

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo y evaluación de diferentes
plataformas diagnósticas para la detección de la
Enfermedad de Chagas connatal”**

Luz María Peverengo

Director de Tesis: Dr. Iván Marcipar

Co-director de Tesis: Dr. Claudio Berli

Lugar de realización: Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y
Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

-2023-

Agradecimientos

Llegó el momento de expresar mis agradecimientos... por dónde empezar!

En primer lugar, quiero agradecer a la FBCB-UNL, INTEC y CONICET por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado, contribuyendo a mi formación como profesional.

Mi director Iván y mi co-director Claudio, gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo mi doctorado con Uds. Gracias por compartirme su experiencia, sabiduría, por darme consejos y estar siempre disponibles cuando los necesite. Iván, gracias por estar presente día a día siguiendo de cerca cada ensayo, por cada charla compartida con una fuente inagotable de ideas y proyectos. Claudio, gracias por transmitirme tu energía y motivación para seguir trabajando con entusiasmo.

Al Hospital J.B. Iturraspe, Hospital Gutierrez y al LaPE de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNSa por haber proporcionado las muestras tan valiosas que fueron esenciales para llevar a cabo los ensayos propuestos para la Tesis. También quiero agradecer especialmente a mis adoradas amigas Luz Rodeles y Estefy Schreier, por su ayuda en la recolección de muestras.

A Cami y Agus quienes formaron parte de varios ensayos de esta Tesis, estoy muy agradecida de haber tenido la oportunidad de trabajar con Uds. También quiero agradecer a Adrián por su trabajo en el análisis bioinformático. Y Nare, millones de gracias por introducirme y enseñarme el mundo de las “tiritas”. Por la paciencia y estar al lado hasta el último día de ensayo.

A mis queridos compañeros del LTI, cuanto que los quiero! Su compañía ha sido fundamental en todo este tiempo. La calidad humana que tienen es inmensa. No solo compartimos los días dulces sin dulce de leche (saben lo mucho que los quiero!), sino que también hemos compartido momentos de risas, apoyo, amistad y sabiduría. Sin lugar a duda, mi formación ha sido enormemente enriquecida gracias a todos ustedes.

Nico, mi compañero de vida, incondicional. Valoro mucho tu esfuerzo por tratar de comprender del mundo del diagnóstico para poder entender mis ensayos y mis caras largas cuando algo no resultaba. Tu amor, paciencia y sostén significan todo para mí. Gracias mi

amor por estar siempre acompañando, conteniendo y apoyándome en todo lo que me propongo hasta el final.

Pedro Andrés, mi peque travieso. Revolucionaste mi mundo con amor y energía desde el momento en que llegaste en la recta final de mi doctorado. Sos mi motivación diaria. Cada momento que compartimos es invaluable y los atesoro en mi corazón. Sos maravilloso hijo, te amo inmensamente!

A mi familia y amigos, quienes, aunque quizás no comprendan completamente mi trabajo (jaja), siempre me han acompañado en mis metas y proyectos. Su amor y apoyo hasta el último momento han sido fundamental en este proceso. Los quiero con todo mi corazón!

Estoy inmensamente feliz de contar con todos Uds. y de que formen parte de mi vida.

Muchas pero muchas gracias!

Aportes científicos-tecnológicos

Patente:

Iván Marcipar, **Luz María Peverengo**, Luz María Rodeles, Miguel Vicco. Solicitud patente de invención, poder inscripto en el I.N.P.I bajo el número: 20190103139, “Un método in vitro de detección de Chagas”, 2019, Argentina.

Iván Marcipar, **Luz María Peverengo**, Luz María Rodeles, Nazarena Pujato. Solicitud patente de invención, poder inscripto en el I.N.P.I bajo el número: 20210102149, “Proteína Quimérica”, 2021, Argentina.

Publicaciones:

Luz María Peverengo, Valeria Garcia, Luz María Rodeles, Diego Mendicino, Miguel Vicco, Claudia Lagier, Verónica Gonzalez, Luis Gugliotta, Iván Marcipar. Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*. 2018 Febrero; DOI: 10.1017/S0031182018000458.

García VS, **Peverengo L**, Peretti LE, González VDG, Gugliotta LM, Dalla Fontana ML, Marcipar IS, Lagier CM. An improved approach to estimate the avidity index of immunoglobulins: Evaluation of the method using IgG anti-Toxoplasma gondii. *J Immunol Methods*. 2018 Marzo; DOI: 10.1016/j.jim.2018.03.008.

Luz María Peverengo, Luz María Rodeles, Camila Maldonado, Griselda Ballering, Nazarena Pujato, Indira D’Amico, Miguel Hernan Vicco, Luciana Garcia, Laura Jurado, Jaime Altcheh, Ivan Marcipar. Congenital chagas disease: Development and assessment of a specific IgM capture-based assay for diagnosis of transmission. *Acta Tropica*. 2020 Noviembre; DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105738.

Luz María Rodeles, Maximiliano Castro, María Ayelen Gaitán Zamora, Roberto Savarino, **Luz María Peverengo**, Estefanía Soledad Prochetto, Iván Marcipar, Pablo Arias, Miguel Hernán Vicco. Increased epicardial adipose tissue thickness associated with increased metabolic risk and the presence of heart failure in patients with Chronic Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021 Enero; DOI: 10.1093/trstmh/traa189.

Luz María Rodeles, Miguel Hernán Vicco, Álvaro Siano, Leonardo Andrés Fuchs, **Luz María Peverengo**, Silvia Sanchez Puch, Cora Beatriz Cymeryng, Iván Sergio Marcipar, Pablo Arias. Functional Autoreactive Anti- β 2 Adrenergic Antibodies May Contribute to Insulin Resistance Profile in Patients with Chronic Chagas Disease. *Pathogens*. 2021 Marzo. DOI: 10.3390/pathogens10030378.

Federico Schaumburg, Nazarena Pujato, **Luz María Peverengo**, Iván Sergio Marcipar, Claudio Luis Alberto Berli. Coupling ELISA to smartphones for POCT of chronic and congenital Chagas disease. *Talanta*. 2022 Diciembre; DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124246

Acuerdo de transferencia de material biológico:

Ivan Marcipar, Luz Maria Rodeles, **Luz Maria Peverengo**. Desarrollo y obtención del material transferido entre la UNIVERSIDAD NACIONAL del LITORAL y la Foundation for Innovative New Diagnostics “FIND”, Descripción del material transferido: Proteínas quiméricas que han sido empleadas para diagnóstico de Chagas por método de ELISA mediante detección de IgG anti-*T.cruzi*.

Índice

Abreviaturas y símbolos	8
Resumen.....	10
I. Antecedentes de la problemática de la enfermedad de Chagas e importancia del desarrollo de plataformas diagnosticas para la detección de la enfermedad de Chagas vertical en niños.....	12
I.1 Enfermedad de Chagas.....	13
I.1.1 Agente etiológico: <i>T. cruzi</i>	13
I.1.2 Vías de transmisión de <i>T. cruzi</i>	15
I.1.3 Patogénesis de la infección	16
I.1.4 Tratamiento de la infección.....	17
I.2 Enfermedad de Chagas vertical.....	17
I.2.1 Tratamiento en niños.....	18
I.3 Diagnóstico	18
I.3.1 Diagnóstico de Chagas crónico.....	18
I.3.2 Diagnóstico de la infección aguda y vertical por <i>T. cruzi</i>	20
I.3.3 Diagnostico mediante la detección de Ac IgM	22
I.3.4 Otros diseños diagnósticos.....	22
I.4 Plataformas diagnosticas para llevar cerca del paciente	22
I.4.1 Diagnóstico basado en comunicaciones.....	23
I.4.2 Acoplamiento de la Tecnología	24
1. Capítulo 1: Diseño y obtención de proteínas recombinantes de <i>T. cruzi</i> y conjugado del antígeno CP4.....	27
1.1 Introducción	28
1.1.1 Proteínas recombinantes en el diagnóstico de infecciones y en la enfermedad de Chagas	29
1.1.2 Antígenos utilizados en el presente trabajo.....	30
1.1.3 Conjugación de proteínas.....	32
1.2 Objetivos del capítulo 1	35
1.3 Materiales y métodos:	36
1.3.1 Diseño y obtención de la proteína recombinante CP4	36
1.3.2 Proteínas recombinantes CP1, CP3, P2 β , B13, TSNT y TSf:	40
1.3.3 Panel de suero	40
1.3.4 Evaluación de la reactividad del antígeno CP4 obtenido	41
1.3.5 Conjugación de CP4 con Biotina	42
1.4 Resultados	44

