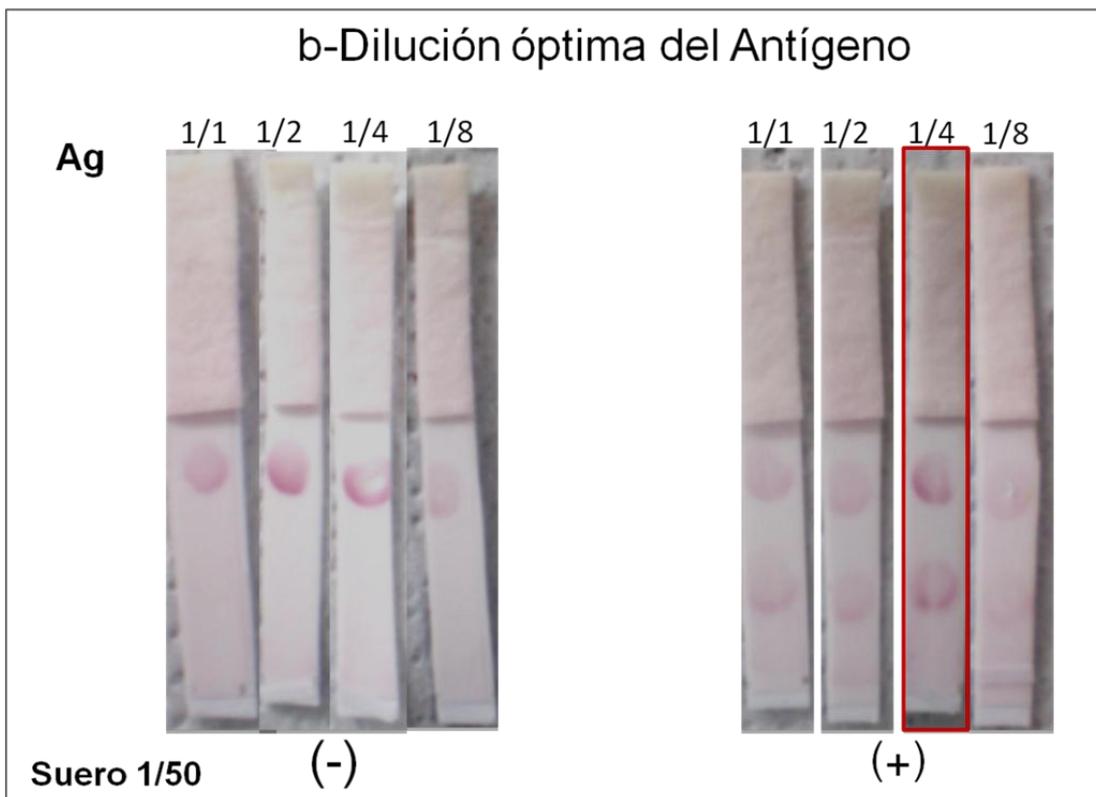
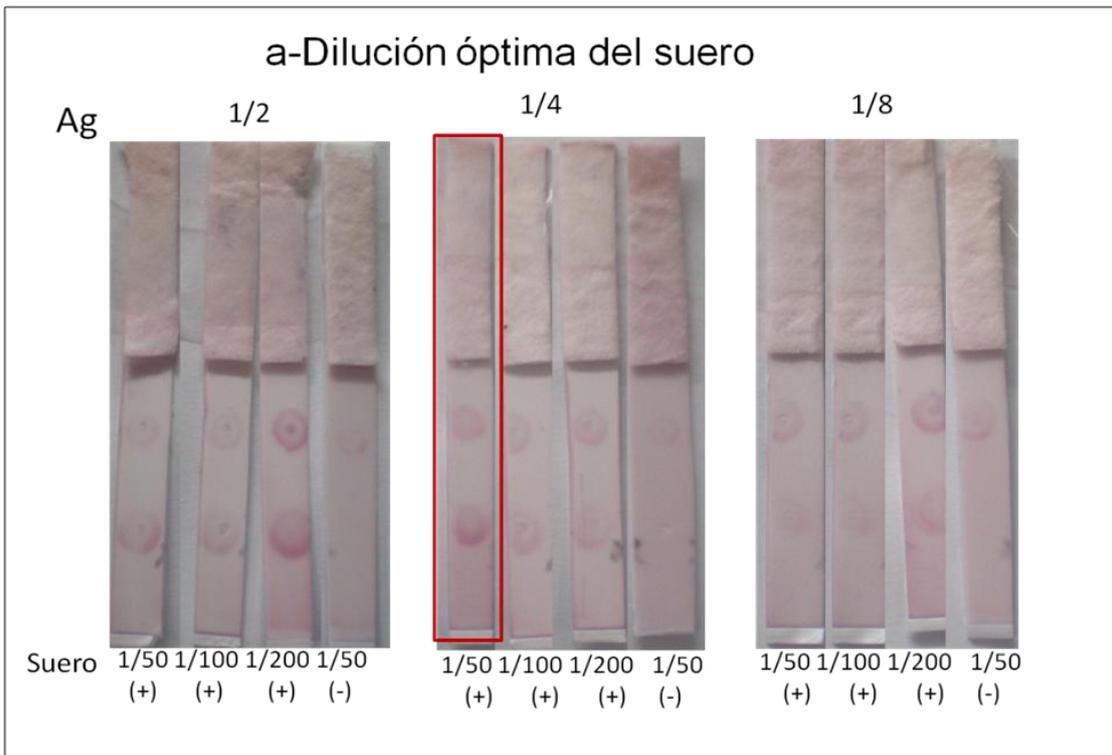


Figura 22 Determinación de las condiciones óptimas. a) Determinación de la dilución óptima del suero b) Determinación de la concentración óptima del antígeno.

4.1.8.4 Selección del tiempo y volumen mínimo de corrida

Con el fin de determinar el volumen mínimo de muestra y conjugado que evidencie una buena señal tanto en la zona control como en la zona de captura se analizaron diferentes volúmenes de suero y conjugado partiendo de 50 hasta 200 μL . Utilizando la estrategia de dos pasos, se observó que el mínimo volumen necesario para observar una buena reacción fue de 50 μL tanto para la muestra como para el conjugado.

Igualmente se determinó el tiempo óptimo de incubación en cada paso, eligiéndose 10 min como mejor reacción para la muestra y 10 minutos para el conjugado. El tiempo óptimo de secado de la membrana entre ambos pasos, fue de 10 minutos a temperatura ambiente o 5 minutos a 37°C .

4.1.9. Flujograma de reacción del prototipo diseñado

A partir de las condiciones óptimas determinadas se construyó el esquema de reacción que se observa en la figura 23

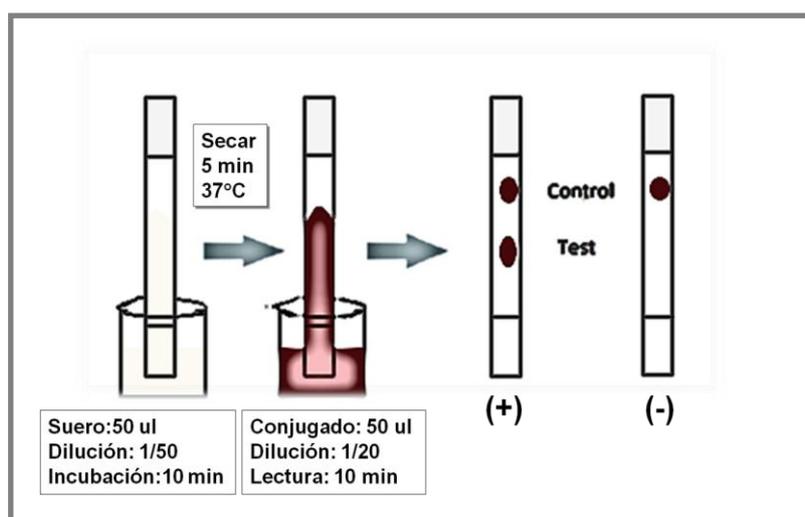


Figura 23 Estrategia de reacción del test inmunocromatográfico determinado después de varias pruebas del volumen de muestra y conjugado, determinación del tiempo de reacción y secado de la membrana.

