

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTIN DE AREQUIPA
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA DE CAPTURA PARA
LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Tripanosoma cruzi* EN MUESTRAS
DE ORINA Y SUERO DE *Cavia porcellus* INFECTADO
EXPERIMENTALMENTE”**

Tesis presentada por la Bachiller
CINTHYA JEYMI LOVON LUQUE
Para optar el Grado Académico de
Maestro en Ciencias con mención en
Biología de la Salud

Asesor:
Mg. Ronald Navarro Oviedo

AREQUIPA – PERU

2018

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Henry Juan Díaz Murillo
Presidente

Dr. Luis Alberto Ponce Soto
Secretario

Mg. Ronald Navarro Oviedo
Miembro

FECHA DE SUSTENTACIÓN:

24-01-2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, CINTHYA JEYMI LOVON LUQUE, identificada con DNI 42012737, Bachiller en Ciencias Biológicas y licenciada en biología, declaro que soy la única autora de la tesis titulada: “Estandarización de la prueba de ELISA de captura para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente”, para optar el grado académico de Magíster en Ciencias con mención en Biología de la salud.

Cinthy Jeymi Lovon Luque

CONSTANCIA

El que suscribe Mg. Ronald Navarro Oviedo, docente de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, manifiesta ser asesor de la Tesis titulada: “Estandarización de la prueba de ELISA de captura para la detección de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente” perteneciente a la Bióloga Cinthya Jeymi Lovon Luque, para optar el grado académico de Magíster en Ciencias con mención en Biología de la Salud, ha procedido a la revisión de la Tesis mencionada, encontrándola satisfactoria por lo que doy el aval correspondiente para la SUSTENTACIÓN respectiva.

Mg. Ronald Navarro Oviedo

AGRADECIMIENTOS

A mi mentora y asesora externa, la Dra. Ada del Carpio Sanz, quien con su apoyo y confianza en mi trabajo, me guió e impulsó hasta alcanzar los objetivos de la presente tesis.

A mi asesor, el Mg. Ronald Navarro Oviedo por la ayuda y orientación que me brindó, sobre todo en la redacción de la tesis.

A los doctores: Robert H. Gilman, Manuela Verástegui, Maritza Calderon y Holger Mayta, investigadores del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Cayetano Heredia, por sus consejos y colaboración activa durante mi estancia en el laboratorio.

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

A mis amigos Jessy, Noelia, Alessandra, Danitza, Leny y Roger, quienes fueron un soporte emocional y profesional durante los días de trabajo en el laboratorio hasta alcanzar los objetivos trazados.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino y que de una u otra manera colaboraron con el presente trabajo.

DEDICATORIA

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

A mi mamá María quien con su cariño, cuidados y esmero me permitió el tiempo
necesario para realizar este trabajo y a mi papá Wilfredo quien es mi ejemplo de trabajo
arduo para lograr lo que uno desea.

A mis hermanitas Giannina y Leyla quienes son mis grandes amigas.

A mi querido esposo Alberto por su amor y apoyo incondicional que me impulsa a no
quedarme atrás y seguir siempre adelante.

A mi hijita Alba, quien todavía es pequeña pero pronto entenderá que los días que no
estuve con ella fueron para lograr un mejor bienestar para ella y mi familia.

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
MARCO TEÓRICO	3
1. Generalidades de la enfermedad de chagas	3
2. Mecanismos de transmisión de <i>T. cruzi</i>	3
2.1 Transmisión vectorial:	3
2.2 Transmisión por transfusión sanguínea	4
2.3 Transmisión congénita o vertical (de madre a hijo)	4
2.4 Transmisión oral.	4
3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	5
4. Fisiopatología	7
4.1 Fase aguda	7
4.2 Fase crónica	9
5. Características antigénicas de <i>T. cruzi</i>	10
6. Diagnóstico	11
a) Diagnóstico parasitológico	11
b) Diagnóstico serológico	11
7. Anticuerpos policlonales para el diagnóstico de la enfermedad de chagas	12
7.1 Anticuerpos de <i>V. pacos</i> (alpaca)	12

7.2 Anticuerpos de <i>Gallus gallus domesticus</i> (gallina) y <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo)	15
8. Tratamiento de la enfermedad de chagas	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
HIPÓTESIS	18
MATERIAL Y METODOS	19
1. Material biológico	19
2. Obtención de parásitos <i>T. cruzi</i>	19
3. Reactivos	20
4. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales IgG e IgY	21
4.1 Producción y recolección de antígenos de <i>T. cruzi</i>	21
a) TESA	21
b) Antígeno recombinante 1F8	22
c) Antígeno lisado total de tripomastigotes (TLA)	23
d) Antígeno Proteína de membrana: Obtención con Triton X-114	23
4.2 Inmunización de <i>Vicugna pacos</i> (alpaca), <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) y <i>Gallus gallus domesticus</i> (gallina)	24
4.3. Obtención de anticuerpos a partir de sueros de <i>Vicugna pacos</i> (alpaca) y de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) inmunizados con antígenos de <i>T. cruzi</i> .	25

4.4. Obtención de anticuerpos a partir de yemas de huevos de <i>Gallus gallus domesticus</i> inmunizados	26
4.5. Purificación de anticuerpos IgG e IgY por cromatografía de afinidad	27
a) Purificación de anticuerpos Ig G de <i>Vicugna pacos</i>	27
b) Purificación de anticuerpos IgG de <i>Oryctolagus cuniculus</i>	28
c) Purificación de anticuerpos IgY de yemas de huevos de <i>Gallus gallus domesticus</i>	29
5. Medición de proteínas en los extractos purificados (Método de Bradford)	29
6. Electroforesis SDS-PAGE de los anticuerpos purificados IgG e IgY	30
7. Western blot	30
8. Prueba de ELISA tipo sandwich para la detección de antígenos de <i>T. cruzi</i> en orina y suero, empleando anticuerpos policlonales	31
9. Infección experimental de especímenes de <i>Cavia porcellus</i> (cuyes)	33
10. Obtención de muestras de orina y suero de <i>Cavia porcellus</i>	34
11. Técnica para la detección de parásitos en sangre	35
12. Prueba de ELISA indirecto para la detección de IgG contra <i>T. cruzi</i> en sueros de cuyes infectados	36
13. Western blot para la detección de IgG e IgM contra <i>T. cruzi</i>	37
14. Concentración de muestras de orina de <i>Cavia porcellus</i> antes de la prueba de ELISA de captura tipo sandwich	37
a) Precipitación con etanol	37
b) Liofilización	37
c) Concentración con minicon B-15	38

15. Tratamiento para los sueros antes de la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.	38
16. Límite de detección:	38
17. Análisis estadístico	39
RESULTADOS	40
1. Obtención y purificación de anticuerpos IgG e IgY mediante cromatografía de afinidad	40
a) Determinación de la concentración de proteínas de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad	40
b) Electroforesis de proteínas.	42
2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos policlonales (IgG e IgY)	44
3. Selección de anticuerpos policlonales para estandarizar la prueba de ELISA de captura tipo sandwich	47
4. Determinación del límite de detección de antígenos TESA de <i>T. cruzi</i> por ELISA sandwich	49
5. Detección de parásitos de <i>T. cruzi</i> en sangre de cuyes infectados	50
6. Detección de IgG contra <i>T. cruzi</i> en sueros de cuyes infectados mediante prueba de ELISA indirecto	50
7. Detección de anticuerpos IgM e IgG mediante análisis por Western-Blot durante el curso de la infección experimental de <i>Cavia porcellus</i> con <i>T. cruzi</i>	52
8. Cinética de la detección de antígenos de <i>T. cruzi</i> por ELISA de captura	54

tipo sandwich en orinas de <i>Cavia porcellus</i> infectado experimentalmente.	
a) En orinas concentradas por precipitación con etanol	54
b) En orinas concentradas por liofilización	55
c) En orinas concentradas con el kit Minicom B-15	56
9. Cinética de la detección de antígenos de <i>T. cruzi</i> por ELISA de captura tipo sandwich en sueros de <i>Cavia porcellus</i> infectado experimentalmente.	58
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	71
FINANCIAMIENTO	71
BIBLIOGRAFÍA	72

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Matriz de doble entrada con las posibles combinaciones de anticuerpos policlonales purificados, empleados para estandarizar la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.	31
Tabla N° 2: Condiciones óptimas para la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.	47
Tabla N° 3 Resultados obtenidos de la captura de antígenos en la orina de <i>Cavia porcellus</i> contaminada artificialmente con antígeno TESA más antígeno lisado de tripomastigotes (O+) y orina de cuy negativo a chagas (O-), obtenidos mediante la prueba de ELISA tipo sandwich empleando anticuerpos policlonales de <i>Gallus gallus domesticus</i> (gallina) y <i>Vicugna pacos</i> (alpaca).	47

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> (Fuente: Bern, 2011. Terapia Antitripanosomal para la Enfermedad de Chagas Crónica. Revista la Nueva Inglaterra de medicina).	7
Figura N° 2: Representación estructural de la inmunoglobulina G convencional IgG1 (A) y las inmunoglobulinas de cadenas pesadas IgG2 (B) e IgG3 (C) de los camélidos Fuente: (Wernery, 2001)	14
Figura N° 3: Estructura molecular de Ig G de conejo y de Ig Y de gallina V=dominio variable de la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH); C= Dominio constante de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH); HR=Región bisagra. Los puntos blancos simbolizan las cadenas de carbohidratos. Fuente Shimizu et al., 1991	16
Figura N° 4: Flujograma general de las inmunizaciones de <i>Vicugna pacos</i> (alpaca), de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) y de <i>Gallus gallus domesticus</i> (gallina)	24
Figura N° 5: Perfil de elución de IgG e IgY de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad respectivamente A. Fracciones de <i>Vicugna pacos</i> (alpaca) B. Fraciones de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo) y C. <i>Gallus gallus domesticus</i> (gallina)	41
Figura N° 6: Perfil electroforético que muestra el grado de pureza de IgG e IgY. A) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa); línea 2: IgG de	42

Vicugna pacos; B) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa), línea 2: IgG de *Oryctolagus cuniculus* C) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa), Línea 2: IgY de *Gallus gallus domesticus*. SDS-PAGE al 12%.

Figura N° 7: Detección de antígenos mediante prueba de Western blot 44
utilizando anticuerpos IgG purificados de *Vicugna pacos* (alpaca).

Figura N° 8: Detección de antígenos mediante prueba de Western blot 45
utilizando anticuerpos IgG purificados de *Oryctolagus cuniculus* (conejo).

Figura N° 9: Detección de antígenos: TESA, proteína de membrana y 46
1F8 mediante prueba de Western blot utilizando anticuerpos IgY purificados de *Gallus gallus domesticus* (gallina)

Figura N° 10: Límite de detección de antígeno TESA en muestras de 48
orinas de *Cavia porcellus* contaminadas con el antígeno.

Figura N° 11: Detección de parasitemia en cuyes infectados con *T. cruzi*, 49
usando la técnica de microhematocrito.

Figura N° 12: Detección IgG anti *T. cruzi*, en sueros de especímenes de 50
Cavia porcellus (cuyes) infectados y no infectados con *T. cruzi*, mediante prueba de ELISA indirecta.

Figura N° 13: Detección de anticuerpo IgM (A) y anticuerpo IgG (B) 52
mediante el análisis de TESA Blot durante la infección experimental de *Cavia porcellus* con *T. cruzi*. Las tiras del 1 al 6 corresponden a *cavia porcellus* infectado con *t. cruzi* y la tira 7 corresponde a *cavia porcellus* sano sin chagas. Además los controles positivos son: IgM+ corresponde a suero humano positivo a chagas agudo e IgG+ corresponde a suero

humano positivo a chagas crónico. Los controles negativos son: IgM- e IgG- corresponden a sueros humanos negativos a chagas.

Figura N° 14: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en 54
muestras de orinas pretratadas con etanol.

Figura N° 15: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en 55
muestras de orinas liofilizadas.

Figura N° 16: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en 56
muestras de orinas concentradas con el kit minicon B15.

Figura N° 17: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en suero 57
pretratado con calor.

ABREVIATURAS

Ab:	Anticuerpo
BSA:	Albúmina de Suero Bovino
Cepa “Y”:	Cepa estándar de Brasil
DO:	Densidad óptica
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima, por sus siglas en inglés enzyme linked immunosorbent assay
IgG:	Inmunoglobulina tipo G
IgY:	Inmunoglobulina aviar
KDa:	Kilodanton (s)
LLC-MK2:	Línea celular de riñón de mono
OPD:	orto-fenilendiamina
PBS:	Buffer de fosfato salino mezcla $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2HPO_4
PBST:	PBS + Tween
PM:	Antígeno proteína de membrana
RPMI 1640:	Medio de cultivo que contiene sales inorgánicas, aminoácidos, y vitaminas Producto R8755, SIGMA-ALDRICH

SDS-PAGE:	Gel de poliacrilamida
SBF:	Suero fetal bovino
TESA:	Antígeno excretorio-secretorio de tripomastigotes (siglas en inglés).
TLA:	Antígeno lisado total de tripomastigotes
TESA blot:	Prueba inmunológica empleada para la detección de anticuerpos generados en respuesta a antígenos de <i>T. cruzi</i> .
WB:	Ensayo de Western Blot
1F8:	Antígeno recombinante flagelar de <i>T. cruzi</i>

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la estandarización de ELISA de captura para la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orina y suero de especímenes de *Cavia porcellus* (cuyes) infectados experimentalmente, empleando anticuerpos policlonales obtenidos de tres especies que fueron inmunizados con antígenos de *T. cruzi*. Se seleccionó la dupla de anticuerpos: IgY anti proteína de membrana de *Gallus gallus domesticus* (gallina) como anticuerpo de captura (4 µg/ml) e IgG anti TESA de *Vicugna pacos* (alpaca) como anticuerpo de detección (4 µg/ml), purificados por cromatografía de afinidad. Además, se utilizó el conjugado antillama a una dilución de 1/7500, buffer de bloqueo compuesto por PBST más leche semidescremada al 6% y BSA 1%, y el sustrato fue orto-fenilendiamina. El límite de detección del antígeno TESA en muestra de orina contaminada artificialmente fue de 4 ng. Los niveles de antigenuria estuvieron relacionados positivamente con niveles altos de parasitemia. Los métodos empleados para la concentración de orinas no muestran diferencias significativas en la cinética de detección de antígenos de *T. cruzi* mediante ELISA. En cuanto a la cinética de detección de antígenos en suero se obtuvo diferencias significativas entre las muestras de sueros de cuyes (*Cavia porcellus*) infectados y sanos. Los resultados demuestran que este ensayo es importante y puede ser usado como herramienta para el diagnóstico de *T. cruzi* en humanos.

Palabras clave: *T. cruzi*, ELISA, *Cavia porcellus*, anticuerpos policlonales IgG, IgY.

ABSTRACT

In the present work we describe the standardization of capture ELISA for the detection of *T. cruzi* antigens in urine and serum samples of experimentally infected *Cavia porcellus* specimens (guinea pigs), using polyclonal antibodies obtained from three species that were immunized with antigens of *T. cruzi*. The antibody pair was selected: IgY anti membrane protein from *Gallus gallus domesticus* (hen) as capture antibody (4 µg/ml) and IgG anti-TESA from *Vicugna pacos* (alpaca) as detection antibody (4 µg/ml), purified by affinity chromatography. In addition, the conjugate antillama was used at a dilution of 1/7500, blocking buffer composed of PBST plus 6% semi-skimmed milk and 1% BSA, and the substrate was ortho-phenylenediamine. The limit of detection of TESA antigen in artificially contaminated urine sample was 4 ng. The levels of antigenuria were positively related to high levels of parasitaemia. The methods used for the concentration of urines show no significant differences in the kinetics of detection of *T. cruzi* antigens by ELISA. Regarding the kinetics of detection of antigens in serum, significant differences were obtained between the samples of guinea-pig sera (*Cavia porcellus*) infected and healthy. The results show that this assay is important and can be used as a tool for the diagnosis of *T. cruzi* in humans.

Key words: *T. cruzi*, ELISA, *Cavia porcellus*, polyclonal antibodies IgG, IgY

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Según la OMS, entre 8 a 10 millones de personas en el mundo están infectadas por este parásito; la mayoría de ellas en América latina (Merino et al, 2013) es por ello que recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias para identificar a un paciente como chagásico, técnicas que estén basadas en diferentes metodologías o diferentes preparaciones antigénicas (Cabrera, 2004).

La infección por *T. cruzi* evoluciona en dos fases: aguda y crónica. Si la infección aguda no es reconocida y tratada, los pacientes entran en la fase crónica y tienen un riesgo de 30% a 40% de desarrollar afección visceral y daños al corazón, después de aproximadamente 10 a 30 años (Holguin et al., 2013).

La detección de la infección aguda requiere observación directa de los parásitos en la sangre, o el uso de herramientas moleculares como PCR. Mientras que pruebas serológicas como ELISA y Western Blot han sido usadas para detectar la fase crónica de la infección (Lescure et al., 2010).

Actualmente, el diagnóstico de rutina se basa en la detección de anticuerpos, sin embargo presenta problemas de reacción cruzada y una variación de su eficiencia en diferentes poblaciones; el problema en la detección de anticuerpos es que permanecen incluso después del tratamiento exitoso y la erradicación del parásito. Es por ello que en la presente investigación se pretende aplicar una prueba de ELISA tipo sandwich para la detección de antígenos propios del parásito *Trypanosoma cruzi*, utilizando anticuerpos policlonales producidos en *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus*

cuniculus (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina) inmunizados con antígenos de *T. cruzi*, y así ofrecer un resultado seguro de la enfermedad para facilitar un tratamiento temprano a los pacientes.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de la enfermedad de chagas

La enfermedad de chagas es una infección de por vida, conocida como tripanosomiasis americana (Rassi et al., 2010). Es causada por el parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, que fue descubierto 1909 por el científico brasileño Carlos Chagas (1879–1934) quien develó en sus investigaciones: agente, vector, patología, clínica y epidemiología de la enfermedad de chagas, constituyéndose en uno de los más completos descubrimientos acerca de una enfermedad, hecho por una sola persona en toda la historia (Cáceres et al., 2010).

2. Mecanismos de transmisión de *T. cruzi*:

2.1 Transmisión vectorial:

El principal vector es un triatomino hematófago (Hemiptera: Reduviidae). La mayoría de triatominos son selváticos, algunos son peri domésticos (alrededor de la casa), y otros son domésticos (dentro de la casa). Existen más de 130 especies de triatominos, sin embargo solamente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* tienen importancia epidemiológica en la transmisión de *T. cruzi* a humanos. Los triatominos antes de llegar a adultos pasan por cinco estadios ninfales para ambos sexos, todos los cuales pueden albergar y transmitir *T. cruzi*. La probabilidad de que un triatomino se infecte con *T. cruzi* aumenta de acuerdo a la cantidad de tomas de sangre ingeridas, de modo que los adultos tienden a tener las mayores tasas de infección. Algunos

animales domésticos tales como perros, gatos, cobayos y mamíferos salvajes como roedores, marsupiales y armadillos son portadores (Rassi et al., 2010).