1.4.1	Obtención de la proteína recombinante CP4.....	44
1.4.2	Evaluación del comportamiento antigénico de CP4	48
1.4.3	Conjugación del antígeno CP4 a Biotina	49
1.5	Discusión.....	50
2.	Capítulo 2: Desarrollo de un ensayo de ELISA de captura para la detección de IgM específica frente a los antígenos de <i>T. cruzi</i>	52
2.1	Introducción:.....	53
2.1.1	Ac IgM anti- <i>T. cruzi</i> en la enfermedad de Chagas vertical	53
2.1.2	Acoplamiento de ELISA a teléfonos inteligentes para pruebas en el punto de atención (POC).....	54
2.2	Objetivos del capítulo 2:	55
2.3	Materiales y métodos:	56
2.3.1	Panel de suero para evaluación de Ac anti-IgM específicos de <i>T. cruzi</i> (Panel M):.....	56
2.3.2	Panel de sueros extendido (Panel M extendido):	57
2.3.3	Desarrollo de ELISA de captura de IgM.....	58
2.3.4	ELISA de captura de IgM utilizando CP4-B	60
2.3.5	ELISA de captura de IgM utilizando Ac anti-Histidina-HRP (Invitrogen)	62
2.3.6	Acoplamiento de la lectura del ensayo de ELISA a smartphones (ELISA POCT)	63
2.4	Resultados	65
2.4.1	Desarrollo de ELISA de captura de IgM.....	65
2.4.2	ELISA de captura de IgM con CP4-B.....	71
2.4.3	ELISA de captura de IgM con anti-HIS _{HRP} (Invitrogen)	72
2.4.4	Comparación de los ensayos de ELISA de captura de Ac IgM evaluados:	73
2.4.5	ELISA POCT	74
2.5	Discusión.....	77
3.	Capítulo 3: Uso del Ag de fase aguda SAPA y el Ag TS para la determinación de la infección aguda por <i>T. cruzi</i> en el recién nacido mediante la determinación de IgG específicas.....	82
3.1	Introducción	83
3.1.1	Diagnóstico de infecciones agudas mediante la detección de anticuerpos IgG	83
3.1.2	Criterios para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la etapa aguda mediante la detección de Ac IgG.....	84
3.1.3	Correlación y relación de transferencia de Ac maternos hacia los bebés	86
3.2	Objetivos del capítulo 3	88
3.3	Materiales y Métodos.....	89
3.3.1	Paneles de sueros para evaluación de Ac anti-IgG específicos de <i>T. cruzi</i> :.....	89
3.3.2	Antígenos recombinantes utilizados	90
3.3.3	Análisis de la secuencia SAPAx4	91
3.3.4	Evaluación de los Ag SAPA recombinantes mediante ensayos de ELISA.....	91
3.3.5	Estrategia 1: ELISA SAPA/TS	92

3.3.6	Estrategia diagnóstica 2: ELISA de Avidéz IgG anti-SAPA	94
3.4	Resultados	96
3.4.1	Análisis de la secuencia SAPAx4	96
3.4.2	Evaluación del Ag SAPAx4.....	99
3.4.3	Comparación de los Ag SAPAx4 y SAPAx13	100
3.4.4	Estrategias diagnósticas propuestas	101
3.4.5	Estrategia 1: ELISA SAPA/TS	101
3.4.6	Estrategia 2: ELISA de Avidéz.....	104
3.4.7	Comparación de las estrategias de ELISA evaluadas	106
3.5	Discusión.....	108
4.	Capítulo 4: Desarrollo de un ensayo de IFL para la detección de IgM específica frente a los antígenos de <i>T. cruzi</i>	114
4.1	Introducción	115
4.1.1	Dispositivos de diagnóstico POC.....	115
4.1.2	Inmunoensayos de flujo lateral (IFL).....	115
4.1.3	IFL para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	116
4.1.4	Anticuerpos IgM presentes en muestra de cordón umbilical y bebé.....	117
4.2	Objetivos del capítulo 4	118
4.3	Materiales y Métodos.....	119
4.3.1	Panel de suero IFL:	119
4.3.2	Síntesis de partículas de oro coloidal (GNPs).....	120
4.3.2	Preparación del Ac anti-IgM humana conjugado a GNPs (anti-IgM _{hu} /GNPs).....	120
4.3.3	Preparación del Ag CP4 conjugado a GNPs (CP4/GNPs) y del Ac IgG de conejo conjugado a GNPs (IgG _{con} /GNPs).....	121
4.3.4	Ensamblado de la matriz de ensayo de IFL	121
4.3.5	IFL: estrategia 1	123
4.3.6	IFL: estrategia 2	124
4.4	Resultados	125
4.4.1	Síntesis de las GNPs	125
4.4.2	Conjugado anti-IgM _{hu} /GNPs.....	125
4.4.3	Conjugado IgG _{con} /GNPs.....	126
4.4.4	Conjugado de CP4/GNPs.....	127
4.4.5	IFL estrategia 1	128
4.4.6	IFL estrategia 2	129
4.5	Discusión.....	131
5.	Conclusiones	134
6.	Bibliografía	135
7.	ANEXO: Información complementaria	148

Abreviaturas y símbolos

- °C: grados centígrados
- µg: microgramos
- µL: microlitros
- aa: aminoácidos
- Ac: anticuerpo
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- Ag: antígeno
- AUC: área bajo la curva
- BB: bebé
- BCA: ácido bicinconínico
- BSA: albúmina sérica bovina
- Bz: benzimidazol
- Ch+: Chagas positivo
- Ch-: Chagas negativo
- CP1: proteína quimérica 1
- CP3: proteína quimérica 3
- CP4: proteína quimérica 4
- Da: *Daltons*
- DO: densidad óptica
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EC: enfermedad de Chagas
- ECv: enfermedad de Chagas vertical
- ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- Es: especificidad
- eq par/mL: equivalentes de parásitos por mililitros
- FN: falso negativo
- FP: falso positivo
- g: gramos
- GCP: grupo control positivo
- GCN: grupo control negativo
- GNPs: nanopartículas de oro coloidal
- GPS: sistema de posicionamiento global
- h: hora
- HAI: hemoaglutinación indirecta
- His: histidina
- HRP: peroxidasa de rábano
- IA: índice de avidéz
- IDON: DO de la muestra en relación con el valor de *cut-off*
- IFI: inmunofluorescencia indirecta
- IFL: inmunoensayo de flujo lateral
- IgG: inmunoglobulina de tipo G
- IgM: inmunoglobulina de tipo M
- IMAC: cromatografía de afinidad por ion metal inmovilizado
- IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
- J: índice de Youden
- Kan: kanamicina
- kDa: kilodaltons

- LB: medio de cultivo Luria Bertani
- LC: línea de corte
- LFIA: *lateral flow immunoassay*
- L: litro
- LR: *likelihood ratio*
- MAP: proteína de unión a microtúbulos
- MH: microhematocrito
- min: minutos
- mL: mililitros
- mM: milimolar
- MM: mamá
- nm: nanómetro
- Nf: Nifurtimox
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ON: *over night*
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
- pb: pares de bases
- PBS: *buffer* fosfato salino
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- POCT: *point of care testing*
- qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real
- REASSURED: asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipo y entregable a los usuarios finales, para tener conectividad en tiempo real y fácil recolección de muestras
- rpm: revoluciones por minuto
- ROC: *receiver operating characteristic curve*
- SAPA: antígeno repetitivo de la fase aguda
- Se: sensibilidad
- SDS: dodecilsulfato de sodio
- SIA: ácido siálico
- *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*
- *T. gondii*: *Toxoplasma gondii*
- TDC: tecnología de diagnóstico y comunicación
- TDRs: *test* de diagnóstico rápido
- TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina
- TS: Trans-sialidasa
- TSf: fragmento carboxilo terminal de la TS
- TSNt: fragmento amino terminal de la TS
- TSSA: antígeno pequeño de superficie
- UDT: unidades discretas de tipificación
- USB: universal serial bus
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

La transmisión vertical es la principal vía de contagio de la enfermedad de Chagas en áreas libres del vector. Puede prevenirse mediante el tratamiento temprano de los niños infectados; sin embargo, las barreras de accesibilidad a los servicios de salud y las limitaciones del diagnóstico actual demoran la confirmación del resultado y propensan la pérdida de pacientes. Debido a que las técnicas disponibles para tal fin tienen limitaciones, como ser dependientes del operador (microhematocrito), requerir varios meses de seguimiento (detección de IgG) o laboratorios especializados (PCR), es necesario el desarrollo de nuevos y mejores métodos. El objetivo de la Tesis fue desarrollar diferentes plataformas diagnósticas mediante ensayos de ELISA e Inmunoensayo de flujo lateral (IFL) para la detección de la enfermedad de Chagas vertical (ECv).

En primer lugar, se obtuvo una nueva proteína recombinante quimérica, CP4, compuesta por 5 Ags específicos de *T. cruzi*. Luego se desarrolló un ELISA de captura de Ac IgM utilizando como Ags, diferentes proteínas recombinantes previamente obtenidas en el Laboratorio de Tecnología inmunológica (LTI) y CP4 y se las evaluó frente a un panel sueros de bebés. Posteriormente se logró acoplar con éxito el ensayo a telefonía celular, permitiendo de esta manera obtener una prueba en el lugar de atención (POCT), ELISA POCT, destinado a ser utilizado como diagnóstico en entornos de atención primaria de salud.

Por otro lado, se abordó el desarrollo de dos estrategias diagnósticas: un ELISA de Avidéz de IgG específica utilizando como Ag SAPA y, alternativamente un ELISA indirecto utilizando como Ags SAPA y TS. Las estrategias propuestas se evaluaron frente a sueros de binomios mamá-bebé para la detección de Acs IgG anti-SAPA y Ac IgG anti-TS.

Por último, basado en la captura de Ac IgM y utilizando el Ag CP4, evaluamos dos prototipos de ensayos de IFL. Las dos estrategias de IFL se evaluaron frente a sueros de bebé y suero proveniente de muestras de cordón umbilical.