4.2. Segunda Etapa

4.2.1. Comparación del prototipo desarrollado con el método de ELISA

Una vez estandarizadas las condiciones de reacción, el prototipo desarrollado se comparó con el método de ELISA (Chagas test IICS-UNA). Se analizaron 202 sueros, 97 positivos y 105 negativos para Chagas, se determinó la sensibilidad y especificidad del prototipo desarrollado, así como la concordancia entre ambos métodos. En Tabla 2 se muestran los resultados de ambas pruebas con sueros de pacientes chagásicos. Se obtuvo una sensibilidad del 97% IC_{95%} (92-100%) y una especificidad del 95 % IC_{95%} (90-99%). Se determinó la concordancia entre los métodos y se obtuvo un índice kappa de 0,92 IC_{95%} (0,86-0,97) entre ambas pruebas. En la figura 24 se pueden observar algunos ejemplos de tiras inmunocromatográficas positivas y negativas con diferentes densidades ópticas determinadas mediante el método de ELISA. Es interesante destacar que se observó una correlación entre la intensidad de las señales y los valores de densidad óptica (OD) obtenidos por el método de ELISA.

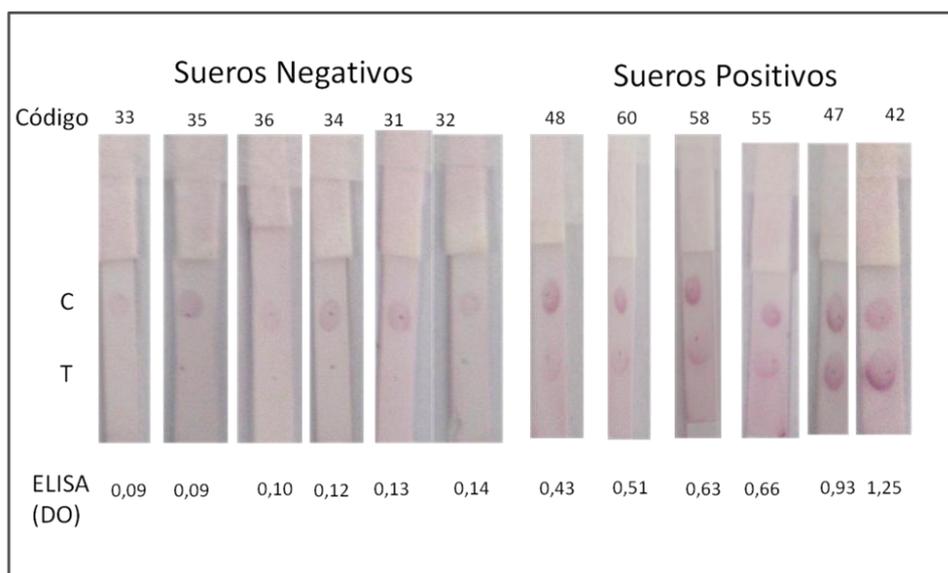


Figura 24 Comparando con el método de ELISA, debajo de cada tira se observan las densidades ópticas (DO) obtenidas por el método de ELISA. Línea Control (C) y Línea de captura (T)

Tabla 2: En la tabla se observan los valores de sensibilidad y especificidad del prototipo desarrollado, además del índice kappa que indica la concordancia con respecto al método de ELISA

Prototipo	ELISA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	94	5	99
Negativo	3	100	103
Total	97	105	202
	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad	97 %	93-100	
Especificidad	95 %	91-100	
Valor predictivo (+)	95 %	90-100	
Valor predictivo (-)	97 %	93-100	
Índice Kappa	0,92	0,87-0,97	

4.2.2. Reacción cruzada con otras patologías

A fin de determinar el potencial de reactividad cruzada con otras enfermedades, fueron analizados 52 sueros negativos para la enfermedad de Chagas y positivos para otras patologías (tabla 3). En sueros positivos para Toxoplasmosis se detectó 1 caso positivo en 17 muestras (0.05%) y sueros positivos por leishmaniosis visceral dieron reacción positiva 4 de 5 sueros (80%). En sueros positivos para sífilis (13), hepatitis B y C (9), tuberculosis (5) y artritis reumatoide (3) no se observó reacción cruzada. Estos resultados muestran que existe un alto porcentaje de reactividad cruzada con leishmaniosis visceral, tal como se ha observado anteriormente con el ELISA Chagas test IICS que también utiliza antígeno crudo (extracto soluble).

Tabla 3 Resultado del prototipo desarrollado para *Trypanosoma cruzi* en sueros de individuos con otras patologías parasitarias y no parasitarias

Patología	Tipo	Positivos/casos
Infecciones parasitarias	Toxoplasmosis	1/17
	Leishmaniosis visceral	4/5
Infecciones no parasitarias	Sífilis	0/13
	Hepatitis	0/9
	Tuberculosis	0/5
Enfermedades autoinmunes	Artritis reumatoide	0/3

4.2.3. Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial

Con el objeto de comparar el rendimiento de la tira inmunocromatográfico desarrollada con el de un test comercial se eligieron 94 sueros positivos y negativos para Chagas por el método de ELISA (ELISA Chagas test IICS-UNA). Todos los sueros se procesaron con el test inmunocromatográfico comercial (SD Bioline, Korea) y el prototipo desarrollado, con los datos obtenidos se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo , además de la concordancia entre el prototipo y el test comercial .También se determinó la sensibilidad, especificidad , valor predictivo positivo y negativo del test comercial con respecto al ELISA. En la tabla 4 se observan los resultados entre ambos test inmunocromatográfico y en la tabla 5 los resultados del test comercial con respecto al ELISA.

Tabla 4 Comparación del prototipo desarrollado con un test inmunocromatográfico comercial

Prototipo	Comercial SD		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	47	4	51
Negativo	1	42	43
Total	48	46	94
		Valor	IC (95%)
Sensibilidad		97 %	93-100
Especificidad		91%	82-100
Valor predictivo (+)		92 %	84-100
Valor predictivo (-)		97 %	92-100
Índice Kappa		0.89	0.80-0.98

Tabla 5 Comparación del test inmunocromatográfico comercial (SD Bioline-Korea) con el ELISA Chagas test IICS

Comercial SD	ELISA Chagas test IICS		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	48	0	48
Negativo	3	43	46
Total	51	43	94
		Valor	IC (95%)
Sensibilidad		94 %	87-100
Especificidad		100 %	99-100
Valor predictivo (+)		100 %	99-100
Valor predictivo (-)		93 %	85-100
Índice Kappa		0.94	0.87-1

4.2.4. Determinación de la estabilidad de las tiras inmunocromatográficas por degradación térmica

La estabilidad de las tiras inmunocromatográficas desarrolladas se analizó por degradación térmica. Las tiras de inmunocromatográficas se mantuvieron a 37°C durante 10 y 31 días y se comparó la reactividad con las tiras almacenadas a 4°C durante el mismo período de tiempo (figura 25). Si bien se observó un 100 % de estabilidad a los 10 días, a los 31 días no se observó una buena reacción en la zona de control. Estos resultados demuestran la robustez del prototipo desarrollado ya que la estabilidad a los 10 días podría ser extrapolable hasta 6 meses desde su elaboración y almacenamiento en las condiciones del laboratorio a 4°C en tubos y desecante.