2.2 Transmisión por transfusión sanguínea:

El riesgo de contraer la enfermedad de Chagas después de la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado es inferior al 10-20%, y depende de varios factores, incluida la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente sanguíneo transfundido y, quizás, la cepa del parásito (Bern et al., 2008).

2.3 Transmisión congénita o vertical (de madre a hijo):

La transmisión congénita ocurre en el 5% de los embarazos o más de mujeres crónicamente infectadas en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay, y en 1-2% o menos en la mayoría de los otros países endémicos. Estas diferencias pueden ser atribuibles al tipo de cepa del parásito, la inmunidad de las madres infectadas, y a factores placentarios (Jackson et al., 2009).

2.4 Transmisión oral.

En raras ocasiones se puede transmitir la enfermedad de chagas por la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con cantidades masivas de parásitos de *T. cruzi*. Alimentos como carnes crudas y líquidos como jugo de caña de azúcar, jugo de fruta açai (*Euterpe oleracea*). Lo cual desencadena un cuadro clínico agudo de alta mortalidad en las personas (Pereira et al., 2009).

3. Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Tripanosoma cruzi es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospederos, uno invertebrado y el otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. A lo largo de su ciclo evolutivo sufren profundas alteraciones que refleja su adaptación al medio en que se localiza. Esas formas reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, de la manera como el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el cinetoplasto (órgano de movimiento), se definen las siguientes formas evolutivas para los tripanosomatideos:

- a) **Epimastigote:** (20 - 40 x 2 μm .) posee un aspecto fusiforme con flagelos anteriores al núcleo. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Es también la forma más fácil de cultivar in vitro.
- b) **Amastigote:** (2 - 4 μm) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero, formando lo que se denomina nidos los cuales contienen gran cantidad de los parásitos que se multiplicaron por fisión binaria.
- c) **Tripomastigote:** (20 x 25 μm) forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo, el flagelo libre, membrana ondulante de importante extensión. Este estadio es la forma infectante, presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico) (Alberti, 2004).

En primer lugar, durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, los vectores triatominos se alimentan de la sangre de personas o animales infectados con tripomastigotes, que son las formas que se encuentran en el torrente sanguíneo. Luego en el intestino medio de los triatominos, se desarrollan y se replican los epimastigotes por fisión binaria. Después de eso, los epimastigotes migran al intestino posterior y recto y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que son liberados por defecación sobre la piel. Los mismos que pueden entrar a través del frotamiento o rascado de la herida o mordedura producida sobre las superficies mucosas o conjuntivales (Aristizabal, 2015).

Una vez que los tripomastigotes escapan de la primera línea celular inmune atacan, a los miocitos del corazón y del músculo liso y usan sus lisosomas a fin de penetrar en estas células donde se diferencian en amastigotes y también se replican por fisión binaria. Además, la forma amastigote puede ser transformado en tripomastigote en cualquier momento de su ciclo de vida, aumentando la carga de parásitos en el torrente sanguíneo si se produce una inmunodeficiencia (Romano, 2012).

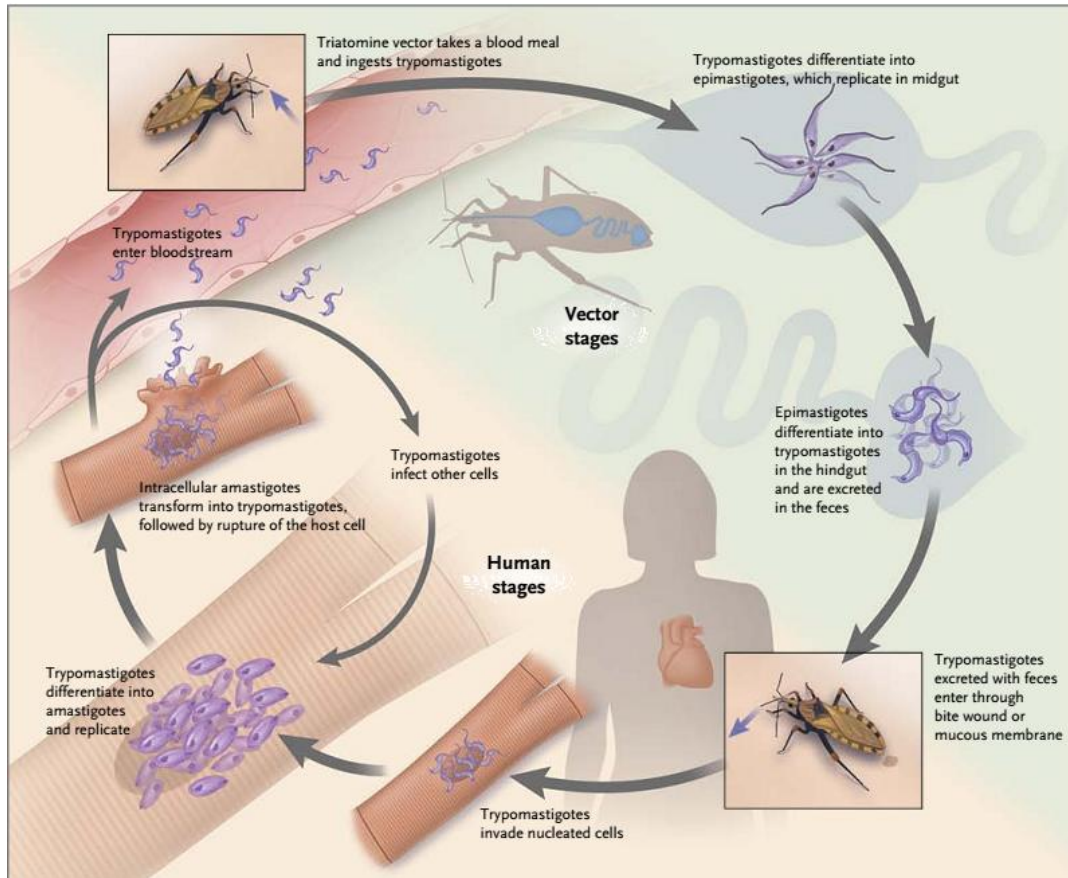


Figura N° 1: Ciclo de vida de *T. cruzi* (Fuente: Bern, 2011. Terapia Antitripanosomal para la Enfermedad de Chagas Crónica. Revista la Nueva Inglaterra de medicina).

4. FISIOPATOLOGÍA:

4.1 FASE AGUDA:

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, sólo 1-2% de los pacientes presentan síntomas, los cuales se presentan 1-2 semanas después de adquirir la infección. Cuando la sintomatología se hace evidente, es común encontrar una reacción inflamatoria en el sitio de entrada del parásito (conjuntiva o piel), conocida con el nombre de chagoma. Cuando compromete

el párpado constituye el signo de Romana-Mazza. Además, se produce diseminación linfática y hematológica de parásitos intracelulares en ganglios linfáticos y órganos como: bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, glándulas suprarrenales, cerebro y a veces ovarios, testículos y tiroides. En esta etapa, las manifestaciones clínicas son más frecuentes en niños, donde la enfermedad puede ser mortal. En el adulto se puede observar casos de mortalidad, pero con mayor frecuencia puede pasar desapercibida o presentarse en forma moderada (Estrada y Rodas, 2012).

La fase aguda se resuelve espontáneamente en 4-8 semanas. En un pequeño porcentaje de casos, principalmente en niños muy pequeños, se puede producir una miocarditis o meningoencefalitis fatal, aunque estas manifestaciones suelen ser más frecuentes en pacientes en fase crónica que por algún motivo pasan por un periodo de inmunodepresión (Ayala, 2011).

En el Sistema Nervioso Central hay infiltración linfocitaria de leptomeninges con congestión, hemorragias perivasculares, proliferación glial y neurofagia. El foco inflamatorio se presenta en cerebro, cerebelo, núcleos basales, protuberancia anular y medula espinal (Lagrange et al., 1992).

La infección congénita con *T. cruzi* puede producir aborto, muerte intrauterina o enfermedad aguda, la cual puede detectarse al momento de nacer pero se hace evidente varias semanas después. La mortalidad de la enfermedad congénita es secundaria a miocarditis, neumonitis o encefalitis (Estrada y Rodas, 2012).

4.2 Fase crónica

Se caracteriza por presentar una forma latente o indeterminada, durante esta etapa los síntomas desaparecen debido a la respuesta inmunitaria que provoca disminución de la parasitemia, pero no la eliminación completa del parásito, el cual permanece en el organismo y da comienzo a lesiones que determinarán la progresión de la enfermedad. La infección puede ser rápidamente activada durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunosupresión severa, como en el caso de pacientes que reciben un trasplante de órganos o aquellos que desarrollan SIDA (Estrada y Rodas, 2012).

Esta fase se caracteriza fundamentalmente por el compromiso visceral preferentemente en dos sectores, el corazón y el tubo digestivo, aunque también se ha detectado afectación del aparato urinario, glándulas suprarrenales, árbol bronquial, sistema nervioso central, cuya significación no ha sido precisada hasta la actualidad debido a su menor relevancia desde el punto de vista clínico y a la carencia de estudios de seguimiento a largo plazo (Estrada y Rodas, 2012).

El problema cardíaco es sin duda el compromiso más importante y frecuente de la enfermedad en esta etapa, debido principalmente por la infiltración linfocitaria originada por la intensa multiplicación parasitaria y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón, trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón, lo que ocasiona insuficiencia cardíaca e inducción a tromboembolias. En etapas más avanzadas de la

insuficiencia cardíaca se produce miocardiopatía dilatada, arritmias complejas y graves, que pueden desencadenar la muerte súbita (Estrada y Rodas, 2012). Hay diferentes factores que pueden influir en el hecho de que unos pacientes desarrollen daño cardíaco y otros no, éstos son: la carga parasitaria, la cepa de *T. cruzi* infectante que puede presentar diferente tropismo por los tejidos, el momento de la infección, factores genéticos del huésped y la eficiencia de su respuesta inmune (Ayala, 2011).

A nivel del aparato digestivo la presencia de dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) son las más frecuentes, pero se pueden ver también a nivel del estómago, intestino delgado y vesícula biliar. Se debe por el daño local al sistema nervioso autónomo durante la etapa aguda de la enfermedad que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura, ocasiona hipertrofia muscular y aumento considerable de los órganos (Estrada y Rodas, 2012)

5. Características antigénicas de *T. cruzi*:

Durante todo el proceso de cambio o morfogénesis de epimastigote a tripomastigote metacíclico, a amastigote y a tripomastigote, suceden cambios dinámicos en las estructuras de superficie del parásito y por lo tanto en su genotipo antigénico.

Los tripanosomas son incapaces de sintetizar ácido siálico por lo que usan la enzima transialidasa, la que está involucrada en el secuestro del ácido siálico de los sialoglicoconjugados presentes en sangre y otros tejidos del hospedero vertebrado infectado. El ácido siálico es transferido a galactosas terminales presentes en

mucinas (proteínas o-glicosiladas) que cubren la superficie del parásito. Se sugiere que estas y otras moléculas están involucradas en la invasión de las células del hospedero y en la protección contra la lisis por complemento.

El estadio de *T. cruzi* en la sangre y tejidos del hospedero es el tripomastigote, el cual libera diversos antígenos (mediante excreción-secreción) al espacio extracelular constituyendo la fracción conocida como TESA, formada por proteínas de 150–160 kDa, y varios componentes antigénicos de fase aguda (SAPA) de 130–200 kDa, contra los que se producen anticuerpos específicos detectables en pacientes con infección crónica y aguda respectivamente (Bern et al., 2009).

6. Diagnóstico:

a) Diagnóstico parasitológico

Los métodos utilizados permiten detectar a los tripanosomas en la sangre periférica. Están especialmente indicados en la fase aguda de la infección ya que es en esta etapa donde existe una parasitemia elevada. La técnica de elección es el microhematocrito (MH).

Otras técnicas y métodos parasitológicos utilizados son gota de sangre fresca, gota de sangre gruesa-frotis, concentración de Strout, hemocultivo, xenodiagnóstico y biopsia.

b) Diagnóstico serológico

Los métodos inmunoserológicos son herramientas epidemiológicas esenciales para conocer el estado inmune de la población, la incidencia o prevalencia de

infecciones y el riesgo de transmisión materno-fetal de enfermedades causadas por virus, bacterias o parásitos (Moretti et al., 2004)

Estos métodos permiten detectar anticuerpos circulantes específicos contra *T. cruzi* tanto en la fase aguda como en la crónica. Las técnicas convencionales más útiles son la hemaglutinación indirecta (HAI), ensayo inmunoenzimático (ELISA), técnica de Western Blot e inmunofluorescencia indirecta (IFI) que han facilitado el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera necesaria la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* con por lo menos dos técnicas de principio diferente. Al utilizar las técnicas de ELISA e IFI, la primera altamente sensible para el tamizaje de la infección y la segunda de elevada especificidad que complementa y ratifica el resultado obtenido en el tamizaje alcanzando el 95-98% de sensibilidad y especificidad respectivamente (Camargo et al., 1987)

7. Anticuerpos policlonales para el diagnóstico de la enfermedad de chagas

El uso de anticuerpos para investigación y diagnóstico de enfermedades se realiza desde hace varias décadas en todo el mundo. Normalmente estos anticuerpos se obtienen a partir del suero de mamíferos como roedores, caprinos, equinos, etc. Sin embargo varias investigaciones mencionan que anticuerpos policlonales obtenidos de alpacas y gallinas proporcionan buenos resultados en el diagnóstico de enfermedades (Herrera, 2011; Larsson et al., 1991).

7.1 Anticuerpos de *V. pacos* (alpaca)

El sistema inmunológico de las alpacas presenta características únicas que las diferencian de otras especies.

Existen tres subclases de inmunoglobulinas Ig G en camélidos denominados: IgG1, IgG2 e IgG3, la Ig G1 corresponde a los anticuerpos convencionales con dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas y la IgG2 e IgG3 son los que carecen de las cadenas livianas (Wernery, 2001); éstas dos últimas son conocidas como los anticuerpos de cadena pesada (HCAs) que desempeñan un papel importante en la defensa inmune (Daley et al., 2005). La pérdida de las cadenas livianas resulta de una alteración de la escisión que impide su transcripción al ARN mensajero y no de una supresión en el gen correspondiente (Medina et al., 2004).

Las IgG1 son los anticuerpos clásicos o convencionales y están presentes en 25% de la IgG sérica y tienen un peso molecular de 170 KDa; en cambio, la IgG2 y la IgG3 poseen dímeros de cadenas pesadas cortas, las cuales se caracterizan por poseer un fragmento cristalizante (Fc) normal sin un dominio CH1, pesan 100 KDa y están presentes en 75% de la IgG sérica. Los HCAs junto con sus dominios únicos simples (VHHs) o nanoanticuerpos, tienen muchas ventajas comparados con los anticuerpos convencionales, debido a su pequeño tamaño lo que mejora su biodistribución y permite una mejor penetración tisular (Wernery, 2001).

Los VHHs tienen propiedades particulares como son poseer una alta solubilidad, gran estabilidad en condiciones rigurosas, alta afinidad y

especificidad para el antígeno y poseer un pequeño tamaño haciendo fácil su manejo. Todas estas características permiten que los VHHs puedan ser utilizados como una herramienta de alto rendimiento en distintos campos de la ciencia médica controlando varias enfermedades de los animales y humanos (Muyldermans et al., 2009).

El uso de VHHs resulta una alternativa prometedora en el diseño de intrabodies debido a su elevada estabilidad y excelente plegado bajo condiciones extremas. Por tal motivo, VHHs fusionados a proteínas fluorescentes (chromobody-intrabody) son expresados en diferentes compartimentos y estructuras subcelulares de células eucariotas, y pueden reconocer diversos epitopes, incluyendo antígenos que se expresan en bajas concentraciones (Rothbauer et al., 2006)

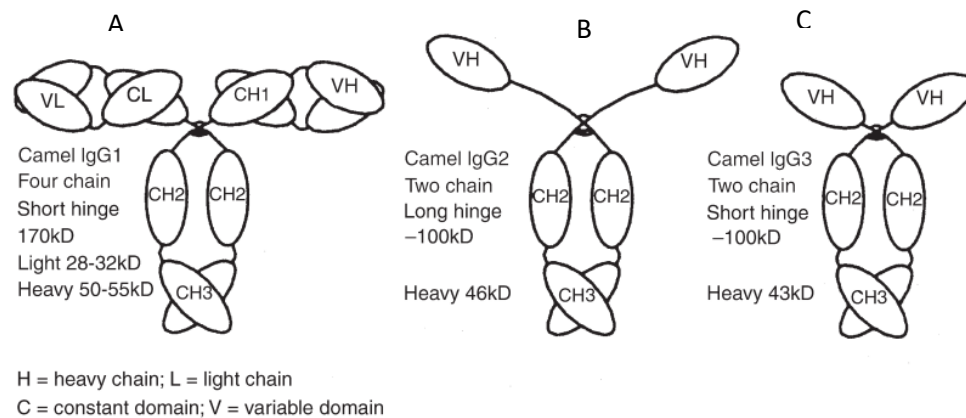


Figura N° 2: Representación estructural de la inmunoglobulina G convencional IgG1 (A) y las inmunoglobulinas de cadenas pesadas IgG2 (B) e IgG3 (C) de los camélidos Fuente: (Wernery, 2001)

7.2 Anticuerpos de *Gallus gallus domesticus* (gallina) y *Oryctolagus cuniculus* (conejo)

En los últimos años se están utilizando cada vez con mayor frecuencia anticuerpos aviares extraídos de las yemas de los huevos donde se encuentran en una elevada concentración (Dopico et al., 2012). Se ha encontrado que los anticuerpos con mayor proporción en el plasma sanguíneo, las IgY, son transferidos a la yema del huevo a través del epitelio folicular del ovario durante la oogénesis y se van acumulando, proceso similar a la transferencia de los anticuerpos a través de la placenta en mamíferos (Shimizu et al., 1991)

Uno de los anticuerpos aviares son las inmunoglobulinas Y. Su nombre deriva, precisamente, del término inglés “yolk” (yema) y constituye el isotipo principal presente en la yema del huevo, con una masa molecular de 190 kDa.

La diferencia estructural con la IgG de los mamíferos por ejemplo del conejo, radica en los dominios constantes de las cadenas pesadas ya que en vez de tener 3 dominios Cv1 Cv2 y Cv3, posee cuatro estando uno adicional a la región bisagra del anticuerpo. (Sun., et al, 2001). El uso de los anticuerpos aviares son una gran alternativa ya que disminuye el estrés e injuria al huésped debido a su fácil obtención y tiene alta productividad (Alarcón y Hurtado, 2000).