Todas las estrategias propuestas, con diferentes rendimientos en cuanto a su performance diagnóstica, mostraron potencialidad para el diagnóstico de ECv, las cuales contribuirían a mejorar la vigilancia y control de esta vía de transmisión. Cabe destacar que tanto la estrategia de ELISA POCT como la de IFL son valiosas herramientas que permiten un diagnóstico rápido, de fácil adaptabilidad para uso en establecimientos de atención primaria de salud y hospitales públicos, lo que incrementaría la detección de los casos positivos y la administración temprana del tratamiento cuando su efectividad está asegurada.

Abstract

Vertical transmission is the main route of Chagas disease infection in areas free of the vector. It can be prevented through early treatment of infected children; however, barriers to access healthcare services and limitations in current diagnosis methods delay result confirmation and contribute to patient loss. Since available techniques for this purpose have limitations such as operator dependency (microhematocrit), requiring several months of follow-up (IgG detection), or specialized laboratories (PCR), the development of new and improved methods is necessary. The objective of this study was to develop different diagnostic platforms using ELISA and lateral flow immunoassays (LFIA) assays for the detection of vertical Chagas disease (vCD).

Firstly, a new chimeric recombinant protein, named CP4, encompassing 5 specific *T. cruzi* Ags, was obtained. Then, an IgM Ab capture ELISA was developed using as Ags, different recombinant proteins previously obtained in the Laboratorio de Tecnología inmunológica (LTI) and CP4 and they were evaluated against a panel of baby sera. Subsequently, the reading of the assay result was successfully adapted to cell phones, thus making it possible to obtain a point-of-care testing (POCT), ELISA POCT, assay intended to be used as a diagnosis in primary health care settings.

Additionally, two diagnostic strategies were explored: a specific IgG avidity ELISA using SAPA as the antigen and, alternatively, an indirect ELISA using SAPA and TS as antigens. These strategies were evaluated using maternal-infant serum samples to detect anti-SAPA IgG antibodies and anti-TS IgG antibodies.

Finally, two prototypes of LFIA were evaluated, based on IgM antibody capture using the CP4 antigen. Both LFIA strategies were assessed using baby and umbilical cord serum samples.

All proposed strategies, with varying diagnostic performance, showed potential for the diagnosis of vCD, contributing to the improvement of surveillance and control of this transmission route. It is worth noting that both the ELISA POCT strategy and the LFIA strategy would be valuable tools, allowing for rapid diagnosis and easy adaptability for use in primary healthcare facilities and public hospitals., These strategies would increase the detection of positive cases and early administration of treatment when effectiveness is assured.

INTRODUCCION

I. Antecedentes de la problemática de la enfermedad de Chagas e importancia del desarrollo de plataformas diagnosticas para la detección de la enfermedad de Chagas vertical en niños

I.1 Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (EC), también conocida como Tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal debida a la infección por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Fue descrita por primera vez en el año 1909 por Carlos Chagas en Brasil y años después sus estudios fueron confirmados por los aportes de Salvador Mazza en Argentina.

Reconocida por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo (Hotez et al., 2007), la EC es una patología endémica en 21 países de la región de las Américas, aunque las migraciones de personas infectadas han dado lugar a un aumento de los casos detectados en países no endémicos de América y de otros continentes (Figura 1).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015), basado en un reporte de 2010, entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, principalmente en América Latina, se encuentran infectadas por *T. cruzi* y cerca de 70 millones están en riesgo de contraer la infección, con una incidencia anual de 30 mil casos por todas las formas de transmisión y alrededor de 12 mil muertes al año. En Argentina se estima que existen alrededor de 1,5 millones de personas infectadas por *T. cruzi* (WHO, 2015).

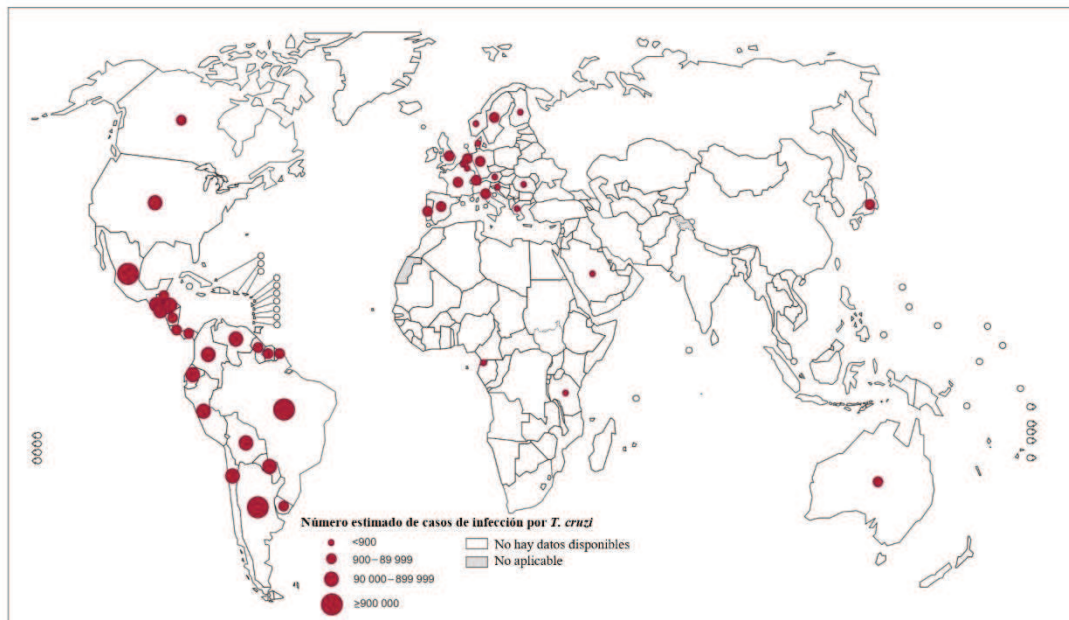


Figura 1: Distribución global de casos de Enfermedad de Chagas, basada en estimaciones oficiales. Imagen adaptada de WHO, 2018.

I.1.1 Agente etiológico: *T. cruzi*

El parásito protozoario *T. cruzi* es el agente etiológico de la EC. Es un protista de la familia *Trypanosomatidae*, caracterizado por la presencia de un único flagelo y una sola mitocondria. El

genoma mitocondrial se encuentra ordenado en una compleja y compacta región denominada kinetoplasto.

En 2009 se propuso un consenso para la nomenclatura de *T. cruzi* donde se reconoció un mínimo de seis linajes genéticos o unidades discretas de tipificación (UDT), desde UDT I hasta UDT VI (Zingales et al., 2009). Para esta recomendación se consideraron estudios previos que dividieron al *T. cruzi* en distintos grupos basados en el patrón de marcadores genéticos, bioquímicos o biológicos. Esta diversidad entre las distintas UDT ha sido correlacionada con diferencias en morfología de las formas sanguíneas, virulencia, patogenicidad, susceptibilidad a los agentes terapéuticos, propiedades inmunológicas e infectividad en las células del huésped (Grosso et al., 2010). Además, ha sido asociada con la distribución geográfica: mientras que UDT I está principalmente asociado a América Central y al sur de Estados Unidos; UDT II, UDT V y UDT VI se encuentra asociado a los países del sur de Latinoamérica (Zingales, 2018). En Argentina se ha encontrado una prevalencia de las UDT V y VI identificadas principalmente en triatomíneos, perros y humanos (Bizai et al., 2020; Fernández et al., 2014).

El ciclo de vida de *T. cruzi* consiste en varias etapas de desarrollo e involucra dos huéspedes intermediarios: el vector invertebrado (insectos triatomíneos) y el huésped vertebrado (humanos). Las formas típicas del parásito identificadas en los huéspedes vertebrados son los tripomastigotes sanguíneos no replicativos y los amastigotes intracelulares replicativos, mientras que los epimastigotes replicativos y los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en el insecto (Rassi et al., 2010) (Figura 2).

El ciclo comienza cuando el triatomíneo succiona sangre de los vertebrados infectados por *T. cruzi*. La mayoría de los tripomastigotes ingeridos son descompuestos por el sistema digestivo del insecto, mientras que aquellos que logran sobrevivir se transforman pocos días después en epimastigotes. Estos últimos se multiplican en el intestino y allí tiene lugar la transformación de los epimastigotes no infectivos en tripomastigotes metacíclicos. El triatomíneo pica al mamífero y excreta los tripomastigotes metacíclicos en sus heces, los cuales penetran la herida de la mordedura o las membranas mucosas. Esta forma del parásito expresa una serie de glicoproteínas de superficie que penetran en las células de los mamíferos y se transforman en amastigotes. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se diferencian en tripomastigotes que luego vuelven a entrar al torrente sanguíneo, cerrando el ciclo (Bern, 2015).