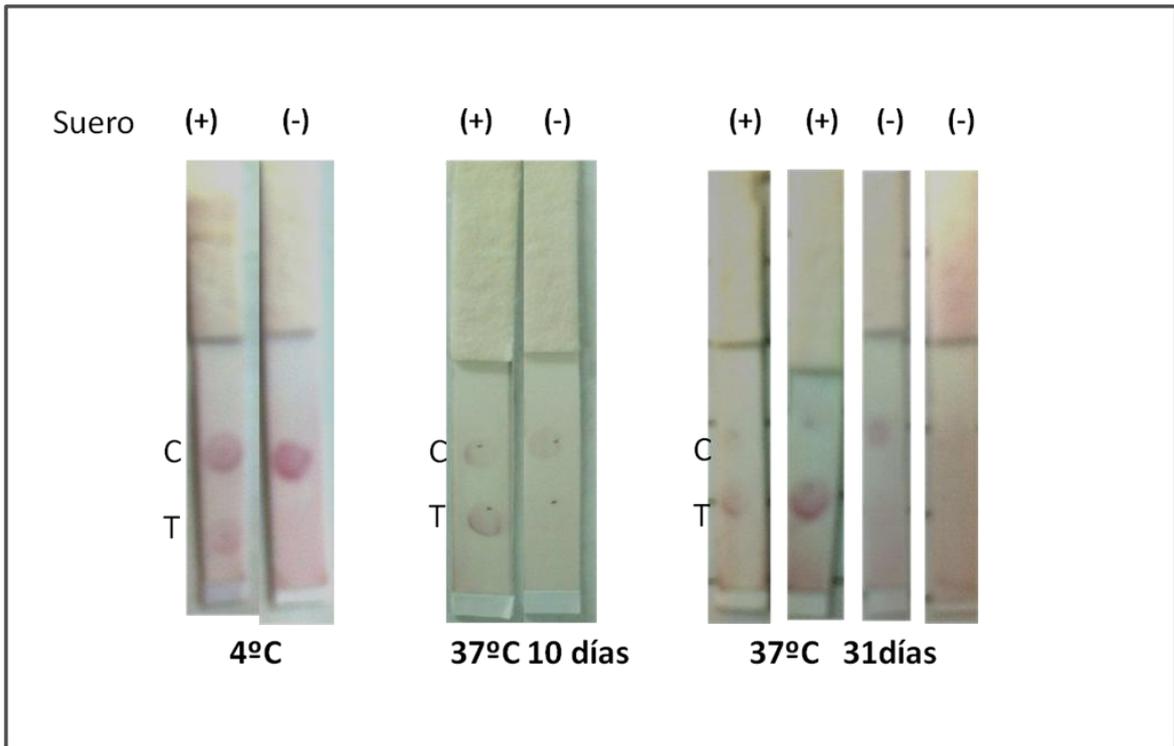


Figura 25 Determinación de la estabilidad de las tiras inmunocromatográficas por el método de degradación térmica. Reactividad de tiras del mismo lote almacenadas a 4° C y a 37°C de 10 y 31 días con sueros positivo (+) y negativo (-) para Chagas. Línea Control (C) y Línea de captura (T)

4.2.5. Evaluación del potencial diagnóstico del prototipo desarrollado para la detección simultánea de infecciones múltiples

Con el fin de determinar el potencial diagnóstico del sistema desarrollado para la detección simultánea de dos infecciones, se preparó un prototipo con IgG humana en la zona control y antígenos anti *T.cruzi* y *T.gondii* en la zona de captura (Figura 26). Se utilizó el conjugado oro coloidal-IgG de cabra anti-humano para la detección.

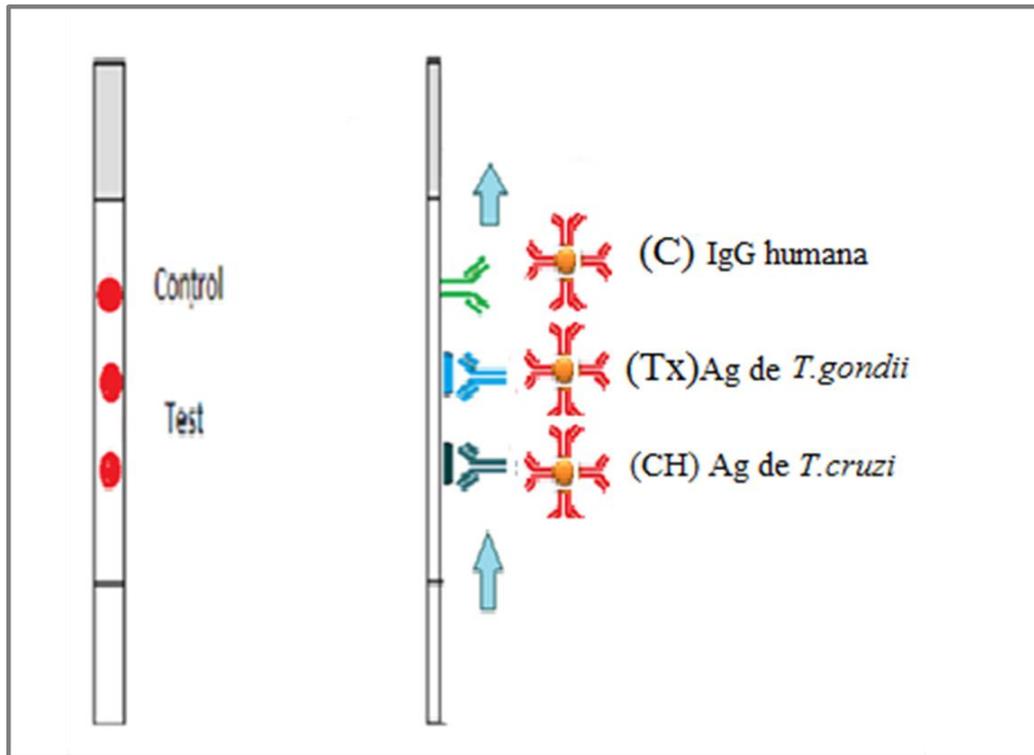


Figura 26 Diseño del prototipo para la detección simultánea de dos patologías. Se sembró antígeno crudo (extracto soluble) de ambos parásitos.

4.2.6. Determinación de las condiciones óptimas de la tira inmunocromatográfica para detección simultánea dos patologías.

Se eligió al *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) para acompañar en la tira al *T.cruzi* por ser otra patología de importancia para la mujer embarazada en el tamizaje prenatal. Además de la disponibilidad del parásito en el laboratorio.

Para utilizar el antígeno crudo de *T.gondii* se realizaron pruebas previas con el fin de obtener las condiciones adecuadas para el sembrado de la tira. En el caso de *T.cruzi* se utilizaron las condiciones descritas en los apartados 3.3.7.1 y 3.3.7.2

Para determinar las condiciones óptimas para el *T.gondii* se partió de una concentración de 7,9 µg/mL de antígeno de *T.gondii*, se realizaron diluciones y se sembró 1µL del antígeno de cada dilución en la membrana de nitrocelulosa de la tira

inmunocromatográfica. Las pruebas se realizaron con sueros positivos y negativos para toxoplasmosis de diferentes densidades ópticas testados por el método de ELISA. En base a los resultados obtenidos se observó mayor especificidad con la dilución 1/8, del Ag considerando que ya no se observó falso positivo con el suero negativo. Estos resultados evidenciaron que la dilución 1/8 resulta ideal para el montaje del prototipo para detección de Chagas y Toxoplasmosis. En la figura 27 se observan las distintas diluciones de antígeno de *T.gondii* y la reacción con los sueros positivos (PI,PII,PIII) y negativo (N).