Otras ventajas de los anticuerpos aviares son la capacidad del sistema inmunológico de las aves para producir anticuerpos contra antígenos altamente conservados de mamíferos que no presentan reactividad con el factor reumatoide (FR), término que agrupa aquellos autoanticuerpos dirigidos contra

determinantes antigénicos del fragmento Fc de las moléculas de IgG (Dopico et al, 2012)

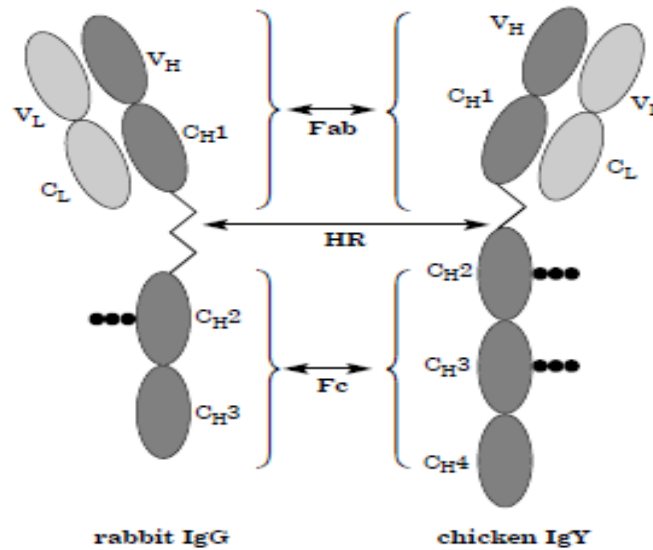


Figura N° 3: Estructura molecular de Ig G de conejo y de Ig Y de gallina V=dominio variable de la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH); C= Dominio constante de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH); HR=Región bisagra. Los puntos blancos simbolizan las cadenas de carbohidratos. Fuente Shimizu et al., 1991

8. Tratamiento de la enfermedad de chagas

El tratamiento específico de la enfermedad de Chagas continúa siendo un desafío y una de las principales preocupaciones sanitarias en los países afectados por la endemia. Se han ensayado numerosos fármacos y ninguno ha resultado absolutamente eficaz. Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril) metileno]-4- tiomorfolinoamina-1,1-dioxido) y el Benznidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), cuya actividad anti *T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace cuatro décadas (Cabrera, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Estandarizar la prueba de ELISA sandwich para la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente, utilizando anticuerpos policlonales de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina).

Objetivos específicos

- Purificar anticuerpos policlonales obtenidos de sueros de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y de yemas de huevos de *Gallus gallus domesticus* (gallina) inmunizados con antígenos: lisado de tripomastigotes, TESA, proteína de membrana y 1F8 de *T. cruzi*
- Emplear anticuerpos policlonales IgG e IgY en la captura de antígenos de *T. cruzi* para estandarizar la técnica de ELISA de captura tipo sandwich.
- Determinar el límite de detección de antígeno TESA mediante la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.
- Infectar experimentalmente *Cavia porcellus* con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Determinar la cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* por ELISA tipo sandwich en orinas de *Cavia porcellus*, utilizando tres métodos de concentración de orinas: precipitación con etanol, liofilización y con concentrador Minicon B15, durante el curso de la infección experimental.
- Determinar la cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* por ELISA de captura tipo sandwich en sueros de *Cavia porcellus*, durante el curso de la infección experimental.

HIPÓTESIS

El empleo de anticuerpos policlonales de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina) obtenidos por inmunización con un panel de antígenos de *T. cruzi*; permitirá detectar antígenos de *T. cruzi* mediante ELISA de captura tipo sandwich, en muestras de orina y suero de *Cavia porcellus* (cuyes) infectados experimentalmente

MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico

Se trabajó con 9 especímenes machos de *Cavia porcellus* de 2 meses que pesaron entre 400 y 500 g, que fueron comprados en la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima. Cada animal fue identificado con un código y fueron criados dentro de jaulas colocadas en el bioterio de la Facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Mayor de San Marcos, y fueron alimentados con comida especial para cuyes como purina, alfalfa y agua *ad libitum*.

Para la producción de anticuerpos policlonales se inmunizaron tres *Vicugna pacos* (alpaca), seis *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y seis *Gallus gallus domesticus* (gallina) utilizando cuatro diferentes antígenos: antígeno excretor-secretor de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA), antígeno lisado total de tripomastigotes, antígeno proteína de membrana, y el antígeno comercial recombinante 1F8 *T. cruzi*.

2. Obtención de parásitos de *T. cruzi*:

Los tripomastigotes de *T. cruzi* cepa “Y” fueron proporcionados por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, los mismos que fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 50 µg/ml de penicilina y estreptomina, usando células LLC-MK2, siguiendo el procedimiento publicado (Jazin et al, 1991; Nakasawa M. et al 2001).

Para infectar a los cuyes (*Cavia porcellus*) primero se procedió a la preparación del inóculo. Para ello se cosechó los parásitos presentes en el sobrenadante del cultivo celular. Una cantidad aproximada de 5 ml de medio de cultivo con tripomastigotes de *T.cruzi* de la cepa “Y” el cual fue colocado en un tubo Falcon para ser centrifugado a 1500 RPM durante 3 minutos (con la finalidad de separar las células de los parásitos). Solo el sobrenadante fue recuperado y colocado en otro tubo. Para el conteo de los parásitos, se colocó 20 µl de colorante vital azul de tripan en un tubo eppendorf y se añadió 20 µl del sobrenadante, luego se homogenizó. Se cargó la cámara de Neubauer con 10 µl de la dilución anterior, colocando la punta de la pipeta en el borde y por debajo del cubreobjetos, y se dejó que la solución ingrese a la cámara por capilaridad. Luego se colocó la cámara de Neubauer sobre la platina del microscopio y se enfocó con el objetivo de 10x. Se localizó los cuadrantes laterales de la rejilla (ubicando la cuadrícula de 16 cuadros) y se cambió al objetivo de 40x. Luego se procedió a contar los parásitos y el número de cuadros contados, para ello se hizo uso de un contómetro. Finalmente se tomó 200 µl de la muestra que contenía una concentración aproximada de 1×10^5 de parásitos para infectar a cada animal del grupo experimental como se detalla más adelante.

3. Reactivos

Los solventes y reactivos químicos utilizados fueron de alto grado de pureza, obtenidos de Sigma- Aldrich Chemical, Merck y Bio-Rad.

4. Obtención y purificación de anticuerpos policlonales IgG e IgY

4.1 Producción y recolección de antígenos de *T. cruzi*

a) TESA

Para la obtención del antígeno excretor-secretor de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) se removió, con pipetas descartables, el sobrenadante del medio de cultivo de las células LLC-MK2 infectadas con *T. cruzi*, mediante 3 lavados con medio RPMI 1640 libre de suero fetal bovino, luego estas células fueron incubadas por 24 horas en este medio RPMI 1640 libre de suero. Posteriormente se removió nuevamente el sobrenadante y se centrifugó a 4000 rpm x 10 min a 4°C. Luego, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.20 µm de poro (Millipore Laboratories)

En el filtrado que contiene TESA, se determinó la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (BioRad Laboratories). Luego se tomaron alícuotas de 200 µl del filtrado que contenían TESA; que fueron sometidos a un control de calidad a través de Western blot, otras alícuotas sirvieron como controles positivos para la estandarización de la prueba de ELISA.

Para la inmunización de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina) se preparó el inóculo de la siguiente manera:

Se desarrolló la técnica de Western blot de acuerdo a lo descrito por Umezawa 1986. En una primera etapa el TESA fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7%. Luego se realizó la transferencia de las

proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm de poro. Después se realizó el control de calidad utilizando un suero de paciente crónico a la enfermedad de chagas para determinar el nivel de las proteínas de interés (150-160 KDa). Se midió el área que ocuparon las proteínas en la membrana, multiplicando el largo por el ancho. Luego se cortó la zona que ocuparon las proteínas y esa membrana fue cortada trozos pequeños que fueron colocados en un tubo falcon y se resuspendieron en dimetil sulfóxido (DMSO) teniendo en cuenta la relación la siguiente relación: Si obtenemos 20 mm^2 agregar 250 μl de DMSO puro. Se dejó homogenizar lentamente para disolver las membranas de nitrocelulosa durante 60 min. Luego se agregó por goteo 250 μl de buffer bicarbonato (0.05M; pH9.6) por cada 20 mm^2 de nitrocelulosa, sin romper la cadena de frío. Una vez homogenizado todo se centrifugó dos veces a 1000 g por 10 minutos y se usó PBS para lavar el pellet entre cada centrifugada. Las muestras finales se almacenaron a -70°C hasta el momento de la inmunización.

b) Antígeno comercial recombinante 1F8

Se adquirió de la empresa comercial Genway Biotech Inc. CA-USA. 1F8 es una proteína flagelar de 25.8 kDa de peso molecular que es capaz de unir el calcio del parásito protozoo *T. cruzi*. Este antígeno que es producido por el parásito tiene un adecuado grado de sensibilidad para su detección según lo descrito en bibliografía (Da Silveira, 2001).

c) Antígeno lisado total de tripomastigotes (TLA)

Los tripomastigotes presentes en el sobrenadante de cultivos celulares se recolectaron mediante centrifugación (3500 rpm x 10 min a 4 °C), y se lavaron dos veces con solución tamponada fosfato salino (.01M NaHPO₄.H₂O, 0.15M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ a pH 7.2). Luego el precipitado obtenido se resuspendió con 500 µl de PBS de Western (pH 7.2). La suspensión de tripomastigotes fue sometida a sonicación en 4 ciclos de 30''x 3H x 24 W con 1 min de pausa entre ciclos. Todo este procedimiento se realizó manteniendo la cadena de frío a 4°C. Posteriormente se midió la concentración de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

d) Antígeno Proteína de membrana: Obtención con Triton X-114

Los tripomastigotes obtenidos a partir de cultivo celular, fueron lavados con TRIS (10mM TRIS/140mM NaCl, pH 8) frío y fueron resuspendidos en PBS filtrado. Se Centrifugó a 3500 rpm durante 10 min; luego se resuspendió el pellet en buffer TBS frío (10mM de TRIS/140mM NaCl, pH 8 + 2% de Triton X-114) y se dejó por una hora y media a 4 °C (se homogenizó cada 15 minutos). Nuevamente se centrifugó a 10 000 g por 15min a 4 °C. Luego se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) en un ependorf (siliconado), se incubó el sobrenadante a 37°C por 5min y se centrifugó a 10 000 g por 1min a Temperatura ambiente, donde se observó dos fases: FASE ACUOSA (presenta proteínas hidrofílicas) y Fase detergente (proteínas hidrofóbicas).

Finalmente se recuperó la Fase acuosa y se descartó la Fase detergente. Se guardó la Fase Acuosa a -70°C hasta su posterior uso.

4.2 Inmunización de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina)

La inmunización de los animales con los antígenos de *T. cruzi* se realizó de la siguiente manera: *Vicugna pacos* (alpaca) se inmunizaron con lisado total de tripomastigotes, proteína de membrana y TESA. *Oryctolagus cuniculus* (conejo) se inmunizaron con antígeno comercial recombinante 1F8 y TESA. Finalmente, *Gallus gallus domesticus* (gallina) se inmunizaron con TESA, proteína de membrana y 1F8. Se realizaron cuatro inmunizaciones por animal con un período de descanso de 15 días entre cada inmunización según el flujograma de la Figura N° 4.

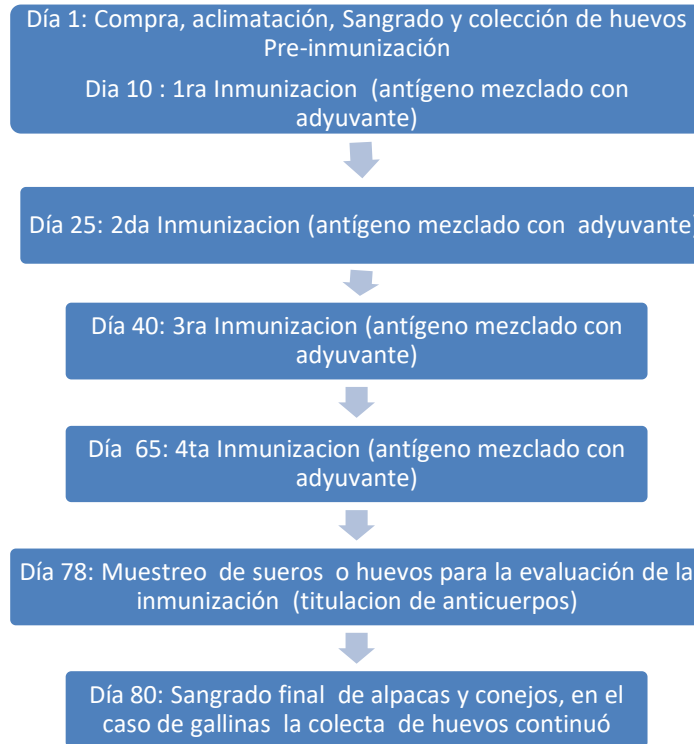


Figura N° 4: Flujograma general de las inmunizaciones de *Vicugna pacos* (alpaca), de *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y de *Gallus gallus domesticus* (gallina)

4.3 Obtención de anticuerpos a partir de sueros de *Vicugna pacos* (alpaca) y de *Oryctolagus cuniculus* (conejo) inmunizados con antígenos de *T. cruzi*.

Las muestras de sangre de alpacas y conejos pre inmunizados y post inmunizados se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos. Luego se retiró el sobrenadante correspondiente al suero y se almacenaron a -20°C. Para el presente trabajo se utilizaron las muestras de sangre obtenidas después de la cuarta inmunización.

4.4 Obtención de anticuerpos a partir de yemas de huevos de *Gallus gallus domesticus* inmunizados

Se separó la yema del huevo y se colocó dentro de un falcon, luego se agregó un volumen de PBS (0.01M NaHPO₄.H₂O, 0.15M NaCl, 0.01 M Na HPO₄ a pH 7.2) igual al volumen de la yema. Se homogenizó la mezcla colocando el falcon sobre un rocker por 2 minutos. Luego se agregó un volumen de cloroformo igual al volumen de la mezcla obtenida y se homogenizó con cuidado. Posteriormente se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 3500 rpm por 15 min. Transcurrido el tiempo se observó la formación de tres fases; solo se tomó la fase superior en un tubo falcon que se dejó en refrigeración hasta su uso. El siguiente paso fue la diálisis. Para ello se cortaron bolsas o membranas de diálisis (Spectra/Por membrane 3 MWCO 3500, Marca Spectrum) de acuerdo al volumen de muestra, y se colocaron en agua destilada hirviendo durante 15 minutos; con ayuda de una pinza se retiraron las membranas del agua y se dejaron enfriar, luego se llenaron con las muestras. Las bolsas de diálisis se sellaron en sus extremos con abrazaderas especiales de plástico. Finalmente se sumergieron las bolsas en PBS (0.01M NaHPO₄.H₂O, 0.15M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ a pH 7.2) y se dejó difundir pasivamente los solutos, manteniendo una agitación suave durante 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se vació el contenido de las bolsas en tubos para su posterior concentración de proteínas utilizando como unidad de filtro Amicon YM 100 (Amicon, Millipore, Darmstadt, Alemania). Además, para eliminar completamente los residuos lipídicos, se utilizó el kit de purificación

de IgY de Pierce Chicken (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Purificación de anticuerpos IgG e IgY por cromatografía de afinidad

La purificación de los anticuerpos policlonales IgG e IgY, se llevó a cabo por cromatografía de afinidad. En este tipo de cromatografía un “ligando de afinidad” específico se une por un sitio o varios sitios de unión a una molécula diana acoplada a una matriz cromatográfica inerte. En determinadas condiciones, la matriz de afinidad unirá moléculas de acuerdo a su especificidad. Después de la etapa de interacción y la etapa de lavado, las moléculas adsorbidas son liberadas y eluidas mediante un cambio en las condiciones del medio o añadiendo un exceso de moléculas competidoras que desplacen a la molécula diana del ligando de afinidad.

Se utilizaron columnas HiTrap™ de la casa comercial GE Healthcare Life Sciences y se siguió el protocolo descrito por ellos.

Todas las cromatografías fueron realizadas y monitorizadas en un equipo cromatográfico BIORAD. El resultado de la cromatografía fue evaluado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Como se describe más adelante.

a) Purificación de anticuerpos Ig G de *Vicugna pacos*

Se utilizó columna de afinidad HiTrap™ Protein G HP de 1 ml de volumen.

La columna emplea como ligando la proteína G, obtenida de la superficie celular del grupo *Streptococci*.

Primero se diluyó 2 ml de suero hiperinmune de alpaca con 50 ml de buffer Bindig (20 mM $\text{H}_2\text{NaPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, pH 7). Luego se filtró la mezcla usando un trompo de 0.45 μm . Durante todo el proceso se trabajó sobre un recipiente con hielo para no romper la cadena de frío.

Luego se lavaron las mangueras del equipo cromatográfico BIORAD con alcohol y con H_2O mili Q; después se conectó la columna HiTrap™ Protein G HP de 1 ml de volumen, para calibrar la velocidad del flujo a 1ml por minuto, dejando pasar 25 ml Buffer Binding (20 mM $\text{H}_2\text{NaPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, pH 7) a través de la columna. Después se cambió la velocidad de flujo a 0.5 ml por minuto para dejar pasar la muestra por la columna. Una vez pasada la muestra se lavó la columna con 25 ml de Buffer Binding. Posteriormente los anticuerpos fueron eluidos aplicando buffer de elución (100 Mm glicina-HCl pH 2.7) y las fracciones fueron recogidas en tubos ependorf de 2 ml que contenían 400 μl de solución Tris-HCl pH 9 para neutralizar inmediatamente el pH ácido y renaturalizar los anticuerpos. Una vez recolectados los anticuerpos, se re-equilibró la columna con buffer binding y luego se lavó la columna con alcohol al 20% y se conservó en refrigeración. Una columna de afinidad puede ser reutilizada muchas veces, siempre y cuando la funcionalidad y el rendimiento se mantengan aceptables.

Se midió la concentración de proteínas de las fracciones purificadas, obtenidas, por el método colorimétrico de Bradford.

b) Purificación de anticuerpos IgG de *Oryctolagus cuniculus*

Se utilizó una columna de afinidad HiTrap™ Protein A HP de 1 ml de volumen. La columna emplea como ligando la proteína A, producida por un selecto cultivo de *Staphylococcus aureus*.

Se siguió el mismo protocolo usado para la purificación de anticuerpos IgG de *Vicugna pacos*, con la diferencia de que el Buffer de Elusión fue preparado con ácido cítrico 0.1 M a pH 3

c) Purificación de anticuerpos IgY de yemas de huevos de *Gallus gallus domesticus*

Las muestras obtenidas en la etapa 4.4 se purificaron con columna HiTrap™ IgY de 5 ml de capacidad (General Electric, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Según se describe para la purificación de anticuerpos de *Vicugna pacos* con la diferencia de que los buffers: Buffer de unión (20 mM fosfato de sodio, 0.5 M sulfato de potasio a pH 7.5) y Buffer de elución (20 mM fosfato de sodio a pH 7.5)

5. Medición de proteínas en los extractos purificados (Método de Bradford)

Se realizó la medición de proteínas (IgG o IgY) mediante el Método colorimétrico de Bradford, para ello utilizamos como curva de calibración estándar concentraciones crecientes de BSA (5 µg/ml; 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml y 400 µg/ml). Luego se pipeteó 20 µl de cada estándar y 20 µl de muestra con concentración de proteínas desconocida en pozos de placa de ELISA y se adicionó 200 µl de reactivo de Bradford a cada pozo. Luego se determinó la

concentración de proteínas en las muestras a partir de la curva de calibración estándar y los valores de Absorbancia a 595 nm.