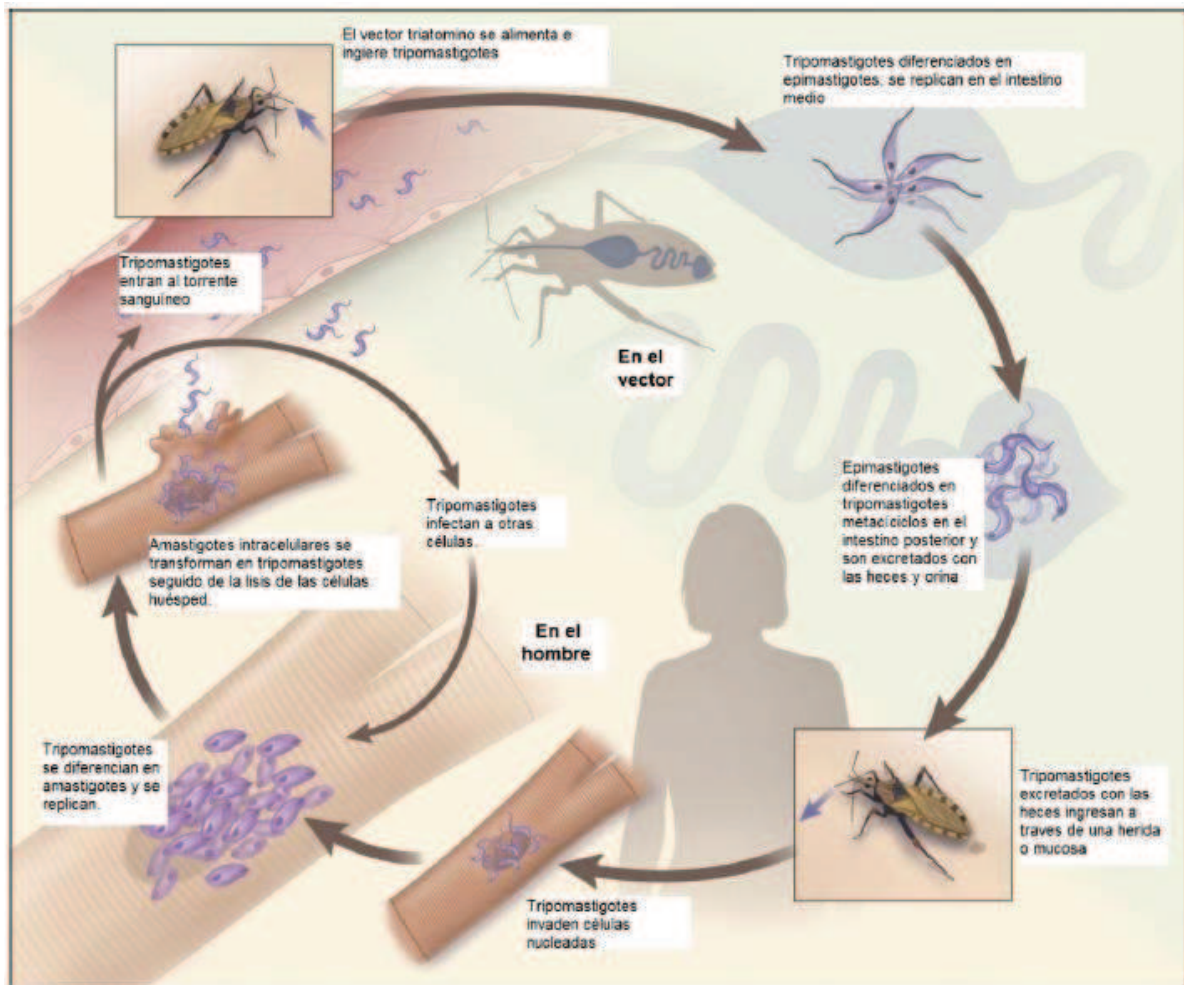


Figura 2: Esquema representativo del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*. Imagen adaptada de Bern, 2015.

1.1.2 Vías de transmisión de *T. cruzi*

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* en áreas endémicas es la vía vectorial mediada por triatomos hematófagos infectados. La especie predominante en Argentina es *Triatoma infestans*, popularmente conocida como “vinchuca” (Figura 3). Los triatomos pican en zonas expuestas de la piel o mucosas, como labios o conjuntiva, y tienen el hábito de defecar cerca de la picadura. Los parásitos entran en el cuerpo cuando la persona instintivamente se rasca la picadura e introduce las heces del insecto infectado a través de la herida o de las membranas mucosas (Echeverría & Morillo, 2019).



Figura 3: Fotografía de un *Triatoma dimidiata* capturado en Honduras. Imagen extraída de la página web de la OMS: “La enfermedad de Chagas (*trypanosomiasis americana*)” (WHO, 2020).

La transmisión también puede ocurrir por vías no vectoriales como la transfusión sanguínea o el trasplante de órganos de un donante infectado, la ingesta de alimentos contaminados (transmisión oral), los accidentes de laboratorio, o la transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo (transmisión vertical) (Echeverría and Morillo, 2019).

En Argentina se cuenta con medidas de control vectorial, la vía oral no tiene registro y existe una elevada cobertura de control en bancos de sangre para evitar la transmisión transfusional. De esta manera, la transmisión vertical ha incrementado su importancia relativa y se ha convertido en la principal vía de generación de nuevos casos en nuestro país, con una incidencia de aproximadamente 1500 casos anuales (Chuit & Segura, 2012; Danesi et al., 2019).

1.1.3 Patogénesis de la infección

La enfermedad de Chagas presenta dos etapas sucesivas: aguda y crónica. La etapa aguda comienza inmediatamente luego de la infección por *T. cruzi*. En la mayoría de los casos es asintomática, puede durar entre seis a ocho semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia en sangre (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). Si bien la mayoría de las personas infectadas son asintomáticas, en algunos casos se pueden evidenciar síntomas leves y no específicos como fiebre, malestar, hepatoesplenomegalia o dolor muscular. También se puede formar un nódulo cutáneo (denominado chagoma) en el sitio de inoculación o un edema (signo de Romaña) si la inoculación es vía conjuntiva. En menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es grave y potencialmente mortal debido a la meningoencefalitis o miocarditis (Bern et al., 2011).

Dentro de los 2 meses de producida la infección, la enfermedad trasciende a la fase crónica, caracterizada por una baja o nula parasitemia, con títulos positivos de anticuerpos (Acs) anti *T. cruzi* (Castro, 2009). Se estima que entre el 70 y el 80% de las personas infectadas permanecen asintomáticas toda su vida, mientras que entre el 20 y el 30% de éstas evolucionan a una etapa sintomática denominada fase crónica determinada. Esta fase puede manifestarse años o décadas después de la infección inicial y los individuos pueden desarrollar miocardiopatía de Chagas o enfermedad gastrointestinal de Chagas (Bern, 2015).

I.1.4 Tratamiento de la infección

Actualmente, sólo dos drogas han probado tener eficacia en el tratamiento parasitológico de la EC: Benznidazol (Bz) y Nifurtimox (Nf). El Bz tiene mejor perfil de seguridad y eficacia (Viotti et al., 2009) y, por lo tanto, generalmente se usa como tratamiento de primera línea. El Bz se administra en 2 dosis diarias (5 mg/kg/día) por 60 días, mientras que el Nf en 3 tomas al día (10 mg/kg/día) durante 60-90 días (Parker & Sethi, 2011).

Se ha reportado que el uso de Bz y Nf resulta efectivo al ser suministrado durante la fase aguda de la infección, alcanzando tasas de curación de aproximadamente entre el 65 y el 80%, e incluso cerca del 100% en los casos de niños con infección adquirida verticalmente (Echeverría & Morillo, 2019). Sin embargo, la efectividad del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección primaria (Pérez-Molina & Molina, 2018). Esto resalta la importancia que tiene la detección temprana de la infección.

El tratamiento con estas drogas puede generar efectos secundarios adversos en los pacientes. Los efectos más comunes del uso de Bz incluyen dermatitis alérgica, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso e insomnio. En el caso del tratamiento con Nf, los efectos más frecuentes son pérdida de peso, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, anorexia, polineuropatía y vértigo (Pérez-Molina & Molina, 2018).

I.2 Enfermedad de Chagas vertical

La enfermedad de Chagas por transmisión vertical de *T. cruzi* (ECv) es un problema de salud pública cada vez más relevante que puede ocurrir tanto en áreas endémicas como no endémicas. La OMS estima que en Latinoamérica alrededor de 1,125 millones de mujeres en edad fértil se encuentran infectadas con *T. cruzi*, con una incidencia de la infección vertical de 8668 casos por año (WHO, 2015). Aunque se pueden observar grandes diferencias entre los países, una revisión internacional de 2013 ha estimado que en áreas endémicas la transmisión vertical ocurre en aproximadamente el 4,7% de los niños nacidos de madres infectadas, siendo la tasa de transmisión a nivel nacional del 4,2%, con rango de 1,9 a 8,2% (Howard et al., 2014). Esta transmisión puede tener lugar tanto en el estadio agudo como en el crónico de la infección materna, repetirse en cada embarazo y transmitirse de una generación a otra (Carlier et al., 2011).

Las diferentes barreras de accesibilidad a los controles médicos y el diagnóstico previo dificultan el control de esta transmisión no vectorial (Howard et al., 2014). Recientemente, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS han planteado un Marco para la eliminación de la transmisión materno infantil del VIH, sífilis, hepatitis B y Chagas, lo que indica en la infección por *T. cruzi* la necesidad de aumentar la cobertura de detección a más del 90% en mujeres embarazadas y neonatos (PAHO, 2017).