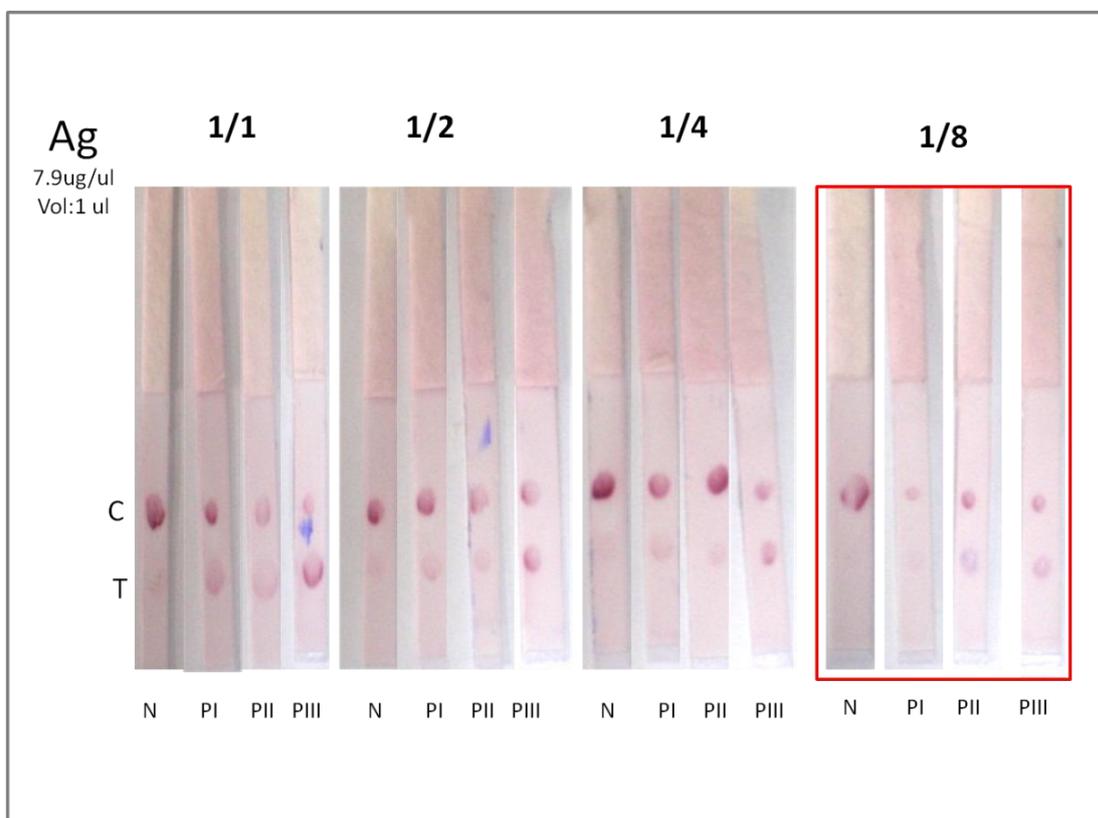


Figura 27 Determinación de la concentración óptima del antígeno de *T.gondii* con la dilución 1/8 no presenta reacción en la zona de captura con el suero negativo. Línea Control (C) y Línea de captura (T)

Una vez seleccionada la dilución del antígeno de *T.gondii*, se repitió la reacción utilizando la dilución 1/8 probando con 4 sueros controles 3 positivos y 1 negativo, además de 11 sueros de pacientes positivos para toxoplasmosis por el método de ELSIA. Los resultados fueron reproducibles y se observó una señal muy nítida tanto en la zona control como en la zona de captura (figura 28).

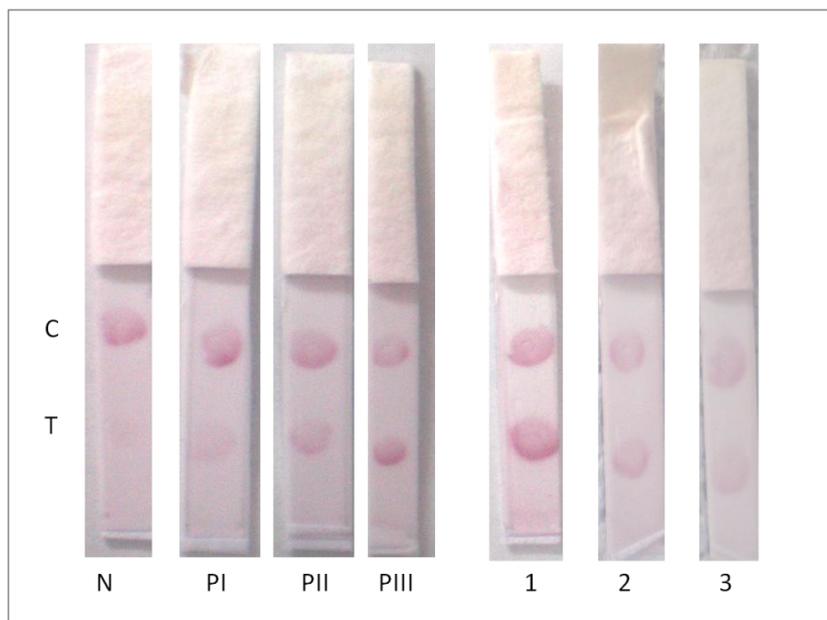


Figura 28 Evaluación de la reactividad de la dilución 1/8 del antígeno de *T.gondii* en la membrana inmunocromatográfica. Se observa un aumento de la señal en la zona de captura con los sueros controles negativo (N), positivos (PI, PII, PIII) y una muy buena intensidad con los sueros de pacientes (1,2,3). Línea Control (C) y Línea de captura (T)

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para el parásito de *T.gondii* se llevó a cabo la construcción del prototipo de la tira inmunocromatográfica para la detección simultánea de ambas patologías. Para la evaluación del funcionamiento de este prototipo desarrollado se analizaron 10 sueros positivos y negativos para ambas enfermedades (figura 29). Se observó que en los sueros negativos para ambas enfermedades sólo dio señal en la zona control, en cambio en aquellos sueros positivos para ambas enfermedades se observan las tres señales, tanto en la zona del test como la del control, lo cual nos indica el buen funcionamiento de las tiras. También se analizaron con sueros

con toxoplasmosis negativos para Chagas observándose una sola señal en la zona de captura correspondiente a dicha enfermedad y en la zona control. No pudimos realizar esta prueba solo con Chagas por no disponer de un suero positivo para dicha patología con título bajo para toxoplasmosis. Estos resultados fueron confirmados por confirmados por el método de ELISA tanto para Toxoplasmosis como para Chagas.

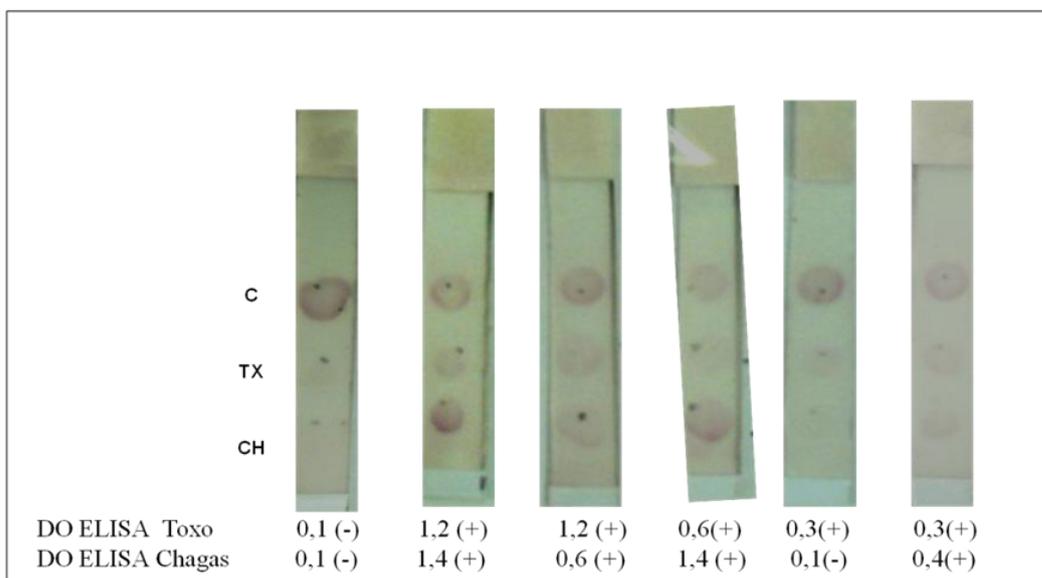


Figura 29 Evaluación del potencial diagnóstico del prototipo con sueros positivos (+) y negativos (-) para Toxoplasmosis y Chagas. Línea Control (C) y Línea de captura para toxoplasmosis (Tx) y Chagas (CH)

-DISCUSSION

El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de un producto nacional, robusto, de elevada sensibilidad y especificidad.