6. Electroforesis SDS-PAGE de los anticuerpos purificados IgG e IgY

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se utilizó para dar seguimiento al proceso de purificación de las proteínas, mediante la determinación de los patrones de bandas de polipéptidos en las distintas fracciones obtenidas en la separación cromatográfica por afinidad. Para ello, se realizó el análisis electroforético en condiciones no reductoras con un gel de resolución al 12% y un gel de empaquetamiento al 5%, en base al método modificado descrito por Laemmli. Los anticuerpos IgG de alpaca y conejo fueron diluidos 1:10 usando buffer de muestra (100 Mm Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 20% de glicerol). Las muestras de IgY fueron diluidas 1:4 usando buffer de muestra (62.6 Mm Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 25% de glicerol).

Los geles preparados fueron cargados con los anticuerpos purificados. Luego se realizó tinción de los geles con 0.25% de Azul de Coomassie, sumergiendo el gel en el colorante (azul de comasie, metanol y ácido acético) durante toda la noche. Para visualizar las proteínas, se decoloró el gel con decolorante de Comasie durante 60 min.

7. Western blot

Se enfrentaron los anticuerpos purificados con sus respectivos antígenos. Para ello la separación electroforética se llevó a cabo en gel de 7% para antígeno TESA, para antígeno 1F8 fue al 12% y los antígenos proteína de membrana y lisado (sonicado) fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 18% en condiciones reductoras.

Luego los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (0.2 KDa BioRad) durante 2 horas, luego se bloquearon con PBS Western más leche al 5%. Posteriormente se enfrentó las tiras con las alícuotas purificadas preinmunes y postinmunes a una dilución de 1 en 100 en buffer PBS Tween 0.03% más leche al 1% durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó el anticuerpo secundario comercial correspondiente a cada animal (antialpaca, anticonejo, antigallina) conjugado con HRP por dos horas. Se reveló con el cromógeno DAB (Diaminobenzodine) más H₂O₂, y se detuvo la reacción con agua miliQ.

8. Prueba de ELISA tipo sandwich para la detección de antígenos de *T. cruzi* en orina y suero, empleando anticuerpos policlonales

Para estandarizar la prueba de ELISA tipo sandwich se probaron varias combinaciones de duplas de anticuerpos policlonales purificados. Los anticuerpos se seleccionaron a partir de una matriz de doble entrada, indicando con X los pares de anticuerpos que no se probaron (tabla N° 1). Además se probaron diferentes concentraciones de anticuerpos de captura (1 µg/ml, 2 µg/ml y 4 µg/ml), anticuerpo de detección (1 µg/ml, 2 µg/ml y 4 µg/ml) y conjugados anti especie (1/1000, 1/5000, 1/7500, 1/10 000, 1/15 000), y bloqueadores (PBS - Tween 20® 0.05%+ leche semidescremada 6% + BSA 1% y PBS - Tween 20® 0.05%+ leche semidescremada 5%)

Los controles positivos fueron muestras de orina de *Cavia porcellus* (cuyes), sanos sin chagas, contaminadas artificialmente con antígeno TESA (1 µg/ml) más antígeno lisado de tripomastigotes (0.5 µg/ml) y diluidas 1:1 con PBST (NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂PO₄ y Tween al 0.05%).

Los controles negativos correspondieron a orinas de *Cavia porcellus* (cuyes) sanos sin chagas, y diluidas 1:1 con PBST.

		Gallina			Conejo		Alpaca		
		TESA	PM	1F8	TESA	1F8	TESA	PM	Lisado
Gallina	TESA	X							
	PM		X						
	1F8			X					
Conejo	TESA				X				
	1F8					X			
Alpaca	TESA						X		
	PM							X	
	Lisado								X

Tabla N° 1: Matriz de doble entrada con las posibles combinaciones de anticuerpos policlonales purificados, empleados para estandarizar la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.

PROCEDIMIENTO:

El protocolo final fue de la siguiente manera: Primero, se sensibilizó una placa de 96 pocillos (Marxisop) con 100 µl de anticuerpo de captura IgY anti proteína de membrana (4 µg/ml) diluido en buffer carbonato bicarbonato (0.1 M, pH 9.6) durante toda la noche a 4°C. Después los pozos fueron lavados 3 veces con 200 µl/por pozo de buffer de lavado (PBS - Tween 20® 0.05%= PBST) por 1 min entre

cada lavado. Los sitios de unión a proteínas inespecíficas remanentes fueron bloqueados con 200 µl/por pozo con PBST + leche semidescremada 6% + BSA 1%, durante dos horas a temperatura ambiente en agitación constante. Después se lavó la placa cinco veces como en el paso anterior. Se colocaron 100 µl/por pozo de las muestras de orina y suero pretratadas, diluidas en PBST, cada muestra fue testeada por duplicado y fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora. Luego se procedió al lavado de la placa, cinco veces, de la misma forma como los anteriores lavados. Se colocaron 100 µl del anticuerpo de detección Ig G *Vicugna pacos* (alpaca) anti TESA (4 µg/ml) diluido en una solución de PBST más leche 1% y 0.2% de BSA y se incubó la placa a 37°C por 1h. Posteriormente se lavó la placa nuevamente. Se colocaron 100 µl/por pozo del conjugado anti llama marcado con peroxidasa (Bethyl, laboratorios) a una dilución de 1/7500 usando PBST más leche 1% y BSA 0.2% como diluyente y se incubó la placa a 37°C durante 30 min. Luego nuevamente se procedió a lavar la placa 5 veces y después del lavado se reveló la placa con orto-fenilendiamina (OPD, Sigma FAST™; Sigma- Aldrich Chemical Compañía) como sustrato. La reacción fue detenida con 50 µl/por pozo de H₂SO₄ a 2 M y la placa fue leída a 490 nm usando un lector de placas VERSA max ELISA.

9. Infección experimental de especímenes de *Cavia porcellus* (cuyes)

Se separaron los cuyes en dos grupos: 6 cuyes fueron inyectados por vía intradérmica en la región dorsal lumbar con 1×10^5 parásitos (tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y) en 100 µl de medio de cultivo celular RPMI 1640 (grupo experimental), y otros 3 cuyes, fueron inyectados por vía intradérmica con solo 100

μ L de medio de cultivo celular RPMI 1640 (grupo control). La preparación del inóculo para la infección fue descrito en el ITEM 2 obtención de parásitos.

10. Obtención y conservación de muestras de orina y suero de *Cavia porcellus*

Las muestras de orina y sangre se obtuvieron de *Cavia porcellus* (cuyes) antes de la infección y luego cada siete días después de haber sido inoculados con *T. cruzi* durante 98 días. El procedimiento para toma de muestra fue como sigue:

a) **La orina** se recolectó de la siguiente manera: Primero se anestesió al animal mediante una inyección intramuscular de una combinación de Ketamina (ket-a-100®, Agrovvet Market Perú S.A.) y Xilacina (dormi-xyl® 2, Agrovvet Market S.A) a una dosis de 35mg/Kg y 5mg/Kg; después se desinfectó la zona urogenital con peróxido de hidrógeno al 7%, a continuación se colocó al animal sobre una mesa en posición dorso ventral y se hizo ligera presión sobre la vejiga para coleccionar 15 ml de orina en tubos Falcons.

Las muestras recolectadas fueron transportadas al laboratorio de Inmunología de enfermedades infecciosas (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para su procesamiento.

En el laboratorio las orinas de cada cuy se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos. Luego con una jeringa de 10 ml coger solo el sobrenadante sin remover el pellet, quitar la aguja de la jeringa y enroscar en el filtro de 0.2 μ m de porosidad y hacer pasar todo el contenido a otro tubo Falcon de 15ml. Luego se adicionó los siguientes inhibidores de proteasas con sus respectivas diluciones:

Pefabloc (1/100), pepstatin (1/1000), leupeptin (1/1000). A continuación se guardaron a -20 °C hasta su uso.

b) Para la la toma de muestra de sangre primero se rasuró el pelo de la zona donde se realizó la punción de la vena más superficial de la pata anterior o posterior y se recolectó la sangre directamente en tubos endorf de 2 ml de capacidad. Las muestras se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. En el laboratorio las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min, luego se retiró el sobrenadante conocido como suero. Los sueros se almacenaron a -20° C hasta su uso.

11. Técnica para la detección de parásitos en sangre

Se usó la técnica de microhematocrito para concentrar parásitos. Para ello se colectó sangre de cada animal infectado en tubos capilares heparinizados. Los tubos capilares con las muestras fueron centrifugados durante 2 min a 13 000 rpm. Luego se midió en mm el volumen total que ocupa la muestra en el capilar. Posteriormente se cortaron los capilares con una punta de diamante, entre la capa leucoplaquetaria y la capa de eritrocitos. Luego en una lámina portaobjetos se colocó una gota (interfase) y se cubrió con una laminilla 22x22 mm y fue examinada por microscopía óptica a 400 aumentos para detectar parásitos en 50 campos. El número de parásitos encontrado se expresó en términos de parásitos por mililitro de sangre (Murray et al., 1977)

Fórmula: $5 \times N^{\circ} \text{ de parásitos} \times 6400 / \text{Volumen total sanguíneo} \times 0.8957$

12. Prueba de ELISA indirecto para la detección de Ig G contra *T. cruzi* en sueros de cuyes infectados

Los niveles de Ig G contra *T. cruzi* fueron medidos por la prueba de ELISA indirecto para comprobar la infección en los animales.

Se colocó 100 µL del antígeno TESA (Excretorio-secretorio de tripomastigotes) a una concentración de 2 µg/ml diluido en buffer carbonato en cada uno de los pozos de la placa Marxisop de 96 pocillos. Se incubó toda una noche a 4 °C (aproximadamente 18 horas), para lograr la sensibilización de la placa. Al día siguiente se lavó la placa cinco veces, utilizando 100 µL de PBS con Tween 20 al 0.05%, en cada uno de los pozos, se agitó ligeramente durante 3 minutos antes de cambiar el líquido. Se incubó la placa con una solución de PBS Tween 0.05% y leche descremada al 5% durante una hora a 37 °C, para bloquear todos los espacios en los que el antígeno no se hubiera adherido. Se lavó la placa como ya ha sido descrito. Se añadió en cada pozo de la placa 100 µL de cada uno de los sueros de trabajo los cuales fueron diluidos previamente en una proporción de 1:100 en PBST. Se incubó la placa durante una hora a 37 °C, para permitir la reacción antígeno anticuerpo. Se lavó la placa como ya ha sido descrito. Se añadió en cada pozo de la placa 100 µL del conjugado anti Ig G de cuy marcado con peroxidasa. Se incubó la placa durante 45 min a 37°C, para permitir la reacción del conjugado con el anticuerpo. Se lavó la placa como ya ha sido descrito. Se añadió en cada pozo de la placa 100 µL del sustrato de orto-fenil-dietanolamina (OPD). Las densidades ópticas fueron determinadas a 490 nm usando un espectrofotómetro.

13. Western blot para la detección de Ig G e Ig M contra *T. cruzi*

La prueba de western blot que utilizamos fue descrita por Umezawa et al. (1996). Se usó sueros de muestras a una dilución de 1 en 100, luego se incubó con el conjugado anti guinea pig IgG (KPL inc.) a una dilución de 1 en 4000 o el conjugado anti guinea IgM a una dilución de 1 en 250 (Nordic Immunological Laboratories).

El antígeno TESA de 150 a 160 KDa aparece como una banda gruesa y su presencia nos indica que la muestra corresponde a fase crónica. Por otro lado los antígenos con masa molecular de 130 a 200 KDa, corresponden a seis bandas SAPA y son un indicador de fase aguda (Umezawa et al., 1996)

14. Concentración de muestras de orina de *Cavia porcellus* antes de la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.

Para la concentración de las orinas se probaron tres métodos, que son los siguientes:

a) Precipitación con etanol

Se mezcló 3 ml de orina positiva o negativa con 3 volúmenes de etanol frío es decir con 9 ml. Luego se colocó la muestra a -20 °C durante 48 horas. Se centrifugó a 9 800g durante 20 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 300 µl de PBS a pH 7.2 (Freilij, H. et al., 1987).

b) Liofilización

Se liofilizó 3ml de orina positiva o negativa por cada muestra. El polvo obtenido de la muestra fue reconstituido en 300 µl de PBS a pH 7.2.

c) Concentración con minicon B-15

Se utilizó concentradores de muestras clínicas Minicon ® B-15 (Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts) siguiendo los pasos del fabricante. Tomando como volumen inicial de orina 3 ml y concentrándola hasta un factor de 15X es decir 15 veces su volumen inicial. Se retiró el concentrado y se almacenó hasta su uso.

15. Tratamiento para los sueros antes de la prueba de ELISA de captura tipo sandwich.

Se colocó 50 µl de suero positivo o negativo en un tubo ependorf y se diluyó la muestra con 50 µl de solución PBS - tween 20® 0.05%, leche 1% y BSA (Albumina de Suero bovino) 0.2%. Luego se calentó a 56°C a baño maría durante 30 min (Soltis et al, 1979).

16. Límite de detección:

Después de estandarizar la prueba de ELISA de captura tipo sandwich se procedió a determinar el límite de detección del antígeno TESA por lo anticuerpos seleccionados, en orinas contaminadas con concentraciones decrecientes de antígeno TESA: 1000 ng/100µl, 500 ng/100µl, 250 ng/100µl, 125 ng/100µl, 62.5 ng/100µl, 31.2 ng/100µl, 15.6 ng/100µl, 7 ng/100µl, 4 ng/100µl (factor de dilución ½).

17. Análisis estadístico

Para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales y análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS. Las diferencias significativas fueron calculadas usando el análisis de la prueba de varianza (ANOVA). La interpretación fue en función del valor de p , ya que $p > 0.05$, indicó no significativo (ns) y $p < 0.05$, indicó que existen diferencias significativas.

RESULTADOS

1. Obtención y purificación de anticuerpos IgG e IgY mediante cromatografía de afinidad

a) Determinación de la concentración de proteínas de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad

La cromatografía por afinidad se basa en la capacidad de la proteína A y proteína G, presentes en la columna de purificación, de reconocer y unir específicamente a la fracción cristalizable (Fc) de la IgG o IgY según sea el caso.

La purificación de IgG proveniente de suero de *Oryctolagus cuniculus* (conejo) inmunizados con antígenos 1F8 y TESA se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando la columna comercial HiTrap Proteína A, la purificación de IgG de suero de *Vicugna pacos* (alpaca) inmunizadas con antígeno lisado de tripomastigotes, proteína de membrana y TESA se utilizó la columna comercial HiTrap protein G; y para la purificación de IgY proveniente de yemas de huevos de *Gallus gallus domesticus* (gallina) inmunizadas con antígenos 1F8, proteína de membrana y TESA, se utilizó la columna comercial HiTrap proteína Y. Según la metodología seguida y que es de uso frecuente para purificar este tipo de proteínas asumimos que los productos obtenidos son puros.

En las figuras 5A y B se muestran los perfiles de elución de IgG, mediante el método de Bradford, de las fracciones de elución purificadas por cromatografía de afinidad correspondientes a: *Vicugna pacos* (alpaca) inmunizado con antígeno TESA y *Oryctolagus cuniculus* (conejo) inmunizado con antígeno 1F8. Y en la figura 5C se muestra el perfil de elución de IgY de *Gallus gallus domesticus* (gallina) inmunizado con antígeno proteína de membrana.

Las curvas nos indican que las concentraciones de IgG e IgY contenidas en las fracciones obtenidas son diferentes. Al determinar la concentración de proteína en cada una de las fracciones observamos que en el caso de alpaca y gallina la mayor cantidad de proteína se encuentra en la fracción 2 con 360 µg/ml y 550 µg/ml, respectivamente; y en el caso de conejo en la fracción 4, con un valor de 232.2 µg/ml.

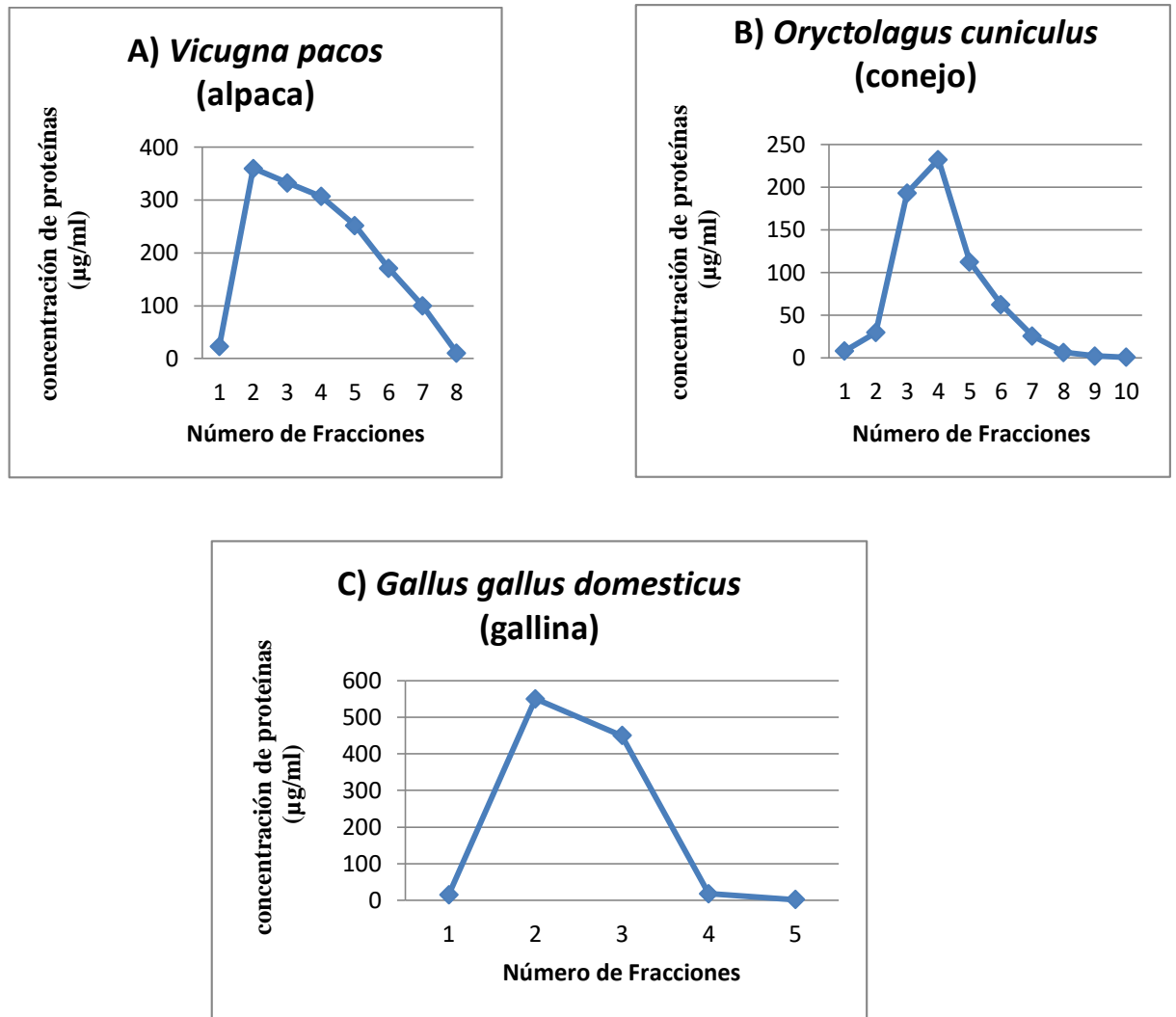


Figura N° 5: Perfil de elución de IgG e IgY de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad respectivamente A. Fracciones de *Vicugna pacos* (alpaca) B. Fracciones de *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y C. *Gallus gallus domesticus* (gallina)

b) Electroforesis de proteínas.