La transmisión transplacentaria de *T. cruzi* resulta en una infección parasitaria característicamente aguda. Si bien la mayoría de los recién nacidos infectados (entre el 60 y el 90%) son asintomáticos, pueden mostrar mayores frecuencias de bajo peso al nacer y prematuridad en comparación con los no infectados y, en caso de no ser tratados, la infección puede progresar a patologías crónicas en el futuro (Kemmerling et al., 2019).

1.2.1 Tratamiento en niños

El tratamiento antiparasitario (Bz o Nf) durante el embarazo no es recomendado debido al desconocimiento sobre los efectos de las drogas en el feto y al alto riesgo de reacciones adversas en los adultos. Sin embargo, el tratamiento administrado a mujeres en edad fértil ha demostrado ser eficaz para evitar la transmisión vertical (Bustos et al., 2019). En el caso de los recién nacidos o infantes infectados, el tratamiento con antiparasitarios resulta altamente efectivo y con baja incidencia de efectos adversos (Altcheh et al., 2014). Los niños deben ser tratados con Bz (5 a 10 mg/kg al día) en dos o tres tomas divididas durante 60 días, o con Nf (15 mg/kg al día) en tres tomas divididas durante 60 a 90 días (Rassi et al., 2010).

Se han reportado tasas de curación, evaluadas mediante serología convencional, que superan el 90% en los niños tratados durante el primer año de edad. De lo contrario, la infección puede progresar a la enfermedad crónica, manifestando síntomas como cardiopatías severas y lesiones viscerales, etapa en la cual el tratamiento pierde efectividad (Carlier et al., 2019).

Aunque el tratamiento de la infección se puede realizar en cualquier momento en los primeros años de vida con igual efectividad (Carlier et al., 2019), se ha descrito que alrededor del 50% de los bebés se pierden del seguimiento antes de que se pueda confirmar la infección congénita (Alonso-Vega et al., 2013; Bern et al., 2009; Blanco et al., 2000; Romero et al., 2011). Por lo tanto, estos pacientes pierden una oportunidad única para ser tratados. Por tal motivo el diagnóstico y el tratamiento al momento del nacimiento, especialmente durante las primeras horas que los recién nacidos permanecen en el hospital, pueden ser críticos.

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* hace uso de distintas herramientas según se trate de un caso agudo o crónico.

1.3.1 Diagnóstico de Chagas crónico

En la etapa crónica, la parasitemia es baja e intermitente, lo que hace poco fiables los métodos de diagnóstico directo parasitológico y basado en PCR. Por lo tanto, como se observa en la Figura 4, el diagnóstico de las infecciones crónicas se basa en pruebas serológicas que detectan Ac del tipo IgG específicos contra el parásito. Se emplean métodos convencionales como el Ensayo Inmuno-enzimático

(ELISA), Hemoaglutinación Indirecta (HAI) o Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La mayoría de estos métodos utilizan lisados de epimastigotes como antígeno (Ag) para la detección los cuales, frecuentemente, muestran resultados falsos positivos (FP) por reacción cruzada con otros parásitos filogenéticamente relacionados con *T. cruzi*, como es el caso de *Leishmania spp*. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha permitido superar estos inconvenientes mediante la sustitución de los Ag nativos de *T. cruzi* por Ag recombinantes (da Silveira et al., 2001; Umezawa et al., 2003; Umezawa & Silveira, 1999). Sin embargo, ninguno de los métodos mencionados anteriormente es cien por ciento confiable, por lo que la OMS recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias, basadas en diferentes metodologías o en diferentes preparaciones antigénicas, para identificar a un paciente con enfermedad de Chagas (WHO, 2002). De todas maneras, los resultados serológicos pueden ser discordantes y las muestras pueden arrojar resultados no concluyentes persistentes. Ante esta situación, se indica un tercer ensayo para aclarar el estado de infección. Técnicas como el western blot pueden resultar útiles en estas circunstancias, especialmente en países donde las *Leishmania spp* es endémica ya que los anticuerpos anti-*T. cruzi* que se detectan con esta técnica no tienen reactividad cruzada los de *Leishmania spp*, a diferencia de lo que ocurre con otros métodos (Riera et al., 2012).

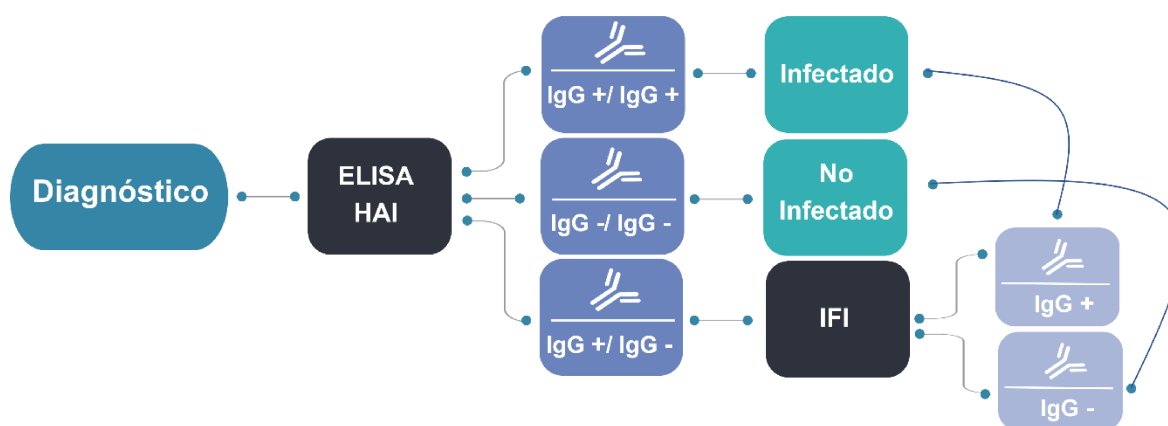


Figura 4: Diagnóstico de Chagas crónico. Algoritmo de técnicas diagnósticas recomendado por la OMS: uso de dos técnicas complementarias (ELISA y HAI), para identificar a un paciente con enfermedad de Chagas. Ante un resultado discordante, se indica un tercer ensayo para aclarar el estado de infección (por ejemplo, IFI).

Dada la alta Se y Es de ELISA, una única prueba puede ser suficiente para el cribado, siendo necesaria la confirmación serológica únicamente en caso de un resultado positivo (Brasil et al., 2010). Las pruebas de diagnóstico rápido (ensayos inmunocromatográficos que usan proteínas recombinantes) no son lo suficientemente sensibles para ser utilizadas como herramientas de diagnóstico serológico de primera línea (Sánchez-Camargo et al., 2014). Sin embargo, tanto estas pruebas como el uso de muestras de sangre seca son una buena opción para pacientes que tienen dificultades para acceder a los centros de atención médica o cuando se necesita una detección a gran escala (Holguín et al., 2013; Sánchez-

Camargo et al., 2014). Para el diagnóstico de la infección crónica por *T. cruzi*, la PCR tiene sensibilidades bajas y variables que van del 50% al 90% (Brasil et al., 2010). Los factores que contribuyen a esa variabilidad son el volumen de sangre, la metodología, los genes a los que se dirige, la fase de la infección, la presencia de inmunosupresión, el país de origen del paciente y la diversidad genética de *T. cruzi* (Brasil et al., 2010; Schijman et al., 2011). Sin embargo, la PCR puede ser útil cuando los resultados de la serología no son concluyentes (Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005), y como método auxiliar para monitorear el tratamiento (Britto, 2009). La PCR es útil para identificar el fracaso del tratamiento a partir de la detección positiva de ADN de *T. cruzi*, pero no el éxito del tratamiento, ya que incluso los resultados negativos repetidos de PCR no indican necesariamente una cura parasitológica. En el mejor de los casos, tales resultados son indicativos de la ausencia de ADN del parásito en el momento de la prueba.

1.3.2 Diagnóstico de la infección aguda y vertical por *T. cruzi*

El diagnóstico en los recién nacidos es particularmente útil ya que pueden ser tratados con altos niveles de eficacia durante la fase aguda de la infección. Sin embargo, las limitaciones de las técnicas de diagnóstico disponibles actualmente y las barreras de accesibilidad a los servicios de salud, conducen a bajas tasas de detección y a una baja adherencia a los programas de seguimiento diagnóstico (Carlier et al., 2019; L. Messenger & Bern, 2018).

El algoritmo diagnóstico de la infección vertical (Figura 5) se aplica en bebés nacidos de madres en estadio crónico de la infección.