El diseño de un test inmunocromatográfico depende del tipo de analito que quiera ser detectado como antígeno o anticuerpo. La mayoría de los test se realiza en un solo paso y no más de 30 minutos de reacción y son muy útiles para el tamizaje serológico de enfermedades en puestos de salud, o incluso en el mismo consultorio (23-27,33, 36,39,43,46,50)

Las técnicas utilizadas para el tamizaje serológico de la enfermedad de Chagas, o para cualquier enfermedad, deben ser aquellas en las que, junto con su facilidad de ejecución, la sensibilidad prime sobre la especificidad, de manera que la reactividad obtenida pueda corroborarse mediante las técnicas confirmatorias. Estudios realizados por otros autores consideran que la sensibilidad de los test inmunocromatográficos disponibles para la enfermedad de Chagas debería mejorar para que puedan utilizarse como técnicas efectivas de tamizaje (6,7). Por otra parte diferentes trabajos realizados con test inmunocromatográficos comerciales que utilizan una mezcla de antígenos recombinantes, utilizados en diferentes regiones de países de Latinoamérica como Argentina, Brasil, Perú, Bolivia, Honduras y México, han demostrado una alta variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad, dependiendo de la región aplicada (63,64).

5.1. Diseño de una prueba inmunocromatográfica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En el presente estudio desarrollamos un prototipo de test inmunocromatográfico para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, el cual fue comparado con el método de ELISA convencional y con un test inmunocromatográfico comercial. La diferencia con

los otros test comerciales está en la utilización de antígeno crudo (fracción soluble de epimastigote de *T.cruzi*) en lugar de utilizar antígenos recombinantes. La mayoría de los métodos convencionales que utilizan antígeno crudo han demostrado tener una mayor sensibilidad en sacrificio de la especificidad, lo que les convierte en una prueba ideal para el tamizaje serológico (65,66, 67).

5.2. Construcción del prototipo de prueba inmunocromatográfica

El desarrollo del prototipo se realizó desde la elaboración del oro coloidal, la conjugación del oro coloidal con el anticuerpo hasta el ensamblaje de las tiras inmunocromatográficas y la estandarización del proceso de reacción. Se realizaron además pruebas para determinar el flujograma de reacción y las condiciones óptimas para el funcionamiento de la tira. A continuación, se discuten todos los pasos seguidos para la preparación de los reactivos y el montaje de las tiras.

5.2.1. Preparación y caracterización del oro coloidal

La preparación del oro coloidal se realizó por el método de reducción con citrato de sodio al 1%. Durante el proceso se observó el cambio de color del amarillo al rojo vino pasando por el negro y el lila tal como se describe en la bibliografía (35,35).

En la evaluación del oro coloidal por espectrofotometría se observó el pico máximo de absorbancia a 530 nm, el cual está dentro del rango mencionado por otros autores (34,35). El promedio del tamaño de las partículas de oro coloidal por microscopía electrónica confirmó el diámetro esperado de 20nm, teniendo en cuenta la concentración de citrato al 1% utilizada durante la reducción (31,34, 35).

5.2.2. Conjugación del anticuerpo con el oro coloidal

Para la elección del anticuerpo a conjugar, se comparó la reactividad de diferentes lotes IgG anti-humano de cabra purificada en el laboratorio utilizando el método de IDR. Se consideró el de mejor reacción aquel que precipitó a la mayor dilución (62,63 ,67).

Como paso fundamental para la conjugación del oro coloidal con el anticuerpo (IgG de cabra anti-humano) se tuvieron en cuenta las condiciones óptimas de pH del oro coloidal y concentración del anticuerpo, siguiendo el procedimiento indicado por otros autores (34,50). Realizando el test de floculación se determinó la concentración del anticuerpo (150 µg/mL) así como el pH óptimo de la solución del oro coloidal (7,5-8 siendo estable hasta pH 10) para la preparación del conjugado. Es importante destacar que los resultados obtenidos coinciden con lo observado por otros autores (35,50).

En la caracterización del conjugado, se evidenció un desplazamiento del pico de absorbancia en el conjugado, en nuestro caso concreto el pico de absorbancia se desplaza de 530 a 535 nm. Este cambio en el patrón de absorbancia es característico del proceso de conjugación y ha sido descrito por otros autores (27). Por otro lado, antes del proceso de conjugación se observó un pico de absorbancia a 280 nm debido a los residuos de tirosina y triptófano del anticuerpo. Después de la conjugación con el oro coloidal la intensidad de la absorbancia a 280nm disminuye debido a la formación de complejo anticuerpo-oro coloidal y a la reducción de la concentración de anticuerpo libre en solución (27,35).

El uso de anticuerpos conjugados con oro coloidal en las técnicas de diagnóstico rápido permite la detección de antígeno o anticuerpo en muestras biológicas. El objetivo principal es alcanzar la señal específica más intensa con una mínima o nula reacción inespecífica (43). La eficacia de nuestro conjugado preparado para la detección de IgG

humana se confirmó mediante la prueba de inmunodot, observándose una reacción específica tanto con el anticuerpo (IgG humana) purificado como con la IgG humana unida al antígeno (43).

5.2.3. Utilización del antígeno crudo extracto soluble.

No existen test comerciales para el diagnóstico confirmatorio de Chagas con 100% de sensibilidad, es por ello que el diagnóstico se realiza por medio de dos o tres métodos de diferentes fundamentos. Los test convencionales presentan una mayor sensibilidad con respecto a test no convencionales (34,35).

Debido a la complejidad de la interacción de *T.cruzi* con su hospedador, ningún antígeno recombinante por sí solo ha alcanzado la misma eficacia de los extractos totales en el inmunodiagnóstico de este protozoo (6,7, 9,63-66). Estas observaciones por varios autores nos motivaron a implementar la utilización de antígeno total en nuestra tira inmunocromatográfica. Es por esto que en este trabajo se utilizó extracto soluble del antígeno de *T.cruzi* de la cepa Épsilon (Y) en la zona de captura de la membrana con el fin de elevar la sensibilidad de la tira en el tamizaje serológico.

5.2.4. Montaje de las tiras inmunocromatográficas.

La elaboración de los componentes del prototipo desarrollado se llevo a cabo de acuerdo a lo descrito por otros autores (34, 35).

En el montaje de las tiras inmunocromatográficas nos encontramos con ciertas dificultades debido a que el sembrado, ensamblado y corte de la membrana se llevó a cabo de forma manual, ya que no contamos con los equipos necesarios para dicho proceso. La preparación de las tiras se realizó de manera similar a otros autores que trabajaron en las mismas condiciones (43,50).

Este sistema de trabajo plantea una serie de inconvenientes en cuanto a la uniformidad de las tiras, precisión en el sembrado y reproducción de los resultados. Durante esta tesis nos encontramos con problemas en el secado de la membrana debido a que no contamos con las condiciones adecuadas de control de humedad en el laboratorio.

5.3. Determinación del flujograma de reacción

Con el fin de determinar el flujograma óptimo de reacción se probaron dos posibles modalidades, la primera se realizó en un paso, como la mayoría de los test rápidos (23-27,33,35,36,39,43,46,50) y la segunda en dos pasos, incubando la tira primero con el suero y luego con el conjugado.