Para la SDS-PAGE se utilizaron fracciones de elución con más alta concentración de Ig. Después de la purificación, el SDS-PAGE, coloreado con azul de comasie, permitió confirmar la presencia de anticuerpos IgG de *Vicugna pacos* (alpaca), ya

que se puede visualizar una banda de 170 kDa aproximadamente de peso molecular (figura N° 6A)

Por otro lado en la figura N° 6B se aprecia una banda de 180 kDa aproximadamente, que corresponde a proteínas de IgG purificadas de *Oryctolagus cuniculus* (conejo), mientras que en la figura N° 6C se observa una banda de 190 kDa aproximadamente, que corresponderían a anticuerpos IgY purificados de *Gallus gallus domesticus* (gallina)

A) *Vicugna pacos* B) *Oryctolagus cuniculus* C) *Gallus gallus domesticus*

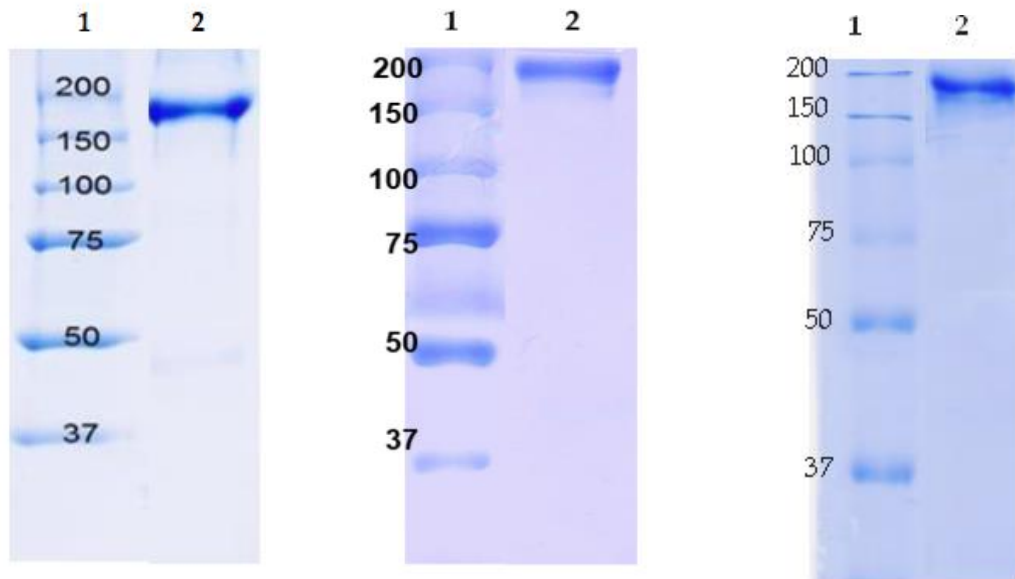


Figura N° 6: Perfil electroforético que muestra el grado de pureza de IgG e IgY. A) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa); línea 2: IgG de *Vicugna pacos*; B) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa), línea 2: IgG de *Oryctolagus cuniculus* C) Línea 1: marcador de peso molecular (kDa), Línea 2: IgY de *Gallus gallus domesticus*. SDS-PAGE al 12%.

2. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos policlonales (IgG e IgY)

En la figura 7, las tiras 1 presentan ausencia de bandas ya que se utilizó los sueros de *Vicugna pacos* antes de la inmunización, por ello en esos sueros no se encuentran los anticuerpos específicos para detectar sus antígenos correspondientes como son: lisado de tripomastigotes, proteína de membrana y TESA. En el caso de las tiras 4 y 6 no se observan bandas, ya que corresponden a controles negativos es decir sueros de personas sanas sin la enfermedad de chagas.

En cambio en la tira 2A se observan varias bandas comprendidas en un rango de 100 kDa a 40 kDa, siendo las bandas más intensas con pesos moleculares de 40 kDa, 50 kDa y 75 kDa, y coinciden con las bandas observadas en la línea 5A que corresponde al control positivo, es decir paciente con la enfermedad de chagas en fase crónica.

Por otro lado, en la tira 2B se observan bandas cuyos pesos van de 100 kDa a 25 kDa que casi coinciden con las bandas del control positivo que se encuentra en el carril 3B.

Con respecto al antígeno TESA, en la tira 2C se aprecia 6 bandas SAPA cuyos pesos moleculares van de 130 a 160 kDa. Además de una banda mas gruesa de 200 kDa que correspondería a una banda no específica o de cruce. De forma similar en la tira 3C que corresponde al control positivo, se observa la presencia de las 6 bandas SAPA que permiten el diagnóstico de pacientes con chagas en fase aguda establecido por Umezawa. En cambio en la línea 5C se observa la presencia de una

banda gruesa de peso aproximado de 150 a 160 kDa que sirve como indicador de diagnóstico para pacientes con chagas en fase crónica.

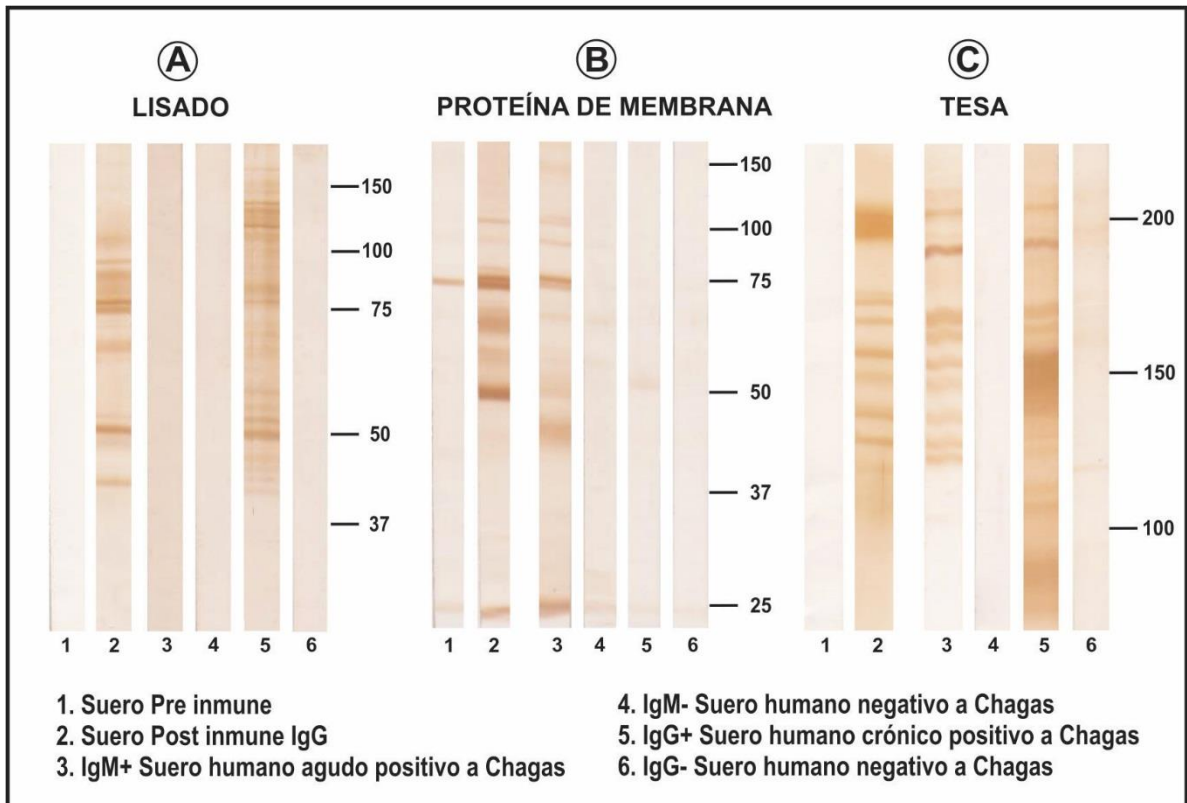


Figura N° 7: Detección de antígenos mediante prueba de Western blot utilizando anticuerpos IgG purificados de *Vicugna pacos* (alpaca).

En la tira 2 de la figura N° 8A se aprecia la presencia de una banda única a la altura de 25 kDa que correspondería a la proteína recombinante 1F8 que tiene un peso molecular de 25.8 kDa, lo cual coincide con la tira 3 que es el control positivo y en el caso de la tira 5 se observan tres bandas. Por otro lado, en la figura 8B la tira 2 presenta seis bandas SAPA características en la detección de la enfermedad de chagas en fase aguda.

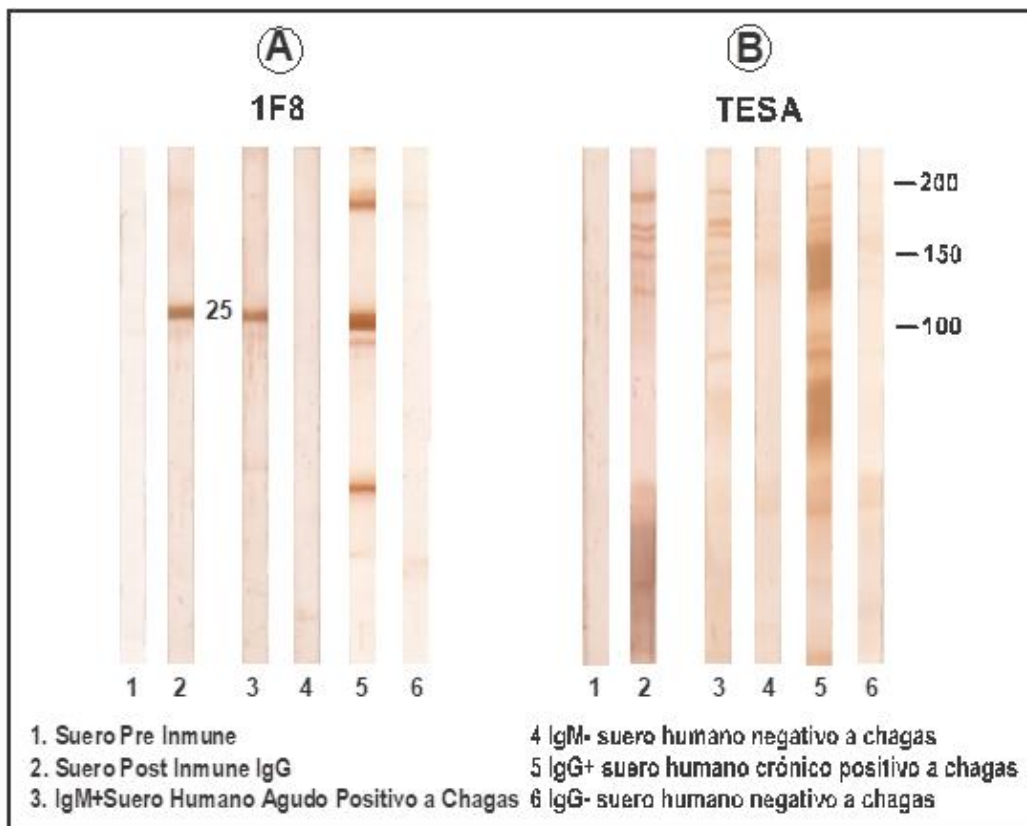


Figura N° 8: Detección de antígenos mediante prueba de Western blot utilizando anticuerpos IgG purificados de *Oryctolagus cuniculus* (conejo).

En el caso de la tira 2 de la figura 9A, se observan dos bandas intensas de 160 y 250 kDa. En la figura 9B, la tira 2 presenta bandas de baja intensidad que van de 25 kDa a 75 kDa y por último en la figura 9C se observa en la tira 2 que IgY purificada a partir de huevos inmunizados con antígeno 1F8 detectó una banda de 25,8 kDa, que los anticuerpos preinmunes no reconocieron. Sin embargo se observa una banda muy tenue en la tira 1 que correspondería a una banda no específica o de cruce.

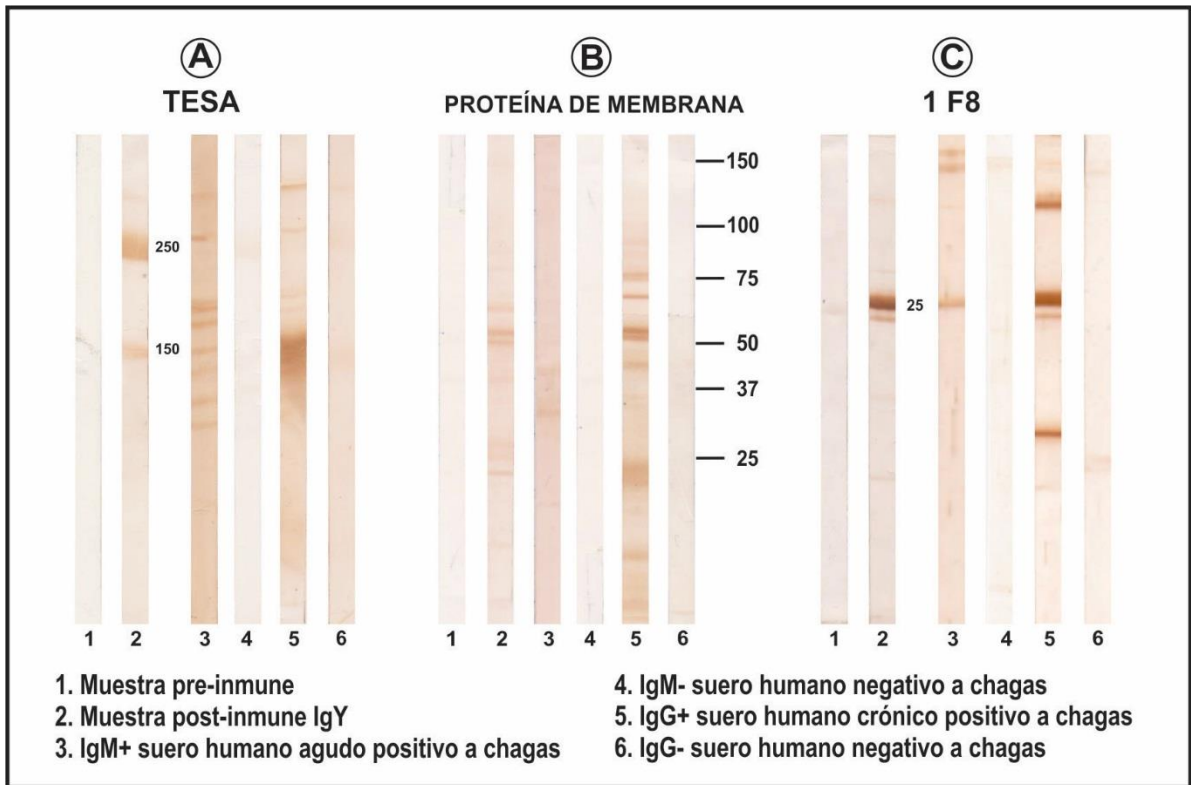


Figura N° 9: Detección de antígenos: TESA, proteína de membrana y 1F8 mediante prueba de Western blot utilizando anticuerpos IgY purificados de *Gallus gallus domesticus* (gallina)

3. Selección de anticuerpos policlonales para estandarizar la prueba de ELISA de captura tipo sandwich

Después de probar diferentes y múltiples combinaciones de duplas de anticuerpos (según tabla N° 1), se seleccionó a los siguientes anticuerpos: IgY anti proteína de membrana de *G. gallus domesticus* (gallina) e IgG anti TESA de *V. pacos* (alpaca), por su capacidad de detectar antígenos de *T. cruzi* en muestras contaminadas con TESA y no mostrar reactividad en muestras negativas mediante ELISA de captura

(tabla N° 3). Además, en la tabla N° 2 se detallan las condiciones óptimas para estandarizar la prueba de ELISA.

Tabla N° 2: Condiciones óptimas para la prueba de ELISA tipo sandwich

Concentración del anticuerpo de captura	4 ug/ml de IgY anti proteína de membrana de <i>G. gallus domesticus</i> (gallina)
Concentración de anticuerpo de detección	4 ug/ml de IgG anti TESA de <i>V. pacos</i> (alpaca)
dilución del conjugado antillama	1/7500
Buffer de Bloqueo	PBST + leche semidescremada al 6%+BSA 1%
Sustrato	OPD

Tabla N° 3 Resultados obtenidos de la captura de antígenos en la orina de *Cavia porcellus* contaminada artificialmente con antígeno TESA más antígeno lisado de tripomastigotes (O+) y orina de cuy negativo a chagas (O-), obtenidos mediante la prueba de ELISA tipo sandwich empleando anticuerpos policlonales de *Gallus gallus domesticus* (gallina) y *Vicugna pacos* (alpaca).

Muestra de orina contaminada (O+)	Control negativo (O-)	Blanco	Ratio DO+ /DO-
1.46 ± 0.138	0.194± 0.036	0.156 ±0.030	7.52

4. Determinación del límite de detección de antígenos TESA de *T. cruzi* por ELISA sándwich

Se hicieron diluciones del antígeno TESA empleando como diluyente orina de *Cavia porcellus* sano. Las diluciones seriadas decrecientes se prepararon por duplicado (factor de dilución 1/2) desde una concentración inicial 1000 ng hasta obtener una concentración final de 4 ng/100 μ l de orina. En la Figura N° 10 se muestran las densidades ópticas de la captura de antígeno TESA por los anticuerpos policlonales seleccionados, siendo el límite de detección de 4ng/100 μ l.

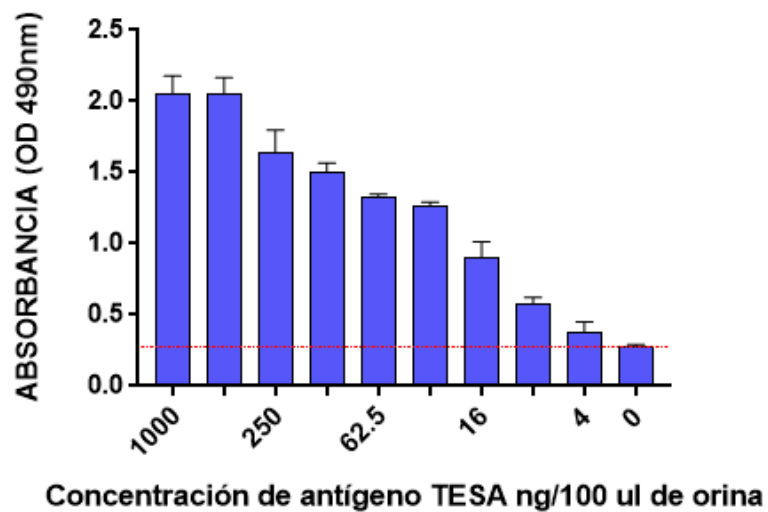


Figura N° 10: Límite de detección de antígeno TESA en muestras de orinas de *Cavia porcellus* contaminadas con el antígeno.