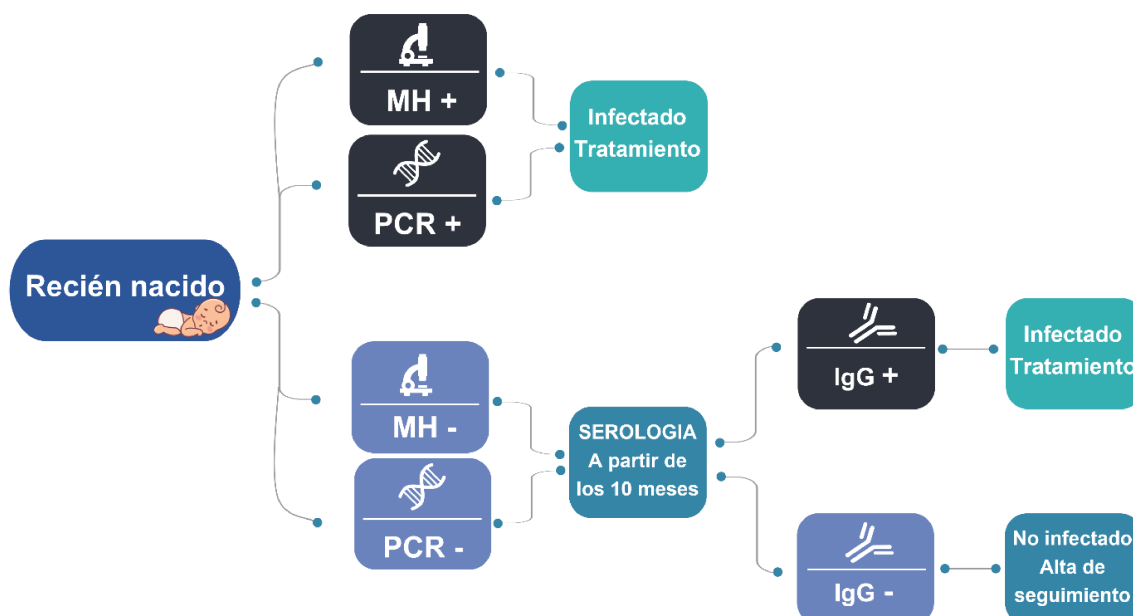


Figura 5: Diagnóstico de Chagas vertical. Algoritmo de técnicas diagnósticas recomendado por la OMS e inclusión de PCR en Argentina.

Frente al caso de una mujer embarazada con diagnóstico confirmado, se procede con la detección de la infección en el recién nacido. En primera instancia, se realiza la técnica del microhematocrito (MH), la cual consiste en la observación directa del parásito por microscopía en una muestra concentrada de sangre del recién nacido. Este método toma mucho tiempo y tiene una Se limitada y variable ya que depende de la calidad de la muestra y del entrenamiento del operador (L. A. Messenger et al., 2017; L. Messenger & Bern, 2018). Se ha reportado que el MH permite detectar solo entre el 40 y el 60% de los recién nacidos infectados (Bustos et al., 2019). Si el MH resulta positivo se indica inmediatamente el tratamiento antiparasitario, mientras que en caso de ser negativo debe realizarse el seguimiento mediante las pruebas serológicas mencionadas anteriormente para la detección de infección crónica, de manera de poder confirmar el diagnóstico (Ministerio de Salud de la Nación, 2018).

Dependiendo de la Se de la prueba, los Ac IgG maternos caen por debajo de los niveles detectables en el suero infantil entre los 6 y los 10 meses después del nacimiento (Bern et al., 2009; L. A. Messenger et al., 2017). Motivo por el cual el diagnóstico serológico se realiza a los niños a partir de los 10 meses de vida, cuando la presencia de los Ac específicos para *T. cruzi* puede asociarse a una infección vertical (L. Messenger & Bern, 2018). Esto constituye la principal limitación del diagnóstico en neonatos, ya que, se estima un retraso mínimo de 10 meses para la confirmación del resultado. Esta estrategia retarda el diagnóstico y el tratamiento y aumenta el riesgo de pérdida del paciente, poniendo en riesgo su salud. Teniendo en cuenta estas dificultades, se estima que, en nuestro país, menos de un 20% de los niños recibe diagnóstico y tratamiento oportunos (Fabbro et al., 2014).

En las últimas décadas, se ha propuesto a los métodos moleculares como una alternativa prometedora para el diagnóstico precoz. Recientemente en Argentina, se consensó incluir en el algoritmo diagnóstico la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) como método parasitológico de elección en caso de estar disponible. La determinación por qPCR se lleva a cabo en muestras de sangre venosa del recién nacido, tomadas desde las primeras 24 h desde el nacimiento hasta los 10 meses de vida inclusive. Esta técnica presenta mayor Se que los métodos microscópicos, es automatizable y permite procesar un elevado número de muestras en simultáneo (Benchetrit et al., 2021). Sin embargo, los métodos moleculares requieren equipamientos costosos, entrenamiento sofisticado y rigurosos controles de calidad, lo cual es difícil de implementar y sustentar en áreas de recursos limitados (Alonso-Padilla et al., 2017; L. Messenger & Bern, 2018).

Diversos autores han reportado que, en el sistema de salud correspondiente a los últimos años, el seguimiento se logra sólo en entre el 22 y el 44% de los casos, lo que representa una pérdida de oportunidades de diagnóstico y tratamiento de hasta el 80% de los niños expuestos (Alonso-Vega et al., 2013; Blanco et al., 2000; Danesi et al., 2019; De Rissio et al., 2010; Diez et al., 2008). Dichos antecedentes resaltan la importancia del desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan obtener

resultados definitivos en poco tiempo, especialmente durante las primeras horas desde el nacimiento, cuando los recién nacidos permanecen en el centro de salud.

I.3.3 Diagnóstico mediante la detección de Ac IgM

Las pruebas serológicas convencionales basadas en el uso de *T. cruzi* específico no permiten diferenciar los Acs producidos por el recién nacido, secundario a una infección congénita, de los producidos por la madre durante los 9 primeros meses después del nacimiento (Carlier & Truyens, 2015). Por el contrario, durante la respuesta aguda del sistema inmune del feto (o niño) infectado se producen IgM específicas que no cruzan la membrana fetoplacentaria. Estas particularidades los señalan como biomarcadores efectivos para detectar la infección connatal. Este criterio se aplica en otras infecciones, como por ejemplo en toxoplasmosis en la que es posible la detección de infección connatal en alrededor del 70 al 80% de los recién nacidos (Carral et al., 2018; Fricker-Hidalgo et al., 1996; Lago et al., 2014; Naot et al., 1981).

Sin embargo, muy pocos trabajos han explorado el uso de Ac IgM para el diagnóstico de infección connatal por *T. cruzi* (Castro-Sesquen et al., 2021; Lorca et al., 1995; Noazin et al., 2019; Rodriguez et al., 2005; Stagno & Hurtado, 1971; Umezawa et al., 1996). Además, estos estudios no se han basado en técnicas de captura de IgM que se requieren para obtener la especificidad (Es) y la sensibilidad (Se) adecuada para medir este isotipo (Naot et al., 1981). Esta limitación ha llevado a que el rendimiento informado sea desfavorable debido a las tasas de falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN).

I.3.4 Otros diseños diagnósticos

Se han desarrollado métodos más sofisticados, laboriosos y difíciles de interpretar. Estos incluyen la prueba de la muestra del recién nacido por *immunoblot* contra la fracción TESA (Umezawa et al., 1996), que luego fue evaluada mediante la detección de las bandas específicas del Ag SAPA en IgM TESA-blot en comparación con el MH y qPCR (Noazin et al., 2018).

Por otro lado, se ha reportado la prueba de Chunap (Nanopartículas de orina de Chagas) que en lugar de detectar Acs específicos contra *T. cruzi*, detectan la infección activa mediante la captura y concentración de Acs TESA de *T. cruzi* de la orina del paciente, que luego se revelan mediante un Ac monoclonal dirigido contra un lipofosfopéptidoglicano del parásito, incluido en la prueba (Castro-Sesquen et al., 2014).

I.4 Plataformas diagnósticas para llevar cerca del paciente

En relación con el diagnóstico de enfermedades infecciosas, cabe destacar que, hasta el momento, las técnicas de inmunodiagnóstico basadas en ELISA han sido las más evaluadas y mejor validadas. Estas, además, han mostrado gran aceptación por parte de los usuarios de laboratorio.

Sin embargo, también se tiene en cuenta que, las técnicas de ELISA presentan restricciones metodológicas para reducir los tiempos de reacción y los pasos de realización. En el área del diagnóstico clínico, se buscan desarrollar dispositivos de diagnóstico para llevar cerca del paciente (*Point-of-care*, POC), no solamente para el caso de poblaciones aisladas, sino también para emergencias, salas de cirugía, puntos de atención y cuidado personal (Chin et al., 2006; Walt, 2005; Yager et al., 2006). De particular interés para esta Tesis son las plataformas microfluídicas basadas en papel y otros derivados de la celulosa, que es un campo de investigación emergente desde el año 2008 aproximadamente (Martinez et al., 2008). Estos soportes son muy estudiados debido a varias ventajas que ofrecen: son de gran disponibilidad y bajo costo, son autónomos pues permiten el transporte de fluidos mediante capilaridad, son compatibles con los sistemas biológicos y permiten la adsorción/desorción de proteínas para reacciones enzimáticas y/o Antígeno (Ag)-Ac. Dentro de la gran variedad de dispositivos de microfluídica basados en papel, los inmunoensayos de flujo lateral (IFL) tienen una gran demanda para la detección de diversos indicadores bioquímicos en el campo de la salud humana y animal (R. C. Wong, 2009).

Actualmente, existen varios *test* diagnósticos rápidos (TDRs) comerciales para la detección de infecciones crónicas por *T. cruzi*. Algunos han sido evaluados y comparados en distintos trabajos, mostrando ser altamente sensibles y específicos (Lozano et al., 2019; Sánchez-Camargo et al., 2014). Sin embargo, no existen TDRs para la detección de la fase aguda de la infección.