A pesar de que la prueba de movilidad funcionó con el conjugado solo, cuando se incubó de manera simultánea con el suero y el conjugado no se observó reacción tanto en la zona control como en la de captura. Debe tenerse en cuenta que el oro coloidal tiene poca o ninguna restricción en el flujo de las partículas a medida que pasa a través de la membrana sin embargo en los complejos más grandes, la movilidad puede estar restringida en función del tamaño de las partículas y la viscosidad de la muestra (54). Otra causa podría deberse a la proteína utilizada para el bloqueo de la membrana. La respuesta de las proteínas varía de acuerdo al tampón de bloqueo empleado, el cual es el responsable de la adsorción no específica del conjugado y el analito a la nitrocelulosa. Esta consideración es muy importante y se tendrá en cuenta para la realización de futuros experimentos utilizando otras proteínas en el tampón de bloqueo (54).

Otra explicación para la diferencia observada podría estar relacionada con la velocidad de migración de la membrana de nitrocelulosa, se ha demostrado que existe una correlación directa entre la velocidad de flujo y sensibilidad de la membrana (60). El flujo capilar es la velocidad a la que un material de muestra se mueve a lo largo de una

membrana en una tira de prueba de diagnóstico rápido o aplicación. Existe la posibilidad de utilizar membranas de alta velocidad de flujo para el ensayo, si la velocidad es fundamental, la muestra e flujo es abundante, y la sensibilidad no es una preocupación. En el otro extremo, el uso de membrana de flujo lento se recomienda para pruebas donde la velocidad es menos importante, la muestra es limitada, o se necesita alta sensibilidad (50,54). Para el desarrollo del prototipo se utilizó la membrana HF120 (Hi Flow 120 millipore-EEUU). Esta membrana fue elegida por tener una velocidad de flujo capilar moderada, lo cual está relacionado con una mayor sensibilidad. No obstante, se recomienda realizar pruebas con otras membranas de mayor velocidad de flujo y sensibilidad para optimizar la reacción, ya sea en uno o en dos pasos.

El flujograma elegido para el prototipo desarrollado fue el de dos pasos, en el cual se pudo obtener una buena reacción en menos de 30 min. Según estudios previos, este sistema en dos pasos mejora sensibilidad cuando el reactivo marcado no interfiere en la reacción antígeno- anticuerpo en las zonas de detección (68). Una ventaja adicional del sistema de dos pasos es que el conjugado anti IgG humano-oro coloidal se une solo IgG humana unida al antígeno de la zona de captura, lo que facilitaría la detección de más anticuerpos unidos a otros antígenos sobre la membrana, permitiendo detectar dos o más enfermedades a la vez (68).

5.4. Evaluación del prototipo desarrollado

Una vez confirmada la efectividad del sistema en dos pasos, se optimizaron las cantidades y volúmenes de los reactivos, así como los tiempos de reacción con el suero y el conjugado. El prototipo diseñado nos permitió detectar IgG anti-*T.cruzi* en sueros humanos diluidos (1/25-1/400) dando la mejor señal a la dilución 1/50.

Las tiras preparadas se compararon con el método de ELISA convencional, obteniéndose una sensibilidad del 97% y especificidad 95%. Estos resultados demuestran que el prototipo desarrollado tiene muy buena sensibilidad con muestras de zona endémica, lo cual nos permitiría competir con los tests ya existentes en el mercado (6, 23, 63-65,69,70).

La sensibilidad y especificidad de los distintos modelos de tiras inmunocromatográficas varían dependiendo de la región en la que se utiliza. Se evaluó Chagas Stat-Pak (Chembio Diagnostic Systems, Medford, NY), en muestras procedentes de Bolivia y Perú. Las muestras positivas se confirmaron por tres ensayos y las muestras negativas por dos o más ensayos. En las muestras de Bolivia STAT-PAK se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 87,5% y 100%, respectivamente. Sin embargo, la sensibilidad en muestras peruanas fue mucho menor: 26,6%, con una especificidad del 98%. La baja sensibilidad en el Perú puede estar relacionada con diferencias en las cepas circulantes del parásito. Por tal motivo, es recomendable evaluar las pruebas rápidas en el campo en cada sitio geográfico antes de la aplicación generalizada para el tamizaje en cada región. Esto mismo se debe tener en cuenta en países que reciben a emigrantes de diferentes zona endémicas para la enfermedad de Chagas (7,64).

En la presente tesis se comparó el prototipo desarrollado con el test comercial *SD Bioline Chagas Ab Rapid*. Dicho test ha sido comparado con otros test comerciales utilizados en la región como: *Chagas Stat-Pak Assay* (Chembio Diagnostic Systems, USA), *OnSite Chagas Ab Rapid test-Cassette* (CTK Biotech, USA), and *Trypanosoma Detect Rapid Test* (InBios International, EEUU) utilizando muestras del Laboratorio Nacional de Referencia de Chagas y Leishmania de Honduras. Se obtuvieron resultados de sensibilidad y especificidad de 99,3% y 100%, respectivamente, en SD BIOLINE y Chembio kits, 97,2% y 100% para InBios kit, y 97,9% y 98,8% para CTK kit. Es

importante aclarar que todos estos test utilizan antígenos recombinantes , estos datos de sensibilidad y especificidad son relativos ya que dependen de cada región (64,71).

En la comparación de nuestro de prototipo con el *SD Bioline Chagas Ab Rapicon* se observó una buena concordancia con un índice kappa de 0,89, sensibilidad y especificidad del 97% y 91% respectivamente. Esto sugiere que el potencial diagnóstico del prototipo desarrollado en nuestro laboratorio puede ser comparable con el de otros test ya existentes en el mercado y que aún podría ser mejorado ya que se encuentra en la etapa de experimentación.

5.5. Efectividad del prototipo desarrollado para la detección de infecciones múltiples

La enfermedad de Chagas es una infección exclusiva del continente Americano y frecuente en Latinoamérica, la toxoplasmosis es una zoonosis de amplia distribución mundial. Actualmente, la toxoplasmosis y la enfermedad de Chagas son dos patologías que a pesar de requerir la presencia de factores específicos de riesgo, no tienen distinción entre sexo, edad y/o condición social. Un grupo especialmente susceptible es el de las embarazadas, debido a que estas infecciones no solamente las afectan a ellas, sino que pueden tener repercusión sobre sus hijos cuando ocurre la transmisión transplacentaria. La educación orientada a las mujeres en edad fértil así como la evaluación de factores de riesgo, en consulta preconcepcional y durante el embarazo, puede evitar la adquisición y transmisión congénita de toxoplasmosis y enfermedad de Chagas. La detección estas enfermedades durante el embarazo, mediante la realización de pruebas serológicas a todas las embarazadas desde el primer trimestre que acuden al control prenatal, realizando la serología y complementado con entrevistas epidemiológicas, podría descubrir exposición al riesgo para toxoplasmosis y enfermedad de Chagas. (71)

En este trabajo se presenta el diseño y uso de un test inmunocromatográfico capaz de detectar y distinguir entre *T.cruzi* (Chagas) y *T.gondii* (Toxoplasmosis) en muestras diluida 50 veces, utilizando, en ambos casos, extracto soluble del antígeno total. En contraste con otros test inmunocromatográficos comerciales actualmente disponibles, que detectan un parásito a la vez, este prototipo presenta un gran ventaja teniendo en cuenta el costo y tiempo empleado para el diagnóstico de las dos enfermedades en los centro de salud y en zonas rurales de difícil acceso, siendo principalmente de importancia en el control prenatal de la mujer embarazada. (64,71-76).

En la prueba preliminar realizada con tiras sensibilizadas con antígeno de *T.cruzi* y *T.gondii* se pudo observar señal con sueros positivos para una o ambas patologías y no se observó señal con sueros negativos para ambas enfermedades. Este sistema podría ser mejorado y optimizado, ofreciendo así la posibilidad de detectar varias enfermedades en forma simultánea, lo cual sería de gran importancia para salud pública.

5.6. Perspectivas

Fase 2

- Adquirir los equipos básicos para el sembrado y corte de las membranas de nitrocelulosa a fin de estandarizar la fabricación de las tiras inmunocromatográficas
- Ajustar la metodología empleada. El prototipo desarrollado es robusto pero aún puede ser mejorado ya que se encuentra en la etapa de experimentación.
- Estandarizar las condiciones para la detección simultánea de dos o más patologías de importancia en salud pública. En ese sentido, el sistema de dos pasos podría ser útil para la inclusión de dos enfermedades en una misma reacción, pero aún necesitan más pruebas para poner a punto esta prueba.