5. Detección de parásitos de *T. cruzi* en sangre de cuyes infectados

Mediante la prueba de microhematocrito se determinó la presencia de parásitos de *T. cruzi* en muestras de sangre de cuyes infectados. La toma de muestra se realizó cada 7 días durante 56 días post infección. En la figura N° 11 se observa parasitemia alta entre los días 21 y 49 días post infección, encontrándose el pico más alto el día 35. Asimismo, a partir del día 56 post infección no se detectó parasitemia con el microscopio óptico.

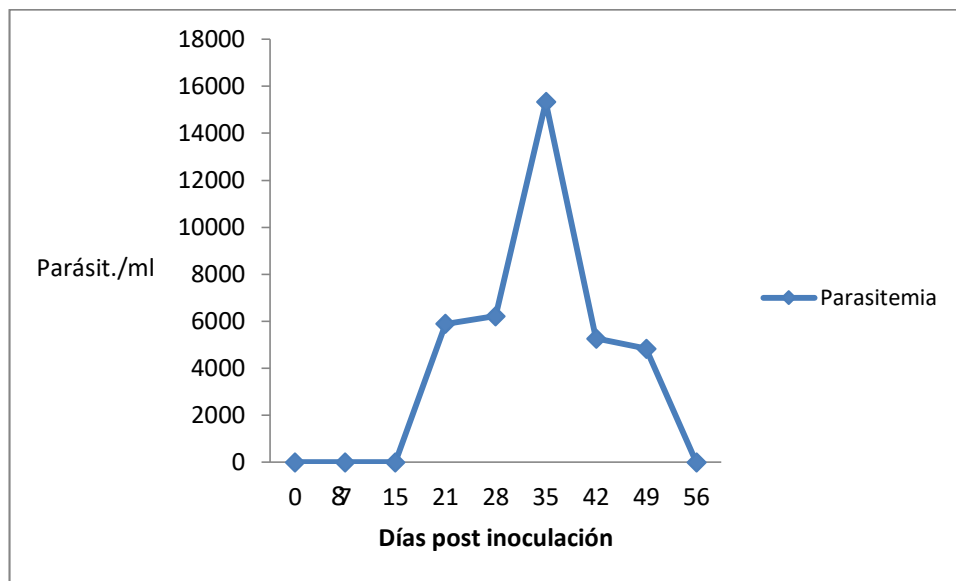


Figura N° 11: Detección de parasitemia en cuyes infectados con *T. cruzi*, usando la técnica de microhematocrito.

6. Detección de Ig G contra *T. cruzi* en sueros de cuyes infectados mediante prueba de ELISA indirecto.

En la figura 12 se muestra que el 100% de los sueros de los cuyes infectados con *T. cruzi* mostraron reactividad serológica positiva, es decir se detectaron anticuerpos IgG contra *T. cruzi*, que fueron capturados por los antígenos fijados en la pared de los pozos de la placa mediante un ELISA indirecto. Los valores de O.D. aumentaron de forma progresiva de acuerdo a los días de toma de muestra, alcanzando los valores más altos hacia el día 98. Los sueros procedentes de cuyes sanos no mostraron ninguna reactividad.

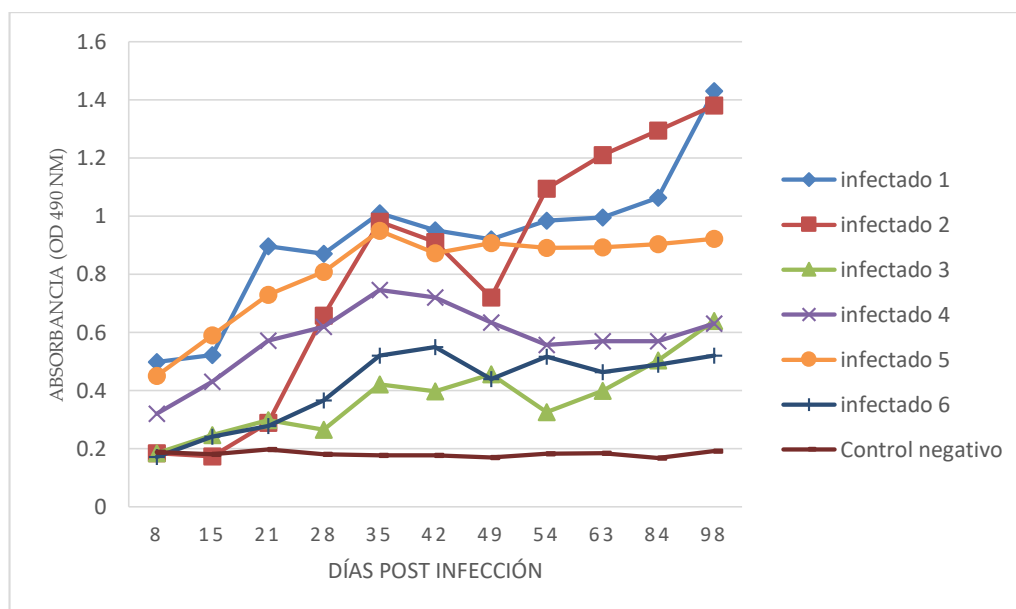


Figura N° 12: Detección IgG anti *T. cruzi*, en sueros de especímenes de *Cavia porcellus* (cuyes) infectados y no infectados con *T. cruzi*, mediante prueba de ELISA indirecta.

7. Detección de anticuerpos IgM e IgG mediante análisis por Western-Blot durante el curso de la infección experimental de *Cavia porcellus* con *T. cruzi*

Apartir del día 15 post infección, los anticuerpos IgM presentes en sueros de *Cavia porcellus* infectados con *T. cruzi* (tiras 1, 2, 3, 4, 5, y 6) detectaron seis bandas SAPA (130 a 200 kDa), lo cual estaría relacionado con la fase aguda de la enfermedad. En el día 56, las seis bandas SAPA son más tenues (Figura N° 13A). No se observa ninguna banda que corresponda a IgM, las bandas tenues probablemente correspondan a bandas de crue en las tiras 7 de la figura N° 13A y 13B, ya que corresponden a suero de *Cavia porcellus* sano sin chagas.

En la figura N° 13B, a los 15 días posinfección los anticuerpos IgG detectaron tenues bandas SAPA en las tiras 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En el día 21 las 6 bandas SAPA son más intensas. A partir del día 56 se observa la presencia de un banda más gruesa algo tenue (150 a 160 kDa) que corresponde a la banda crónica, en la tira 1 que estaría relacionado con la fase crónica de la enfermedad de chagas. Siendo en el día 84 donde es más intensa en todas las tiras correspondientes a cuyes infectados.

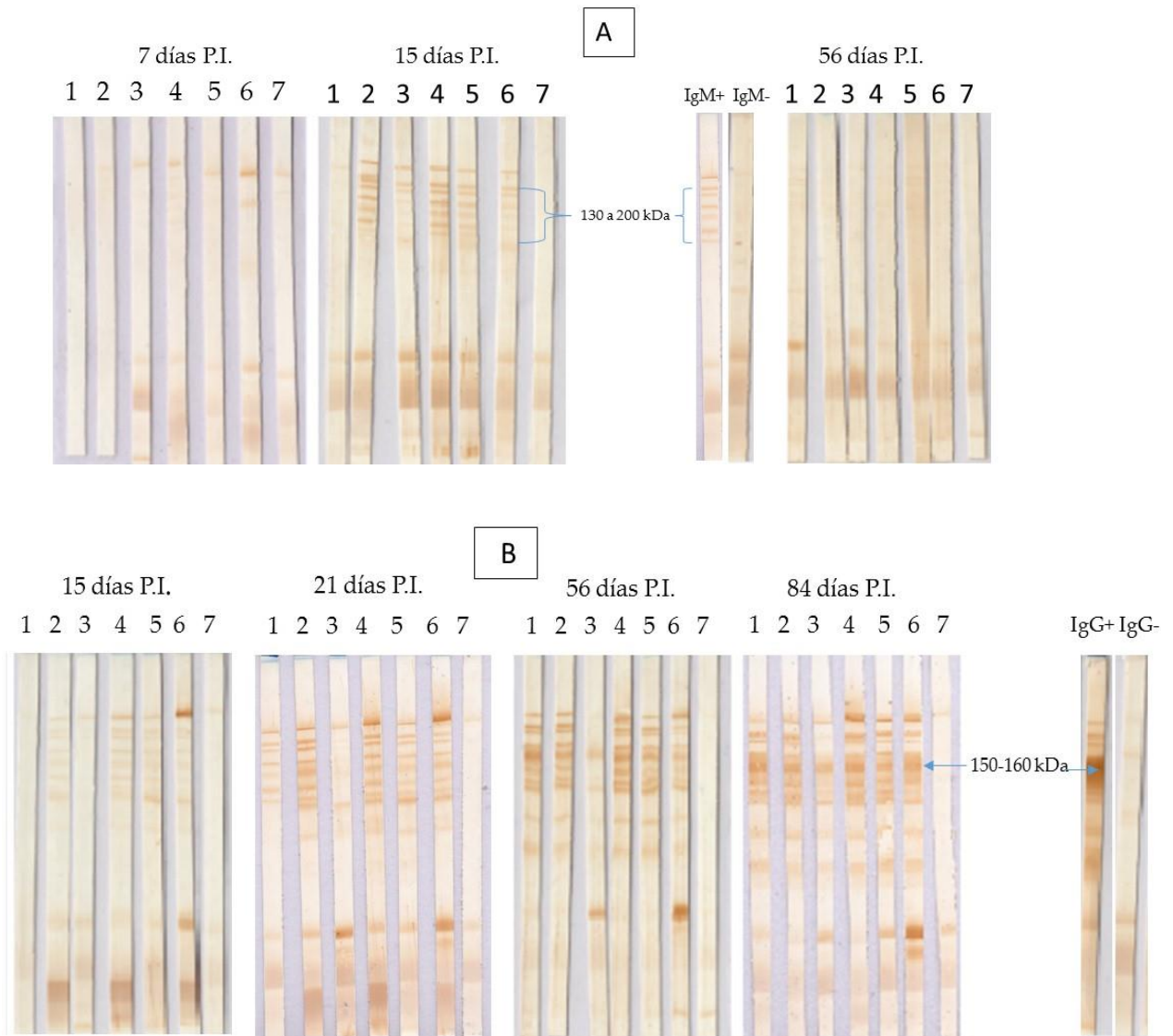


Figura N° 13: Detección de anticuerpo IgM (A) y anticuerpo IgG (B) mediante el análisis de TESA Blot durante la infección experimental de *Cavia porcellus* con *T. cruzi*. Las tiras del 1 al 6 corresponden a *cavia porcellus* infectado con *t. cruzi* y la tira 7 corresponde a *cavia porcellus* sano sin chagas. Además los controles positivos son: IgM+ corresponde a suero humano positivo a chagas agudo e IgG+ corresponde a suero humano positivo a chagas crónico. Los controles negativos son: IgM- e IgG- corresponden a sueros humanos negativos a chagas.

8. Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* por ELISA de captura tipo sandwich en orinas de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente.

La concentración de las orinas fue usada en un intento de mejorar el rendimiento del ensayo de ELISA de captura, en términos de aumento de la sensibilidad sin perder especificidad. Con relación a los niveles de antígenos, se encontraron diferencias significativas entre el grupo *Cavia porcellus* infectados con *T. cruzi* y los no infectados ($p < 0,05$). Los valores graficados corresponden a promedios de las lecturas de densidad óptica de 6 especímenes de *Cavia porcellus* infectados experimentalmente y promedios de densidad óptica de 3 especímenes no infectados.

a) En orinas concentradas por precipitación con etanol

La Figura N° 14 representa la cantidad de antígeno parasitario detectado, expresado en densidades ópticas. Los valores más altos corresponden a promedios de densidades ópticas de orinas de *Cavia porcellus* infectados experimentalmente, en los días 8, 28, 35, 42 y 98 post infección.

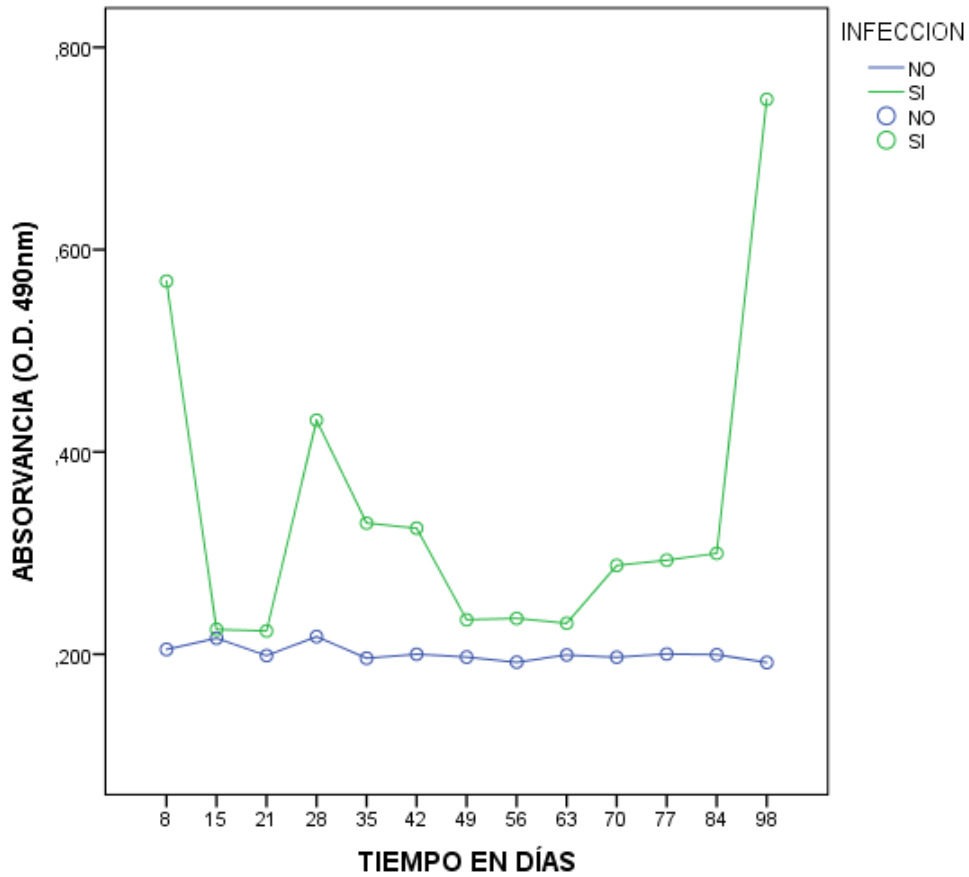


Figura N° 14: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orinas pretratadas con etanol.

b) En orinas concentradas por liofilización

Por otra parte en la Figura N° 15 los promedios de lecturas de densidades ópticas de orinas liofilizadas, muestran valores altos en los días 8, 28, 35, 84 y 98 post infección. Las OD de las muestras de orina de *C. porcellus* sanos presentaron lecturas menores a 0.200

En el día 98 se observa detección de antígenos en todas las orinas de los especímenes de *Cavia porcellus* infectados experimentalmente siendo el promedio de OD de 0.746.

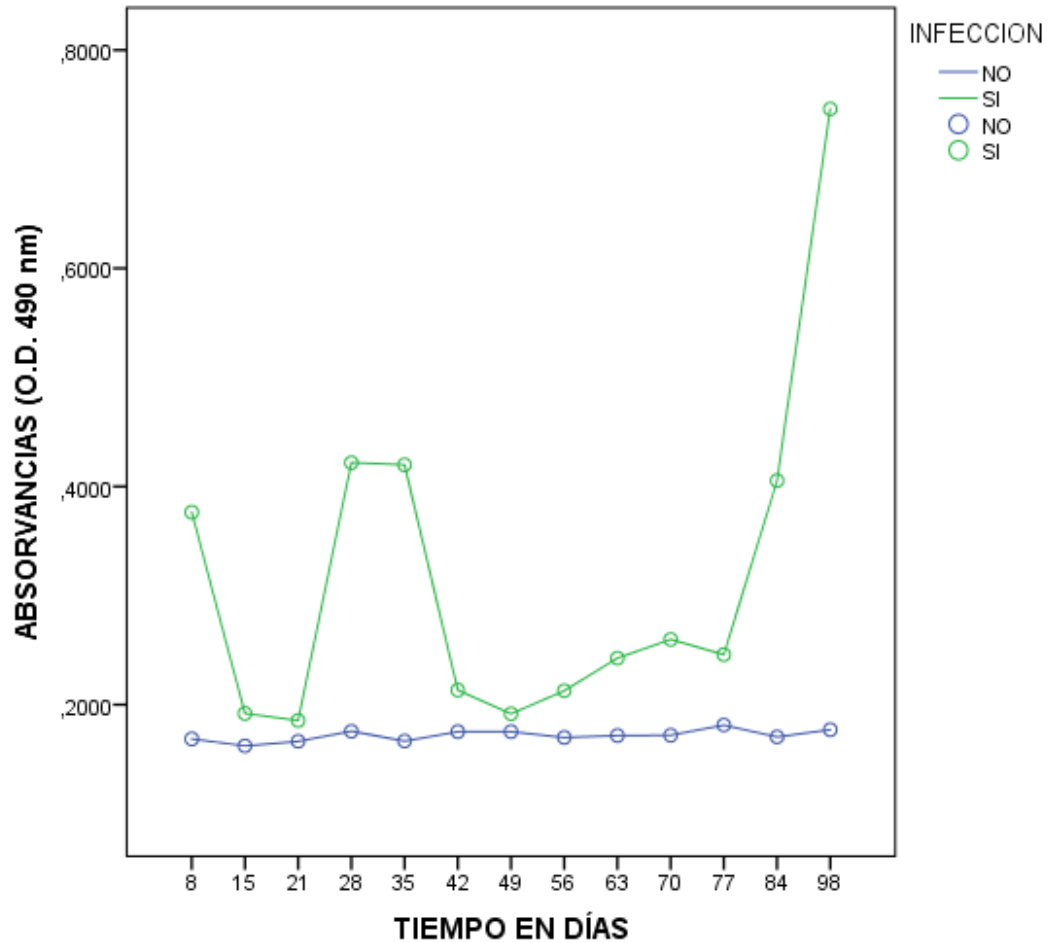


Figura N° 15: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orinas liofilizadas.

c) En orinas concentradas con el kit Minicom B-15

La concentración de las muestras de orina se realizó por ultrafiltración selectiva, empleando el kit Minicon B15 (Amicon Millipore, EE.UU.), de forma que se obtuvo la muestra concentrada 15 veces.

Con la prueba de ELISA de captura estandarizada se detectó mayor cantidad antígenos de *T. cruzi* en los días 8, 28 y 98 días post infección. En el día 98 post infección la OD fue de 0.814 (figura N° 16).