1.4.1 Diagnóstico basado en comunicaciones

Paralelamente al crecimiento de los TDRs en el mundo, se ha producido una rápida expansión de la tecnología de la telefonía móvil. Un teléfono móvil contiene todos los componentes requeridos para lograr un lector analítico común: la pantalla, una entrada para capturar una señal (que podría ser a través de la cámara, sensores de luz ambiental; memoria para almacenar los datos) y varios modos de conectividad inalámbrica (*Wi-Fi*, *Bluetooth*, *NFC*, etc.) (Mudanyali et al., 2012; Quesada-González & Merkoçi, 2017). Por lo tanto, pueden ser aplicados como instrumentos de lectura de pruebas diagnósticas y aprovechar otras funciones asociadas. La penetración social extrema del teléfono inteligente, la familiaridad para usuarios de todos los rangos de edad y su funcionalidad, tienen la potencialidad de transformar la biomedicina, ofreciendo oportunidades sin precedentes para el diagnóstico remoto, monitoreo y gestión de enfermedades (Erickson et al., 2014; McKay et al., 2018; Weinstein et al., 2014).

Hay varios trabajos centrados en las distintas aplicaciones de esta tecnología (TDC: “tecnología de diagnóstico y comunicación”), como la detección de enfermedades cardiovasculares, monitoreo de seguridad alimentaria y biosensores con múltiples aplicaciones (Hu et al., 2016; Preechaburana et al., 2014; Quesada-González & Merkoçi, 2017; Rateni et al., 2017; Xu et al., 2015; Y. Zhang et al., 2019). Resulta particularmente importante para el diagnóstico en países de recursos limitados, en los que la

telefonía es una de las pocas tecnologías ampliamente disponibles (debido a que la instalación de las redes tiene bajos requerimientos de infraestructura), por lo que aseguraría la implementación global de esta herramienta diagnóstica, sin implicar costos adicionales de adquisición de equipos e instrumentos específicos (Ding et al., 2019; Erickson et al., 2014).

I.4.2 Acoplamiento de la Tecnología

El sistema típico de TDC consta de un accesorio adaptador, que es instalado en el teléfono inteligente e interactúa con su cámara y/o el puerto de comunicaciones USB, y luego el TDR se inserta en dicho accesorio (Figura 6) (Erickson et al., 2014). Se puede lograr la lectura de *tests* colorimétricos, electroquímicos y otros tipos.



Figura 6: Esquema del sistema de acoplamiento de un IFL al teléfono celular. A) Partes que lo componen. B, C y D) Ejemplo de un test de medición de la hormona estimulante de la Tiroide (TSH) integrado al celular. Imagen adaptada de You et al., 2013 (You et al., 2013).

La integración de los TDRs a los teléfonos aporta nuevas ventajas al diagnóstico y seguimiento de pacientes: los usuarios pueden acceder a bases de datos (por ejemplo, sus registros médicos) o enviar mediciones biométricas a profesionales de la salud en tiempo real, los médicos pueden brindar atención y monitorear pacientes enfermos en línea descongestionando los servicios de atención de la salud, etc (Erickson et al., 2014; Lee et al., 2014). Esto asegura la atención a tiempo del paciente y facilita el acceso a la salud de poblaciones de bajos recursos y/o remotas, contribuyendo a disminuir las brechas socio-económicas entre los distintos sectores de la sociedad. Adicionalmente, la conectividad a través del GPS permite el georreferenciamiento de casos de enfermedades, vectores de transmisión o fuentes

de infección, facilitando el relevamiento de información útil para la vigilancia de la salud, estudios epidemiológicos, monitoreo de brotes, seguimiento de pandemias, etc (Erickson et al., 2014; Lee et al., 2014).

OBJETIVOS

Objetivo General:

En base a la problemática anteriormente planteada, en esta tesis se buscó desarrollar un dispositivo que permita un diagnóstico rápido y certero de la infección en recién nacidos infectados connatales, hijos de madres con Enfermedad de Chagas. En primera instancia se trabajó en la detección de antígenos de fase aguda como de anticuerpos IgM mediante captura en formato de ensayo de ELISA. Luego se aplicó la determinación a una plataforma de diagnóstico rápido de inmunocromatografía de flujo lateral.

Objetivos Específicos:

- i. Obtención de un panel de sueros de neonatos hijos de madres con enfermedad de Chagas que hayan sido diagnosticados como positivos o negativos según indicaciones de OMS y protocolos nacionales de seguimiento del paciente con Chagas, sueros de neonatos hijos de madres que sean negativas para la enfermedad de Chagas y sueros de neonatos con otro tipo de infecciones de transmisión vertical para evaluar la reactividad cruzada de la plataforma diagnóstica a diseñar.
- ii. Diseño y obtención de proteínas recombinantes de *T. cruzi* que sean altamente antigénicas y que puedan fijarse a la plataforma diagnóstica a obtener. En esta instancia, también se evaluarán clones ya disponibles en el laboratorio, los que serán evaluados en el sistema propuesto en el inciso iv y vi.
- iii. Obtención de conjugados de los antígenos del inciso ii ligándoles moléculas que permitan alcanzar la sensibilidad y especificidad adecuadas para el sistema de análisis desarrollado. Evaluación de la reactividad de los antígenos y de los conjugados obtenidos.
- iv. Diseño, optimización y evaluación de un ensayo de ELISA de captura para la detección de antígenos de fase aguda y detección de IgM específica frente a los antígenos de *T. cruzi* disponibles en el laboratorio y los obtenidos en el inciso ii.
- v. Síntesis de partículas de oro para ser utilizadas en la conjugación de antígeno y/o anticuerpo para su posterior utilización en plataformas diseñadas en el inciso (vi).
- vi. Diseño, optimización y evaluación de plataformas de microfluídica basadas en papel y nitrocelulosa, en las que se puedan implementar ensayos de flujo lateral, con reacciones de tipo antígeno anticuerpo, enzimáticas.

**1. Capítulo 1:
Diseño y obtención de proteínas recombinantes de
T. cruzi y conjugado del antígeno CP4**



1.1 Introducción

Gracias a la tecnología de ADN recombinante, ha sido posible que una secuencia codificante de una proteína de interés puede insertarse en un vector de expresión apropiado y transformarse en un huésped procariótico, como la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) (Rosano et al., 2019). *E. coli* es el sistema de expresión de proteínas recombinantes más popular a pesar del gran desarrollo alcanzado hasta el momento por los sistemas de expresión eucarióticos. La clave del éxito está relacionada con la facilidad de manejo, el costo reducido, el alto rendimiento y la posibilidad de optimizar los procesos posteriores mediante procesos de escalado asequibles. Además, se dispone de una gran cantidad de herramientas de expresión de proteínas, lo que puede corroborarse en la base de datos estructural de proteínas PDB, en la cual la mayoría de las proteínas descritas se encuentran expresadas en *E. coli* (Ferrer-Miralles et al., 2015).

Los cuatro pasos invariables fundamentales para la clonación de cualquier fragmento de ADN mediante un enfoque clásico basado en la restricción y la ligadura implican la fragmentación del ADN con endonucleasas de restricción, la ligadura de los fragmentos de ADN a un vector, la transformación y el cribado/selección (Figura 7). En general, los pasos tradicionales mencionados anteriormente deben ser respetados entre los procedimientos de clonación; sin embargo, se pueden seleccionar varias rutas alternativas en diversos puntos dependiendo de la aplicación particular (Ashwini et al., 2016).

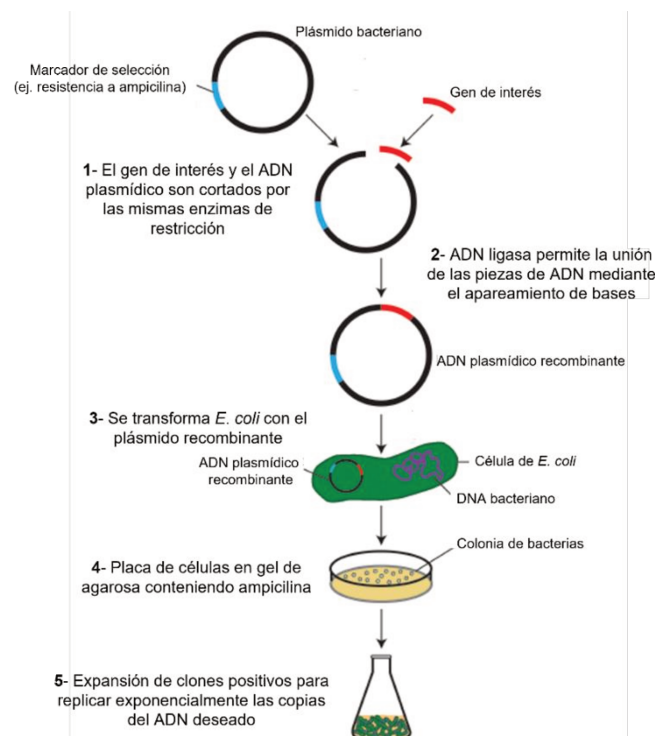


Figura 7: Pasos en la tecnología de ADN recombinante. Imagen adaptada de Deans, 2015 (Deans, 2015).

La tecnología del ADN recombinante está desempeñando un papel vital en la mejora de las condiciones de salud mediante el desarrollo de nuevas vacunas y productos farmacéuticos. Las estrategias de tratamiento también se mejoran mediante el desarrollo de kits de diagnóstico, dispositivos de seguimiento y nuevos enfoques terapéuticos (Khan et al., 2016).