Fase 3

- Realizar pruebas en zonas endémicas una vez que el prototipo finalice la fase 2

Fase 4

- Proceder a la industrialización del prototipo y ser competitivos en el mercado nacional.

6-CONCLUSIONES

El prototipo desarrollado presentó una muy buena concordancia con respecto al método de ELISA convencional. Se observó además una sensibilidad y especificidad superior al 95%.

Comparado con el test inmunocromatográfico comercial (antígeno recombinante) presentó una alta concordancia.

La estabilidad del prototipo desarrollado es aceptable por más de 6 meses en las condiciones de conservación utilizadas en el laboratorio.

El prototipo desarrollado detecta de manera simultánea la enfermedad de Chagas y toxoplasmosis.

Es necesario seguir realizando pruebas de ajustes para ambos sistemas antes de pasar a la fase 3 del desarrollo del test inmunocromatográfico.

7-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- Wendel S, Z Brener, Camargo, ME *Aspectos históricos*. Brasil. 1992. Disponible en: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>
- 2- World Health Organization. Reducing risks, promoting healthy life: The World Health Report 2000. World Health Organization, Geneva, 2000.
- 3- Ramsey JM., Ordóñez R, Tello López A., Pohls JL, Sánchez V., Peterson AT. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas. Archivado del original 2003; 15-15-15
- 4- Vallejo MA, Reyes PA. Tripanosomiasis Americana. ¿Un problema sociomédico en México? Archivos del Instituto de Cardiología de México 1996; 66:95-97.
- 5- Zavala J T; et al. Unidad IV. Protozoosis transmitidas por artrópodos Capítulo 10: Tripanosomiasis. Parasitología médica. Séptima Edición. México 2002; 130-151.
- 6- López Chejade P, Roca C, Posada E, Pinazo MJ, Gascon J, Portús M. Utilidad de un test inmunocromatográfico para el cribado de la enfermedad de Chagas en asistencia primaria. Enferm Infecc microbiol clin 2010; 28 (3):169-71
- 7- Flores-Chávez M, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;10: 1016
- 8- Moore A C.; Cetron M S. Travel and Tropical Medicine Manual. En Manual de medicina tropical y del viajero 4a ed. Estados Unidos: Saunders/Elsevier 2008 . Cap 25
- 9- Lorca M, Contreras M, Salinas P, Guerra A, Raychaudhuri S Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en suero. Parasitol. latinoam, 2008; 63(1/4):29-33.

- 10- Karsten V, Davis C, Kuhn R. *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons and opossums in North Carolina. *J Parasitol.* 1992; 78(3):547-9.
- 11-Organizacion Panamericana de la Salud. Guía de Evaluación de los procesos de control 67 de triatominos y del control de la transmisión transfusional de *T. cruzi*. Ed. OPS/HCPHCT/196/02, Montevideo, Uruguay, 2002.
- 12-Russomando G. Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en el Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 2009; 7(2)55-64
- 13- David T J.; Petri. W, Markell A. *Parasitología Médica de la Voge.* 9^a ed. (San Luis): Saunders Elsevier, 2006.
- 14-Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2^a edición.(Brasil): Editorial; Guanabara Koogan.2000.
- 15-Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M.Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages .*Int.J.Parasitol.*2001;(31): 1218-1226.
- 16-Yeo M, Acosta N,Llewellyn M,Sánchez H,adamson S,Miles GA,López E , González N, Petterson JS,Gaunt MW,Rojas de Arias A, Miles MA. Origins of Chagas disease:Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II including hybrids.*Int.J Parasitol.*2005;(35):225-233.
- 17-Del Puerto F, Sánchez Z, Nara E, Meza G, Paredes B, Ferreira E, Russomando G. *Trypanosoma cruzi* Linages Detected in Congenitally Infected and Triatoma Infestans from the Same Disease-Endémic Región under Entomológico Surveillance in Paraguay .*Am J Trop.Med Hyg.*2010;82 (3): 386-390.

- 18- Vega Chirino S, Náquira C. Velarde, Laboratorio de Leishmaniosis y Chagas Centro Nacional de Salud Pública-Ins. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de la Trypanosomiosis Americana (enfermedad de chagas). Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual_Enfermedades_Chagas.pdf
19. Quiroz A. Tumor-like lesion of the brain caused by *T. cruzi*. *Am J Trop Hyg* 1973; 22: 473-476.
20. Elder GA, Sever JL. Neurologic disorders associated with AIDS retroviral infection. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 286-302.
- 21-Basso B., Moretti E. El laboratorio en el diagnóstico de la infección chagásica disponible en: <http://enfermedadchagas.com.ar/labdiag.pdf>
- 22-Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Informe Técnico No. 905 1-109, Ginebra; 2002
- 23-Jelinek, T, Eichenlaub S., Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18(9) 669–670, 1999.
- 24- Engler, K.H., Efstratiou A., Norn D., Kozlov R.S., Selga I., Glushkevich T.G., Tam M., Melnikov V.G., Mazurova I.K. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol*. 4(1) 80-3, 2002.
- 25-Barfield CA, Barney RS, Crudder CH, Wilmoth JL, Stevens DS, Mora-Garcia S, Yanovsky MJ, Weigl BH, Yanovsky J. A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagas disease that utilizes a recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen 58(3):814- Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21342808>

- 26- Winsnes R, Mogster B. The identification of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines by simple radial and double immunodiffusion techniques. *J Biol Stand* 1985; 13: 34.
- 27- Galván JA, Sorell L. Estudio de la enfermedad celíaca mediante el desarrollo de un ensayo inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa.(disertación); Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Departamento de Inmunotecnología y Array Habana, Cuba; 2011 (N.del T.:En español: Tesis)
- 28- Imrich, M.R, J.K. Zeis, S.P. Miller, A.D. Pronovost. Lateral flow medical diagnostic assay device. U.S. Patent: 5,415,994. May 1995
- 29- Kang, J., B. Youn, Y.H. Oh.. Immunoassay devices and materials. U.S. Patent: 5,559,041. September 1996
- 30- May, K, M.E. Prior, I. Richards. Immunoassays and devices therefore. International Patent: WO 88/08534. November 1988
- 31- Rosenstein, R.W. July 1988. Solid phase assay. European Patent: EP 0 284 232.
- 32- Charles, M., J W.. Tuberculosis and HIV: implications in the developing world. *Curr. HIV/AIDS* 2006 **3**: 139–144.
- 33- Corstjens P. A.M., Chen Z, Zuiderwijk M, Haim h. b, et al . Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB) N.Y. (2007). *Acad. Sci.* 1098: 437–445
- 34- Sommer, R.G. Quantitative detection of analytes on immunochromatographic strips. U.S. Patent:5,569,608. October 1996.
- 35- Allen, et al. Electronic assay device and method. U.S. Patent: 5,837,546. November 1998

- 36-Ponce, C. Prioridades y tendencias en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Taller nacional de vigilancia Epidemiológica ,prevención y control de la enfermedad de Chagas. Secretaría de Salud de Honduras Disponible:<http://www.mex.ops-oms.org/documentos/publicaciones/chagas/parte2.pdf>.
- 37-Valero N, Montiel M, Arias J, *et al*. Comparación entre los métodos de inmunocromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico del dengue. *Kasmera*. 2006; 34(1):53-60.
- 38-Chenggang S, *et al*. Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue. *J of Env Scien* 2008; 20:1392–1397
- 39-Peng D SHu,*et al*. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays .*Vet Immunol Immunopathol* 2007;117(1-2):17-25
- 40-Montoya A, Menco J, Osorio N, Zuluaga MA, Duque J, Torres G, Restrepo M. Concordancia entre gota gruesa, inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria Diagnóstico de malaria con OptiMAL® y PCR. *Biomédica* 2008;28:252-61
- 41-Soyseng V, Mille RS, *et al*. Field evaluation of the ICT Malaria Pf/Pv immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66 :379-83.
- 42-Martinez-Vega, R A. *et al*. Evaluación de la utilidad de la prueba rápida de casete por inmunocromatografía para el diagnóstico de dengue en una región endémica colombiana. *Biomédica*. 2009, 29(4):616-624