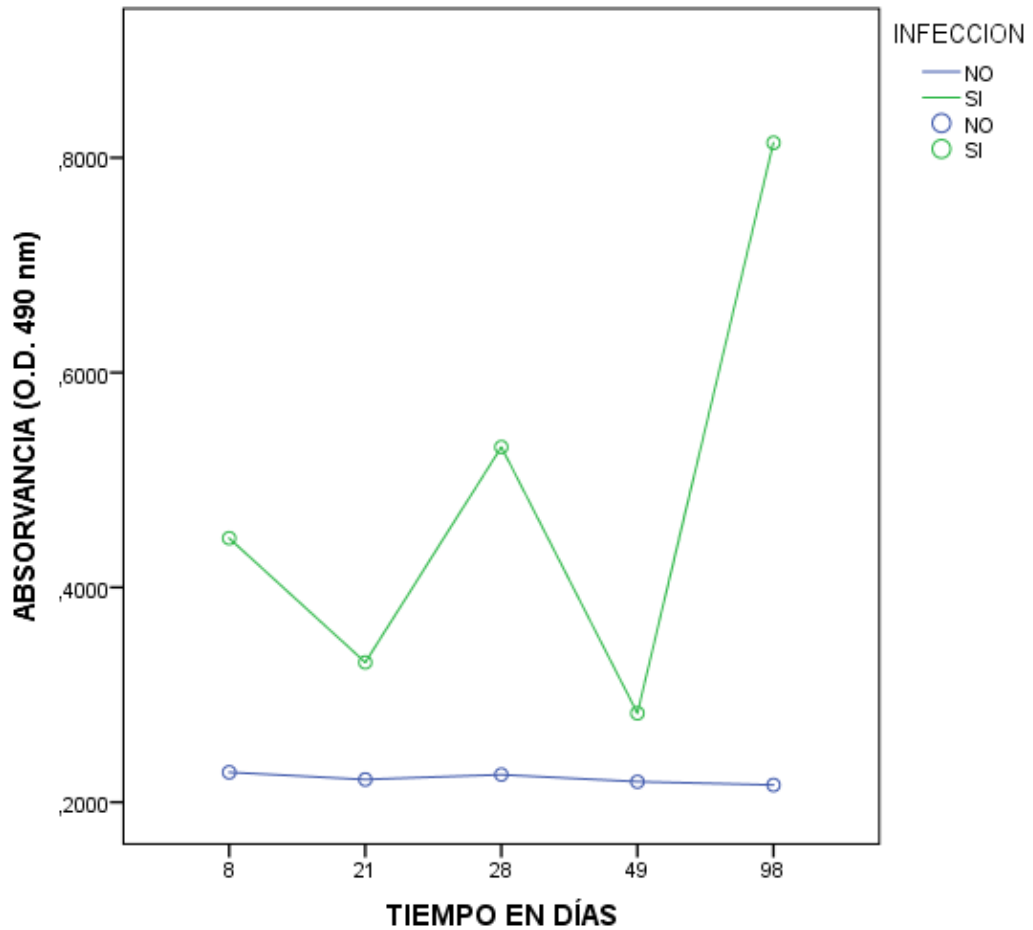


Figura N° 16: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en muestras de orinas concentradas con el kit minicon B15.

9. Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* por ELISA de captura tipo sandwich en sueros de *Cavia porcellus* infectado experimentalmente.

Los sueros fueron tratados previamente con calor (56 °C) para inactivar a las proteínas del complemento y así tener mayor disponibilidad del antígeno de *T. cruzi* en las muestras.

Los niveles máximos de antígenos fueron detectados a partir de los 77 días post infección (valores de densidad óptica media de 0,276 – 0.302) existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de los sueros positivos y los valores de los controles negativos (Figura N° 17)

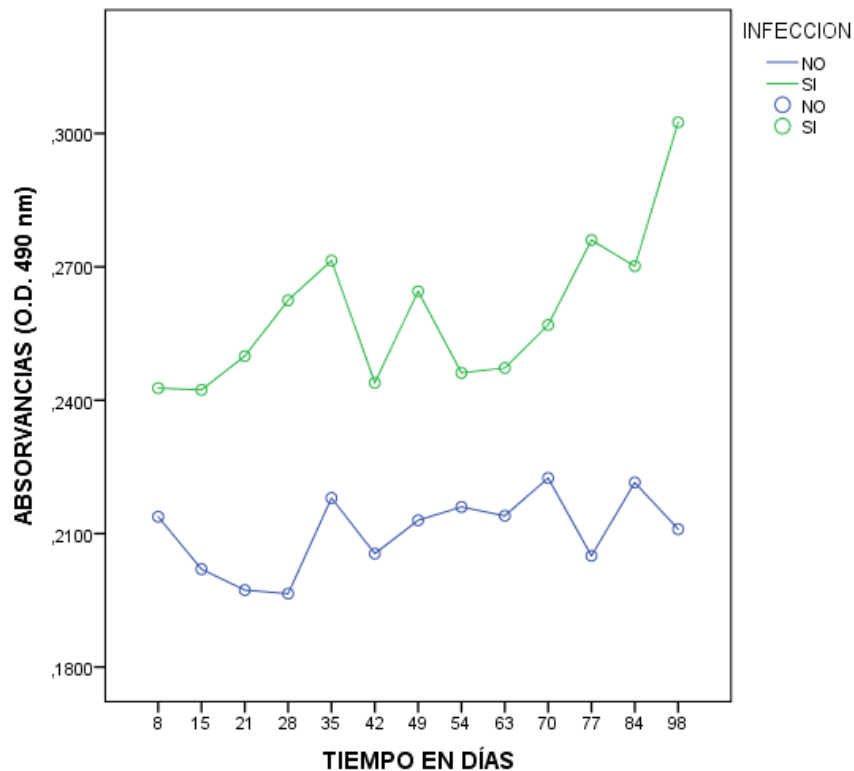


Figura N° 17: Cinética de la detección de antígenos de *T. cruzi* en suero pretratado con calor.

DISCUSIÓN

En la actualidad la enfermedad de chagas continúa siendo una de las principales causas de muerte en países endémicos de Latinoamérica (Prata, 2001). El diagnóstico se basa en pruebas serológicas que detectan anticuerpos, sin embargo, la detección de anticuerpos no es necesariamente indicativa de infección actual. Es por ello que en el presente estudio se detectó antígenos de *T. cruzi*, mediante una prueba de ELISA tipo sandwich utilizando IgG de alpacas e IgY de gallinas, como una alternativa en la determinación de la infección actual de chagas.

Dentro de las especies comúnmente empleadas para obtener anticuerpos policlonales se encuentran los conejos, y las gallinas ya que los anticuerpos que producen estas especies han sido ampliamente descritos, caracterizados y las técnicas para su purificación han sido estandarizadas (Sohrabi et al., 201; Wenlong., et al. 2017).

Varias publicaciones indican que los anticuerpos se pueden purificar por diferentes procedimientos. Así Sohrabi et al (2011) purificaron anticuerpos policlonales de conejo contra el factor VIII, empleando ácido caprílico e indicaron que es un método adecuado para purificar anticuerpos. Sin embargo, otros estudios indican que la desventaja de aplicar la técnica de precipitación con sales es que la selectividad, el rendimiento, la pureza y la reproducibilidad de la precipitación dependen de varios factores, incluidos el tiempo, la temperatura, el pH y la tasa de adición de sa. Por ello, la mayoría de las veces algunos prefieren realizarla como una etapa preliminar antes de la cromatografía en columna u otro método. En nuestro trabajo preferimos utilizar la cromatografía por afinidad en columna ya que se basa en la unión específica y

reversible de una proteína a un ligando unido a la matriz. En este caso se trata de las proteínas A, G y Y, cuyas propiedades de unión han sido bien caracterizadas. Estas proteínas se han producido de forma recombinante y se usan de forma rutinaria para la purificación por afinidad de tipos de anticuerpos clave de una variedad de especies (Jochum et al., 2008).

Vasconcellos et al (2010) utilizaron IgY policlonal de gallina como anticuerpo de detección para aprovechar propiedades tales como, la ausencia de reacciones cruzadas con anticuerpos de mamíferos y una mejor producción rentable en comparación con los mamíferos. La IgY se acumula en grandes cantidades en la yema de huevo y puede ser fácilmente purificada (Moreno-González, 2013)

Moreno-González et al (2013), purificaron anticuerpos de la yema de huevo de gallinas inmunizadas mediante dilución en agua, seguida de precipitación con sulfato de amonio al 60% y afinidad tiofílica. Para determinar la cantidad de proteína IgY presente, cuantificaron una alícuota mediante el método de Bradford y en la fracción de elución N°40 obtuvieron una concentración de 7,2 µg/µl de IgY. Ese valor es mayor al obtenido por nosotros, ya que en nuestra investigación la concentración más alta de IgY fue de 550 µg/ml en la fracción de elución N°2, probablemente porque el método de purificación por cromatografía tiofílica permitió recuperar mayor cantidad de IgY.

La SDS-PAGE utilizada por Vasconcellos et al (2010) para investigar la pureza de las preparaciones de IgY revelaron una banda con 67 kDa y otra con 25 kDa en condiciones reductoras. Delves (1994) indica que el peso molecular total de IgY es de

190 kDa, lo cual es semejante a nuestros resultados en cuanto a la purificación de IgY en condiciones no reductoras.

En los últimos 15 años el sistema inmunológico de los camélidos también ha sido un tema de gran interés. En 1993, pudieron detectarse en el suero de camélidos, mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A y proteína G, tres fracciones de IgG: una correspondiente a la IgG1 heterodimérica con una cadena pesada de 50 KDa y una liviana de 30 KDa, y dos fracciones homodiméricas de 45 KDa y 43 KDa correspondientes a las IgG2 e IgG3, respectivamente. Fue entonces a partir de estos resultados que se concluyó que los camélidos poseen, además de los anticuerpos IgG convencionales heterotetraméricos, al menos 2 isotipos de IgG homodiméricos que constan únicamente de cadenas pesadas. En estos anticuerpos, llamados IgG de cadena pesada (heavy chain IgG: hcIgG), se observan dos tipos de regiones constantes de cadena pesada, una con una región bisagra notoriamente más larga que la otra, lo que permitió distinguir la existencia de los isotipos IgG2 e IgG3 (hcIgG). En las hcIgG, el fragmento Fv queda formado únicamente por la región variable de la cadena pesada, y se denomina dominio variable de la cadena pesada (VHH). Es por ello que las alpacas pueden generar una respuesta inmune adecuada con mezclas de antígenos (Alzogaray, 2010).

Hongqiang et al (2017) mencionan que la leche de camello tiene una composición única con anticuerpos de cadena pesada de origen natural (hcIgG). Para caracterizar hcIgG en leche de camello aislaron inmunoglobulina G (IgG) de la leche de *Camelus bactrianus* mediante una combinación de cromatografía de afinidad y electroforesis

en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, para purificar y fraccionar por tamaño la proteína A y la proteína G.

En condiciones no reductoras caracterizaron anticuerpo IgG de aproximadamente 170 KDa, lo cual coincide con nuestros resultados obtenidos en la corrida electroforética de los IgG. Sin embargo, se observa otra banda muy tenue cuyo peso aproximado 48 es de KDa, que podría pertenecer a restos de peptidos contaminantes, en la corrida electroforética.

En nuestro trabajo al querer aislar los isotipos IgG2 y IgG2, no se obtuvo resultados óptimos, es por ello que solo se purificó IgG1 de alpaca, por cromatografía de afinidad con proteína G.

Grosso, et al. (2008) concluyeron que la utilización de la banda de 29 kDa proveniente del gel de poliacrilamida como inmunógeno no es adecuado ya que, si bien produce anticuerpos capaces de detectar la proteína de interés, éstos son de baja especificidad. A diferencia de este estudio, se utilizó la banda de 150-160 kDa del antígeno TESA que fue visualizada mediante transferencia Western y cortada a partir de la membrana de nitrocelulosase (descrita en la metodología) para inmunizar alpaca, conejo y gallina. Al evaluar los anticuerpos purificados contra sus respectivos antígenos mediante western blot, se observó que la IgG anti TESA de alpaca presentó las 6 bandas SAPA (130-160 KDa) características descritas por Umezawa et al. 1996. En el caso de IgG anti TESA de conejo las 6 bandas SAPA características no estuvieron completas lo cual podría deberse a la respuesta inmune del conejo. En cuanto a IgY anti TESA, se observó la presencia solo de la banda crónica (150-160

kDa), lo cual se debería probablemente a que cada especie reacciona de diferente manera ante la presencia de antígenos, en este caso de *T. cruzi*.

Corral et al. (1996) reportan que la sensibilidad de su ELISA de captura de antígenos de *T. cruzi* permitió la detección de al menos 10 ng de antígeno urinario purificado de *T. cruzi*., en cambio en nuestro trabajo obtuvimos un límite de detección de hasta 4 ng de antígeno TESA, lo cual sugiere que los anticuerpos empleados en nuestra prueba de ELISA pueden capturar bajas cantidad de antígenos de *T. cruzi*.

Por otro lado Castro-Sesquen et al (2011), reporta el uso de *Cavia porcellus* como modelo experimental en el estudio de la patogénesis y la progresión de la enfermedad de Chagas, ya que similar a los humanos con la enfermedad de chagas casi todos los cuyes sobreviven a la fase aguda, con alta parasitemia y producción de anticuerpos IgG e IgM que reconocen las bandas SAPA del parásito. En el desarrollo de la fase crónica coincide con la pérdida de anticuerpos IgM, parasitemia subpatente (quiere decir que existe pero solo es detectable con métodos de alta sensibilidad), y la aparición de nidos de amastigotes en el tejido cardíaco, similar a lo que se observa en la infección humana. Esto podría deberse a que el cuy es considerado como un reservorio natural de *T. cruzi* en localidades infestadas por el vector comúnmente conocido como “chirimacha” (Herrera, 1955).

Para comprobar la infección de los cuyes de experimentación se utilizó la técnica de microhematocrito ya que permite el diagnóstico de rutina en casos de infección transplacentaria adquirida por *T. cruzi*. Sin embargo, a pesar de sus ventajas es un

problema realizar simultáneamente varias pruebas de varios pacientes ya que el tiempo medio de observación es de 20 minutos (Freilij, et al 1987).

En la publicación de Castro-Sesquen et al (2011), al infectar cuyes con *T. cruzi* se determinó parasitemia que empezó a los 15 días y duró hasta los 55 días, siendo el pico más alto a los 20 días, lo cual difiere con nuestros resultados ya que los cuyes infectados con *T. cruzi* presentaron una parasitemia a partir del día 21 hasta el día 49, y en el día 56 ya no se observan parásitos en sangre detectables por el microscopio óptico, probablemente porque el número de parásitos circulantes se vió limitado por la respuesta inmune de los especímenes de *Cavia porcellus* infectados, sin embargo no será capaz de erradicar los parásitos (Storino y Milei 1994). Es por ello que se realizaron pruebas más sensibles como western blot que demostró la presencia de bandas SAPA indicadores de la enfermedad en fase aguda a partir del día 15 postinfección.

Los resultados obtenidos con la prueba de western blot indican que los animales presentan las bandas SAPA a partir del día 15, lo cual indica que se encuentran en fase aguda y a los 56 días se observaron bandas SAPA tenues cuando se analizó la presencia de IgM. Sin embargo, al querer detectar IgG se observa una banda crónica de peso aproximado entre 150-160 KDa siendo indicador que los especímenes de *Cavia porcellus* están en fase crónica. Así se puede determinar que la prueba de western blot y ELISA son más sensibles que la prueba de microhematocrito (Caryn et al., 2008)

Las muestras que se analizan por excelencia, para la detección de antígenos, son sueros y orinas. Sin embargo existen varios beneficios de trabajar con muestras de orinas, uno de ellos que la toma de muestra es no invasiva y reduce el riesgo de transmisión de SIDA y hepatitis. Además, se obtiene fácilmente en ambientes de recursos limitados (Minion et al., 2011).

Según algunas investigaciones como la de Castillo et al (2009) refieren que es recomendable concentrar orinas, antes de su determinación por ELISA ya que si las muestras no reciben un pretratamiento tal vez los antígenos no podrían ser detectados debido a que se encuentran en concentraciones bajas en la orina. En su trabajo compararon 4 métodos para concentrar las orinas como son: precipitación con etanol, liofilización (Hyde et al., 1989), polietilenglicol y sulfato de amonio. De los cuatro métodos utilizados, la liofilización y la precipitación con etanol arrojaron valores más altos en niveles de antígeno en comparación con la concentración de sulfato de amonio o polietilenglicol. Lo cual se relaciona con los resultados encontrados en nuestro trabajo, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los tres métodos de concentración usados. Sin embargo, el uso de minicom B-15 representa altos costos en el precio de compra y no se podría utilizar para procesar varias muestras de orina a la vez. Así que el método de concentración con etanol podría ser una alternativa por sus bajos costos. Sin embargo, la ventaja de liofilizar las muestra de orina sería su practicidad y el corto tiempo de análisis.

Corral et al. (1989), encontraron un antígeno de *Trypanosoma cruzi* eliminado en la orina de perros infectados experimentalmente, el mismo que fue detectado por Ensayo de inmunoabsorción enzimática entre 9 y 28 días después de la infección. Lo

cual coincide con nuestros resultados, a pesar de que ellos notaron parasitemia a partir del día 14. La existencia de parásitos en el tracto urinario tampoco puede descartarse (Szarfman, 1974).

Los antígenos detectados en orina podrían tener un peso molecular cercano a los límites normalmente aceptados para los mecanismos de filtración glomerular; esta función depende no sólo del tamaño, sino también de la conformación tridimensional de los restos de proteínas (Eaton y Pooler, 2013).

Castro-Sesquen et al (2016), en su estudio demostraron que los niveles de antigenuria están positivamente relacionados con niveles altos de parasitemia en humanos. Lo cual corrobora nuestros resultados, sin embargo a partir del día 84 la detección de antígenos es mayor. Probablemente, lo que sucede es que la parasitemia se reactiva y aumentan los niveles de antígenos en sangre que luego son excretados por la orina. En nuestros resultados los títulos de antígeno elevados en orinas de cuyes a los 8 días pueden estar relacionados al alto grado de infección o carga parasitaria. Los componentes de *T.cruzi* podrían liberarse como antígenos libres en el torrente sanguíneo del huésped infectado y luego eliminarse en la orina, conservando intactas sus propiedades antigénicas. Probablemente la selectividad de la barrera de filtración esta basada en el tamaño molecular y la carga eléctrica (Eaton y Pooler, 2013).

Después del período agudo de la infección, el crecimiento de *T. cruzi* es controlado por el huésped y los parásitos ya no son detectables en grandes cantidades en la sangre. En el proceso de la infección, la generación de anticuerpos para inhibir la

enzima de los parásitos debe ser esperada con el fin de controlar la infección (Leguizamón, M. 1994).

Los inmunocomplejos son agregados constituidos tras la reacción antígeno-anticuerpo. Son capaces de activar y ligar complemento, observándose un descenso del complemento total y sus fracciones, en suero. Los IC pueden ser solubles (IC circulantes si existe exceso de antígeno y luego depositados en los capilares de los órganos) o insolubles (cuando existe exceso de Ac y quedan fijos). Las lesiones tisulares producidas por los IC suelen comenzar por alteraciones de la membrana basal vascular (ej.: en los glomérulos renales) y una reacción inflamatoria mediada por complemento y los neutrófilos; en otros casos, por los macrófagos sin intervención del complemento.

Mientras la determinación de anticuerpos proporciona una prueba indirecta de la infección, la detección de fracciones antigénicas del parásito en el huésped, puede considerarse equivalente como método de diagnóstico, al hallazgo del parásito entero. Además, la identificación de antígenos e inmunocomplejos circulantes posibilita un diagnóstico precoz en la etapa temprana de la infección, previamente a la producción de anticuerpos específicos en niveles detectables. (Petray et al, 1992)

Paz-Silva et al. (2003) demostraron, en un estudio cinético, la detección de antígenos en suero sanguíneo para otra parasitosis, los mismos que aparecen con altos niveles, en el transcurso de la segunda semana de infestación y luego desaparecen rápidamente en semanas posteriores (1-5 semanas después de la infección), para tal hecho explican que desde la fase de penetración las formas invasivas del parásito

excretan antígenos que pasan directamente a la circulación constituyendo un importante estímulo al sistema inmunológico del hospedero, que rápidamente genera la producción de anticuerpos específicos contra estos antígenos, por lo que la disminución de antígenos en suero sanguíneo en semanas posteriores puede estar relacionada con la formación de complejos inmunes entre los antígenos del parásito adulto y los anticuerpos del hospedero, lo cual los hace indetectables por esta técnica al tener estos compartidos sus epitopes de reconocimiento. En nuestro estudio se detectaron antígenos parasitarios con tendencia a aumentar.

Con ELISA de captura se encontraron títulos bajos de antígenos de *T. cruzi* en suero, probablemente debido a la formación de inmunocomplejos que disminuyen la biodisponibilidad de los antígenos (Jarvis et al, 2011). Sin embargo, en pruebas preliminares con sueros de humanos se obtuvieron resultados óptimos (datos no se mostrados en el presente estudio).

CONCLUSIONES

- La purificación de anticuerpos de *Vicugna pacos* (alpaca), *Oryctolagus cuniculus* (conejo) y *Gallus gallus domesticus* (gallina) a través de cromatografía de afinidad permitió obtener IgG e IgY de alta pureza lo cual está refrendado por electroforesis y por western blot.
- Mediante la prueba de Elisa se probaron varias combinaciones de duplas de anticuerpos, de las cuales se seleccionaron a IgY anti proteína de membrana (4 µg/ml) de *Gallus gallus domesticus* (gallina) como anticuerpo de captura y a IgG anti TESA (4 µg/ml) de *Vicugna pacos* (alpaca) como anticuerpo de detección, por ser las más adecuadas para la detección de antígenos de *T. cruzi*. Las condiciones más óptimas las obtuvimos con conjugado antillama a una dilución de 1/7500, buffer de bloqueo compuesto por PBST más leche semidescremada al 6% y BSA 1%, y el sustrato fue orto-fenilendiamina.
- El límite de detección del antígeno TESA en muestra de orina contaminada artificialmente fue de 4 ng.
- La técnica de microhematocrito permitió detectar tripomastigotes en sangre de *Cavia porcellus* infectado mediante inyección intradérmica de tripomastigotes de *T. cruzi*
- Los métodos empleados para la concentración de orinas no muestran diferencias significativas en la cinética de detección de antígenos de *T. cruzi* mediante la prueba de ELISA de captura.

- La cinética de detección de antígenos en orinas y sueros, presenta diferencias significativas entre las muestras de sueros de cuyes (*Cavia porcellus*) infectados y sanos.

RECOMENDACIONES

- Extender el periodo de experimentación hasta 1 año, para obtener una curva más detallada en fase crónica de la enfermedad.
- Al utilizar los anticuerpos evitar los procesos de congelamiento y descongelamiento ya que eso provoca la disminución de concentración proteica.
- Marcar el anticuerpo policlonal de captura es decir anticuerpo de alpaca anti-TESA con peroxidasa HRP utilizando un kit de conjugación para disminuir la señal de ruido y disminuir el background.
- Aplicar la técnica de ELISA estandarizada, a muestras de sueros y orinas de pacientes humanos infectados con chagas.

FINANCIAMIENTO:

La presente tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú- contrato N° 239-FINCyT-IA-2013

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, G.; Ribas, M.; Tejero, Y.; Vázquez, S.; Piedra D. y Cordero, Y. 2008. Estandarización de un ELISA de captura para la detección de anticuerpos de tipo IgM al virus de la parotiditis. *Revista Cubana de Medicina Tropical*
- Alarcón, C., Hurtado, H. 2000. Anticuerpos aviáres: Alternativa en producción y diagnóstico. *Biomedica*. 20:338-43.
- Alberti, E. 2004. Estudio de la inmunogenicidad y capacidad protectora de una biblioteca genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi* en ratones BALB/c. Trabajo de tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas. La Habana.
- Alzogaray, V. 2010. Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires
- Arrieta R, Daquino B, Rosso N, Ferreras MG, Juárez N. Evaluación de una metodología de tamizaje en la enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina. *Salud Publica Mex* 2004; 46:430-437.
- Aristizabal P., H. 2015. Inmunoidentificación de antígenos de *T. cruzi* usando sueros de pacientes crónicos infectados. Tesis de Maestría. Berlin.
- Ayala, A. 2011. La Enfermedad de Chagas en España:Paradigma de una enfermedad emergente.Universidad Complutense de Madrid.Facultad de Medicina.España.

- Barbarú, A.D; Miranda, G y Rodríguez Diego, J G. 2015. Kinetic of the detection of antigens for ELISA in faeces of natural infested calves, with *Dictyocaulus viviparus*. REDVET Rev. Volumen 16 N° 2
- Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bern, C.; Verastegui, M.; Gilman, R.; LaFuente, C.; Galdos-Cardenas, G.; Calderon, M.; Pacori, J.; Abastoflor, M.; Aparicio, H.; Brady, M.; Ferrufino, L.; Angulo, N.; Marcus, S.; Sterling, Ch. y Maguire, J. 2009. Congenital *Trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49:1667–74
- Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. 2008. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 21: 476–82.
- Caballero, Z.; Sousa O.; Marques, W.; Saez-Alquezar, A.; y. Umezawa, E. 2007. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clinical and vaccine immunology*, p. 1045–1049 Vol. 14, No. 8
- Cabrera, A. 2004. Uso de antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes (TESA) de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de chagas. Tesis para optar al título de Química Bióloga. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A.; Vega, S.; Ancca, J.; Pinto, J.; Vela, G.; Cárdenas, V.; Ruiz, J.; Alva, P.; Ruiz, J.; Alvarado, A.; Arévalo, H.; Cruzado, F.; Vela, F. y Náquira, C. 2010.

Entomological aspects of Chagas disease in Huallaga and Picota, San Martin, Peru.
Anales de la Facultad de medicina.de la UNMSM.

- Camargo, M.; Segura, E.; Kagan, I.; Pacheco-Souza J.; Carvalheiro, J.; Yanovsky J. 1987. Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Las Américas: evaluación de tres años de colaboración. Bol Oficina Sanit Panam; 102:449-463.
- Castro-Sesquen, Y.; Gilman, R.; Yauri, V.; Angulo, N.; Verastegui, M.; Velásquez, D.; Sterling, Ch.; Martin, D.; y Bern, C. 2011. *Cavia porcellus* as a Model for Experimental Infection by *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Pathology*, Vol. 179, No. 1
- Castro-Sesquen, Y.; Gilman, R.; Galdos-Cardenas, G.; Ferrufino, L.; Sánchez, G.; Valencia Ayala, E.; Liotta, L.; Bern, C. y Luchini, A. 2016. Use of a Novel Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) for Diagnosis of Congenital Chagas Disease. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003211>. Revista PLOS.
- Castillo, Y.; Rodriguez, S.; García, H.; Brandt, J.; Van Hul, A.; Silva, M.; Rodriguez-Hidalgo, R.; Portocarrero, M.; Melendez, P.; Gonzalez, A.; H. Gilman, R.; Dorny, P. 2009. Antigen Detection for the Diagnosis of Human Neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(3), pp. 379–383
- Carey, W.; Artwohl, J. y Taylor, B. 2015. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*.
- Caryn Bern. 2011. Antitrypanosomal "Therapy for Chronic Chagas' Disease. *The new england journal of medicine*." June 30; 364: 2527-34.

- Caryn B.; Montgomery S.; Katz, L.; Cagliotic, S. y Stramerd, S. 2008. Chagas disease and the US blood supply. *Tropical and travel-associated diseases*. 21:476–482
- Corral, R.; Orn, A. et al. 1989. Purification and Characterization of an 80-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Urinary Antigen. *Journal of clinical microbiology*. p. 145-151
- Corral, R.; Altcheh, J.; Alexandre, A.; Grinstein, S.; Freilij, H. y Katzin, A. 1996. Detection and Characterization of Antigens in Urine of Patients with Acute, Congenital, and Chronic Chagas' Disease. *Journal of clinical microbiology*. p. 1957–1962
- Cerna, E.; Ochoa, Y.; Mendoza, R.; Badii, MH.; Gallegos, G.; Landeros, J. 2010. Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. *Revista internacional de botánica experimental international journal of experimental botany*. vol. 79: 147-152
- Da Silveira, J. F.; Umezawa, E. S. y Luquetti, A. O. 2001. Enfermedad de chagas: Antígenos recombinantes de *T. cruzi* para el diagnóstico serológico. *Trends Parasitol* 17, 286-291.
- Delves, P. 1994. *Inmunología celular*. Publicado en Reino Unido por Bios scientific Publishers limited.
- Dopico, J.; Álvarez, M.; Juvier, A.; Trujillo, J.; Reyes, G.; Pico, M.; Casadelvalle, I.; Y Giralдино, I. 2012. Anticuerpos Ig Y en ensayos de látex-aglutinación. *VacciMonitor* 21(2):10-15

- Eaton, D. y Pooler, J. 2013. *Vanders Renal Physiology* (Lange Medical Books) Eighth Edition. Mc Graw Hill Education.
- Estrada, C. y Rodas, J. 2012. Tamizaje neonatal de la enfermedad de chagas en la República de Guatemala. Adaptación y evaluación del método serológico. Estudio piloto en 4 centros de atención de salud del área endémica. Seminario de investigación. Guatemala.
- Fadeel, M. et al. 2004. Detection of Cytomegalovirus in Urine Samples by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibody against the Viral 150-Kilodalton Protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(3), 2004, pp. 323–328. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene
- Farfán-García, A., Castellanos-Domínguez, Y.; Luna-Marín, K. y Angulo-Silva, V. 2013. Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. salud pública.* 15 (2): 208-219
- Freilij, H.; Corral, R.; Katzin A.; y Grinstein, S. 1987. Antigenuria in Infants with Acute and Congenital Chagas Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 25, No. 1. p. 133-137
- Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T., Hubscher, U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB. J.* 4:2528-2532.
- Grosso, M.C.; Cuello, M.F.; Martínez, R.A.; Henklein, C.R.; Schade, R.; Vivas, A. 2008. Specificity evaluation of polyclonal avian and mammalian anti-porcine early pregnancy factor antibodies. *Inmunologi* 27:1-10 - DOI: 10.1016/S0213-9626(08)70044-1

- Herrera, A. 2011. Las Inmunoglobulinas G de los camélidos y sus aplicaciones. Revisión bibliográfica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria
- Herrer, A. 1955. Trypanosomiasis americana en el Perú. III. Importancia del cobayo como reservorio de la enfermedad de Chagas en la región sudoccidental. Rev. perú. med. exp. salud publica v.9 n.1-2 Lima
- Hyde, F.; Johnson, R.; White, T. y Shelburne, CH. 1989. Detection of Antigens in Urine of Mice and Humans Infected with *Borrelia burgdorferi*, Etiologic Agent of Lyme Disease. Journal of clinical Microbiology. p. 58-61 Vol. 27, N° 1
- Holguín, A.; Norman, F.; Martín, L.; Mateos, M.; Chacón, J.; López-Vélez, R. y Pérez-Molina, J. 2013. Dried Blood as an Alternative to Plasma or Serum for *Trypanosoma cruzi* IgG Detection in Screening Programs. Clinical and Vaccine Immunology. Vol. 20. Pág. 1197–1202
- Instituto Nacional de Salud. 2005. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiosis americana (Enfermedad de Chagas). Serie de Normas Técnicas N° 26. Lima.
- Jackson Y.; Myers C.; Diana A.; Marti H. P.; Wolff H.; Chappuis F., et al. 2009. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. Emerg Infect Dis. Apr;15(4):601–3
- Jazin EE, Luquetti AO, Rassi A, Frasch ACC (1991) Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. Infect. Immun 59: 2189–2191.

- Jarvis, J. y et al. 2011. Evaluation of a Novel Point-of-Care Cryptococcal Antigen Test on Serum, Plasma, and Urine from Patients with HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. *Rev. HIV/AIDS*. 2011:53. 1023
- Katzin, M. 1993. Detección de antígenos circulantes en pacientes chagásicos y maláricos. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Sao Paulo. Brasil. Volumen 3
- Hongqiang YAO, Min ZHANG, Yi LI, Jirimutu YAO, He MENG and Siriguleng YU. 2017. Purification and quantification of heavy-chain antibodies from the milk of bactrian camels. *Animal Science Journal*. doi:10.1111/asj.12772
- HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P.y REMINGTON, J. 1989. Detection of Antigens in Urine during Acute Toxoplasmosis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, May 1989, p. 1099-1101
- Jochum, Ch.; Best, M.; Stone, D., Scott S., Storb, R. 2008. Development and in vitro characterization of canine CD40-Ig. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123, 260–265
- Lagrange, P. Calabrese, K. Alencar, A. Goncalves da Costa, S. 1992. The colonization of cartilage by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 87:115-16.
- Larsson A., Karlsson-Parra, A. y Sjöquist, J. 1991. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry* 37, 411-414

- Lescure, F.; Loup, G.; Freilij, H; Develoux, M.; Paris, L.; Brutus, L. (2010). Chagas disease: Changes in knowledge and management. *Lancet Infection Disease*, 10, 556-570.
- Leguizamon, M.; Campetella, O.; Gonzalez, E. y Frasc, C. 1994. Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* Produce Antibodies against the Enzymatic Domain of trans-Sialidase That Inhibit Its Activity. *Infection and immunity*. Vol. 62, No. 8. p. 3441-3446
- Lindsley, H. 1981. Detection and Composition of Immune Complexes in Experimental African Trypanosomiasis. *Infection and immunity*. p. 407414
- Machado-de-Assis, G.; Silva, A.; Bem, V.; Bahia, M.; Martins-Filho, O.; Dias, P.; Albajar-Viñas, C; Torres, R. y Lanaa, M. 2012. Posttherapeutic Cure Criteria in Chagas Disease: Conventional Serology followed by Supplementary Serological, Parasitological, and Molecular Tests. *Clinical and Vaccine Immunology*. Volume 19 p. 1283–1291
- Merino, F.; Martínez-Ruiz, R.; Olabarrieta, I; Merino, P.; García-Bujalance, S.; Gastañaga, T.; y Flores-Chavez, T. 2013. Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* / Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas y sus hijos. *Revista Española de Quimioterapia* 26(3):253-260.
- Minion, J.; Leung, E.; Talbot, E.; Dheda, K.; Pai, M. y Menzies, D. 2011. Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011; 38: 1398–1405

- Moretti, E.; Basso, B.; Gil, P.; Vaca, B.; Jacqueline, J.; Yasenzanero, P. 2004. Detección de anticuerpos para Chagas y Toxoplasmosis en trasudado mucoso oral. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 38 (2): 159-63
- Moreno-González, P.; Díaz, G.; Ramírez-Hernández, M. 2013. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD⁺. *Revista colombiana de química*
- Morrison, S.L., Mohammed, S.M., Wims, L.A., Trinh, R., Etches, R. 2001. Sequences in antibodies molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.* 38:619-625.
- Murray M., Murray P.K. y MCyntire W.I.M. 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 325–326.
- OMS. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas, 2005. WHO. 2007. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf
- Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. La Salud en Las Américas. 1998. Washington D.C.: OPS/ OMS. pp. 1–14 (Publicación Científica No. 569).
- Palacios, X.; Belli, A.; Espino, A. 2000. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 8(6).

- Paz-Silva A.; Sanchez-Andrade R.; Suarez J. L.; Pedreira, J.; Arias, M.; Lopez C.; Panadero r.; Dí'az P.; Dí'ez-Baños P. y Morrondo, P. 2003. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol Res* (2003) 91: 328–331 DOI 10.1007/s00436-003-0961-z
- Pereira K. S.; Schmidt F. L.; Guaraldo A. M.; Franco R. M.; Dias V. L.; Passos L. A. 2009. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72: 441–46.
- Petray, P.; Bonardello, N.; Clark, R.; Agranatti, M.; Corral, R. y Grinstein, S. 1992. Evaluación del método de ELISA para la detección de antígenos y complejos circulantes de *Trypanosoma cruzi* a través de un estudio de campo en una zona endémica de Argentina. *Rev. Inst. Med Trop Sao Paulo*. 34(2): 141-147
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92–100
- Rassi Jr.; Rassi A.; y Marin-Neto, J. A. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–402.
- Romano, P.; Cueto, J.; Casassa, A.; Vanrell, M.; Gottlieb, R. y Colombo, M. 2012. “Critical Review: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/Host Cell Interplay” *IUBMB Life*, May. 64(5): 387–396.
- Rothbauer U. et al. 2006. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3(11): 887-889.
- Soltis, R.; Hasz, D.; Morris, M. y Wilson, I. 1979. The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulins. *Immunology* 36- 37

- Shimizu, M.; Nagashima, H.; Sano, K.; Hashimoto, K.; Ozeki, M.; Tsuda, K. y Hatta, H. 1991. Molecular Stability of Chicken and Rabbit Immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2), 270-274.
- Schade, R. et al. 2005. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA* 33, 1–26
- Sohrabi S, Akbarzadeh A, Norouzian D, Farhangi A, Mortazavi M, Mehrabi MR, Chiani M, Saffari Z, Ghassemi S. 2011. Production and Purification of Rabbit's Polyclonal Antibody Against Factor VIII. *Indian J Clin Biochem* 26(4):354–9. pmid:23024470
- Szarfman, A.; Cossio, P.; Arana, R.; Urman, J.; Kreutzer, E.; Laguens, R.; Segal, A. y Coarasa, L. 1975. Immunologic and Immunopathologic Studies in Congenital Chagas Disease. *Clinical immunology and immunopathology* 4,489-499
- Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2001;15(9):708-12
- Storino R. y Milei J. 1994. Enfermedad de Chagas (Capítulo 1: Introducción). Ed. Mosby-Doyma, Buenos Aires.
- Umezawa E. S.; Nascimento M. S.; Kesper N. Jr.; Coura J.R.; Borges-Pereira J.; et al. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *Journal of clinical Microbiology* 1996. 34(9): 2143–7.

- Umezawa, E., Nascimento, M., Stolf, AM. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease., Volume 39, Issue 3, March 2001, Pages 169–176
- Vasconcellos, F.; Coutinho, M.; da Silva, É.; Fernandes, C.; Leonardo P.; Monte; Seyffert, N.; Dellagostin, O. Y Aleixo, J. 2010. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104 (2010) 259–264
- Wenlong Xia, Huipeng Lu, Yangyang Li, Jun Cao, Xiaohui Zhou, Xinyu Zhang, Xiaoli Xia, Huaichang Sun. 2017. Purification of chicken IgY by binding capture using elastin-like polypeptide-tagged immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G. Veterinary Immunology and Immunopathology.
- Wernery, U. 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the newborn – A Review. J Vet Med B, 48:561–568.