- 43-Lyoo Y.S, Kleiboeker S.B., Jang K.Y, Shin N.K., Kang J.M, Kim C.H, Lee S.et al. A simple and rapid chromatographic strip test for detection of antibody to porcine reproductive and respiratory. *Diagn Vet J Invest.* 2005; 5(5):469-473
- 44- Engler KH, Efstratiou A, Norn D, Koslov RS, Selga I, Glushkevich TG, et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *J Clin Microbiol* 2002; 4(1): 80-3
- 45-Valero N, Montiel M, Arias J, *et al.* Comparación entre los métodos de inmunocromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico del dengue. *Kasmera.* 2006; 34(1):53-60.
- 46-Sánchez Moreno, D M; Carrenon Napoles, R, Palacios Arriaga, J M. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. *Vet. Méx.* 2010;41 (1):45-58.
- 47-Escalante H, Benites S, Castañeda A, Huamanchay O, Davelois K, et al. Estandarización y validación de la Inmunocromatografía para el diagnóstico de la taeniosis a través de la detección de coproantígenos. *Rev Med Exp* 2001; 18 (3-4):57-62
- 48-Exposito de G, Borges de F, M, Trejo, E. Evaluación del Test Rápido Ontrak Teststik para detectar Cocaína y Marihuana en muestras de Orina. 2001;24 (2):157-162.
- 49-Jenkins A, Mills L, Darwin W, Huestis M, Cone E y Mitchell J. Validity Testing of the EZ-SCREEN® Cannabinoid Test. *Journal of Analytical Toxicology.* 1993; 17: 292-298

50-Chuanlai Xu, Huting Wang, Chifang P, Zhengyu J, Liqiang L. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20:1390-1934

51-Fontenla S., Moretti E., Basso B. y González G. Estudio de la confiabilidad de dos técnicas para el inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Acta Bioq. Clin. Latinoamer* 1988. 18:427-436.

52-Girones N, Rodriguez CL, Basso B, Bellon JM, Resino S, Muñoz-Fernandez MA, Gea S, Moretti E, Fresno M. Antibodies to an epitope from the cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin Diagnosis Lab. Immunol.* . 2001; 8: 1039 – 1043

53-Grabar, K.C., Freeman, R.G., Hommer, M.B., et al, 1995. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal. Chem.* 67,735–743

54-Mikawa YA, Santos S, et al. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno core do vírus da hepatite C. *J. Virol Methods* 2009;158 (1-2):160-4

55-Lowry NY, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Medición de la proteína con el fenol reactivo Folin. *Biol. Chem* 1951,193(1):265 – 275

56-Kaspar P, Velázquez G, Monzón I, Meza T, Vera ME, Pozzoli L, Guillén I, Merlo R, Samudio M, Cabral M, Ferro E, Rodríguez A. Un nuevo kit para la detección de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma cruzi*. *Enfermedad de Chagas en el Paraguay, Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), n°15 EFACUM-JICA-Asunción, Paraguay, 1990.*

- 57- Beesley J. Colloidal Gold. A new perspective for cytochemical marking: Royal Microscopical Society Handbook No 17. Oxford Science Publications. Oxford University Press. 1989
- 58-Dykman LA, Bogatyrev VA. Use of the dot-immunogold assay for the rapid diagnosis of acute enteric infections. *Immunology and Medical Microbiology* 2000; 27:135-137.
- 59-Gershoni J M and Palade G E. Protein blotting: principles and applications, *Anal Biochem* 1983; 131: 1–15
- 60-Millipore. A Short Guide for developing immunochromatographic test strips. 2da ed. USA. 1999
- 61-Hermanson G T. Bioconjugate Technique, 1st edn. Academic Press: San Diego, CA, 1996; 148-159
- 62-Oliver C. Conjugation of colloidal gold to protein. *Methods in Molecular Biology* 1999; 115: 331-334
63. Chippaux, J. P., J. A. Santalla, J. R. Postigo, M. Romero, N. A. Salas Clavijo, D. Schneider, and L. Brutus.. Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak(R) test in Bolivia. *Trop. Med. Int. Health*, 2009; 14:732-735. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916554/pdf/0774-10.pdf>
- 64- Verani, J. R., Seitz A., Gilman R. H., LaFuente C., Galdos-Cardenas G, Kawai, V. de La Fuente E., Ferrufino L., Bowman N. M., et al. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2009. 80:410-415. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270291>
- 65-Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, Añez N, Zingales B, Ramgel-Aldao R, et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins

of *Trypanosoma cruzi* Source Instituto de Patologia e Saúde Pública, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiania, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003Aug;46(4):265-71. Disponible en:

http://www.researchgate.net/publication/10593155_Chagas%27_disease_diagnosis_a_multicentric_evaluation_of_Chagas_Stat-pak_a_rapid_immunochromatographic_assay_with_recombinant_proteins_of_Trypanosoma_cruzi

66-Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES, 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoman rangeli* and *Leishmania spp.* *Clin Vaccine Immunol* 14: 1045–1049. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522327>

67-Velazquez GR, Velazquez G, Guillén I, Rodriguez A, Pozzoli L, Meza T, Acosta N, Oddone R, Calabró M, Ferro E. Producción de Anticuerpos Policlonales. *Annual Reports* 1998;35-41

68- Rundstrom G, Matsson P, Christopher P. Two step lateral flow assay methods and devices. Unites State Patente US20110076691. Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/y2011/0076691.htm>

69- Sosa-Estani S, Gamboa-León MR, Del Cid-Lemus J, Alhabe F, Alger J, et al. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2008;79: 755–759.

70-Reithinger R, Grijalva MJ, Chiriboga RF, de Noya BA, Torres JR, et al. Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* in human serum by use of an immunochromatographic dipstick test. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3003–3007 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916568/pdf/2474-09.pdf>

71-Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS. Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab Rapid kit Korean *J Lab Med.* 2009 Feb;29(1):48-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262078>

- 72- Alarcon de Noya, Belkisyolé et al. Despistaje de toxoplasmosis y enfermedad de Chagas en la Consulta Prenatal del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Obstet Ginecol Venez* .2010, vol.70, n.2, pp. 75-81. ISSN 0048-7732. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0048-77322010000200002&script=sci_abstract
- 73- Ching K. H, Lin A, McGarvey J A., Stanker L H, Hnasko R. Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip *Journal of Immunological Methods* 380 (2012) 23–29. Disponible en: http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=00221759&issue=v380i1-2&article=23_rasdobwasits
- 74- Hubscher T, Ford.G, Ruppenthal T. Method for the visual detection of specific antibodies in human serum by the use of lateral flow assays. Unites State Patente US2002/0045195 disponible en : <http://www.google.com/patents/US20020045195>
- 75- Mosallanejad B, Avizeh R, Razi Jalali MH, Hamidinejat H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Wild Rats (*Rattus rattus*) in Ahvaz District, Southwestern Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2012; **5**(1): 332-5. Disponible en: http://jjmicrobiol.com/?page=article&article_id=2373&mode=abstract
- 76- Subasinghe SDLP, Karunaweera ND, Kaluarachchi A, Abayaweera, CA Gunatilake, J Ranawaka MH, Jayasundara DMCS, Gunawardena GSA .*Toxoplasma gondii* seroprevalence among two selected groups of pregnant women Sri Lankan *Journal of Infectious Diseases* 2011; Vol.1(1):9-17. Disponible en: <http://www.sljol.info/index.php/SLJID/article/view/3091>