1.1.1 Proteínas recombinantes en el diagnóstico de infecciones y en la enfermedad de Chagas

Desde el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante, se han diseñado y preparado muchas moléculas de proteína para finalmente ser evaluadas para el diagnóstico serológico. Las proteínas obtenidas a través de esta tecnología se pueden utilizar como antígenos (Ags) para la captura de anticuerpos (Acs), en forma muy específica, evitando posibles interferencias de otros componentes que suelen ocurrir cuando los Ags se han obtenido mediante la purificación de proteínas de origen nativo (da Silveira et al., 2001). El uso de proteínas recombinantes, como Ags para detectar o cuantificar Acs marcadores específicos de una enfermedad, permite aumentar la Es de la reacción inmunológica involucrada, lo que conduce a un diagnóstico más preciso (Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009).

Estas proteínas cuentan con una característica deseada de los reactivos de diagnóstico, ya que su producción y evaluación pueden ser altamente estandarizados. Desde otro punto de vista, los Ags recombinantes no requieren la manipulación del agente infeccioso. Este ha sido un progreso significativo al considerar las características de los agentes infecciosos virales, para los cuales la producción de reactivos ha cambiado sustancialmente a la derivada de la tecnología del ADN recombinante. No menos importante es el beneficio económico de ahorro de estos reactivos. De hecho, una vez que las bacterias se transforman en cepas productoras de proteínas competentes, se pueden usar para preparar cantidades sustanciales de antígeno con un bajo costo de producción (Marcipar & Lagier, 2012).

La aplicación de la tecnología del ADN recombinante, ha permitido la producción de Ags del parásito *T. cruzi* de distinto peso molecular o de diferentes estadios del parásito en grandes cantidades, con un alto grado de pureza y calidad estandarizada (da Silveira et al., 2001). Muchos de los genes codificantes de los Ags de *T. cruzi* están compuestos por secuencias repetidas en tándem, altamente conservadas en los distintos linajes de *T. cruzi*, cuya longitud varía entre 5 y 68 residuos aminoácidos (Abel et al., 2005). Estos Ags repetitivos son inmunodominantes; tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune con altos títulos de Acs específicos y/o de alta afinidad; y parecieran ser potentes activadores de linfocitos B (da Silveira et al., 2001).

La utilización de Ags recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos, además de tener ventajas en términos de la definición química y del costo de producción, podría resolver el problema de reacciones cruzadas, que originan falsos positivos, manteniendo una alta Se. Además, los valores de Es

obtenidos en ensayos de ELISA presentan una mejora con respecto a los ensayos convencionales. Sin embargo, ninguno de los Ags recombinantes utilizados son reconocidos por todos los sueros positivos.

Debido a esto, el uso de mezclas antigénicas ha sido ampliamente evaluado en ensayos de ELISA, conduciendo a un aumento en la Se, en comparación a los Ags recombinantes utilizados en forma individual. Sin embargo, en algunos casos, se registró una disminución en la Es del ensayo debido a que en los ensayos de ELISA los sitios de unión son limitados y los distintos Ags de la mezcla estarían aglomerados, viéndose alterada la unión Ag-Ac (da Silveira et al., 2001).

Para solucionar este inconveniente, se ha recurrido al uso de proteínas quiméricas, que expresan varios determinantes antigénicos no relacionados (Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009; Houghton et al., 1999; Marcipar & Lagier, 2012; Peverengo et al., 2018; F. L. N. Santos et al., 2016). La estrategia se basa en la elección de epítopes inmunodominantes dentro de los Ags enteros y su posterior ensamblaje, lo que permite contemplar la Se de varias moléculas, sin perder la Es que brindan los fragmentos.

Otro argumento propuesto a favor del uso de moléculas multiepítopes, es que éstas facilitarían el proceso de estandarización de los ensayos en los que fueran incluidas, balanceando el número de epítopes por unidad de superficie sólida (Camussone et al., 2009).

1.1.2 Antígenos utilizados en el presente trabajo

Para la realización de este trabajo se han utilizado, como Ags para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, proteínas recombinantes y proteínas recombinantes quiméricas.

1.1.2.1 Proteínas recombinantes:

Se han utilizado cuatro proteínas recombinantes que se mencionan a continuación:

- P2 β también encontrada en bibliografía como R13 (Marcipar & Lagier, 2012). El péptido R13 se definió como un determinante antigénico lineal de 13 residuos carboxilo-terminales de la proteína recombinante JL5 (proteína P ribosomal de *T. cruzi*). Como se demostró para JL5, R13 definió especificidades de Acs que aumentaron significativamente en pacientes con enfermedad cardíaca crónica de Chagas (Mesri et al., 1990).
- B13 puede ser encontrada en bibliografía como Ag2, TCR39, PEP-2 y RP5 (Marcipar & Lagier, 2012). Es un Ag inmunodominante de *T. cruzi* reconocido por Acs séricos IgG del 98% de los individuos infectados por *T. cruzi* (tanto para la enfermedad de Chagas con miocardiopatía crónica, como para asintomáticos/indeterminados) en América Latina y codifica un motivo de 12 aminoácidos repetitivos en tándem parcialmente degenerado presente en una proteína de membrana de 140 kDa (Gruber & Zingales, 1993).

- TS es una de las proteínas más abundantes de *T. cruzi* y es expresada también por otras especies como el *T. brucei* y el *T. rangeli* (Bueren-Calabuig et al., 2014). Las TS se localizan en la membrana de *T. cruzi* y están implicadas en la invasión de las células del huésped como resultado de la transferencia de ácido siálico desde las células hacia moléculas aceptoras localizadas en la superficie del parásito TS es una enzima que cataliza la transferencia reversible de ácido siálico (SIA) desde las células del huésped hacia mucinas presentes en la superficie del parásito (Colli, 1993). Se ha descrito que estas moléculas de SIA son indispensables en el ciclo de vida del *T. cruzi*: cumplen un rol fundamental en el proceso de adherencia e invasión de las células del huésped e intervienen en la protección del mismo frente al ataque de Acs, generando así un mecanismo por el cual el parásito evade la respuesta inmune del huésped (Freire-de-Lima et al., 2015). El *T. cruzi* no posee la maquinaria celular necesaria para sintetizar dichos SIAs, por lo que debe tomarlos de las células del huésped, lo que posiciona a la TS como una de las enzimas claves en su metabolismo.
- SAPA es un Ag de fase aguda, también conocido como TCNA, TS (da Silveira et al., 2001) o RP2 (Marcipar & Lagier, 2012). La secuencia codificante para esta proteína consiste en 14 repeticiones de 12 aminoácidos inmunodominantes dispuestas en tándem (Pollevick et al., 1991). Las repeticiones de SAPA se localizan en el dominio C-terminal de las enzimas trans-sialidasas de *T. cruzi* (TS), mientras que el dominio N-terminal de TS con 642 aminoácidos constituye el sitio catalítico (Campetella et al., 1994). Ha sido propuesto para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas (Affranchino et al., 1989). Según Affranchino y col. (1989) y Reyes y col. (1990) los Ac contra SAPA están presentes principalmente en sueros de pacientes agudos y congénitos.

1.1.2.2 Proteínas recombinantes quiméricas:

Además, se han utilizado dos proteínas recombinantes quiméricas, CP1 (*Chimeric Protein 1*) y CP3 (*Chimeric Protein 3*). La conformación de dichas quiméricas fue en base a Ags repetitivos recombinantes de *T. cruzi* tal como se describe a continuación:

- CP1 (Camussone et al., 2009) está compuesta por un segmento de FRA, fusionado a un segmento de SAPA.
 - El antígeno repetitivo flagelar (FRA), también encontrado en bibliografía como H49, JL7, Ag1 o RP1 (Marcipar & Lagier, 2012), es usado para el diagnóstico de la etapa crónica de la infección.
 - El Ag SAPA mencionado anteriormente.
- CP3 (Peverengo et al., 2018) compuesta por un segmento de MAP fusionado a un segmento de TcD y a uno de TSSAII:

- La proteína asociada a microtubulo (MAP) también puede encontrársela en la bibliografía como Ag36, JL9 o RP3 (Marcipar & Lagier, 2012), es utilizada para el diagnóstico de la infección tanto aguda como crónica.
- El Ag perteneciente a la familia de las trans-sialidasas (TcD) es utilizado para el diagnóstico de la infección tanto aguda como crónica.
- Se ha informado que, el Ag pequeño de superficie de tripomastigote (TSSAII), muestra la Se del 87,8% y el 100,0% de Es para discriminar entre pacientes con enfermedad de Chagas y Leishmania (Cimino et al., 2011). Este Ag, ha mostrado ser específico de los genotipos UDT II, UDT V o UDT VI y desarrollar Ac específicos en pacientes infectados (Bhattacharyya et al., 2010; Di Noia et al., 2002). Dado que estos son los UDT predominante en América del Sur, podrían ser de utilidad para la determinación de infecciones por *T. cruzi*, en las regiones que son co-endémicas para ambas infecciones (Marcipar & Lagier, 2012).

1.1.3 Conjugación de proteínas

1.1.3.1 Sistema de biotina: estrept-avidina

Entre los sistemas de marcaje no radioactivos más sensibles y ampliamente aplicados en el campo de la biotecnología se encuentra el sistema basado en la unión de la biotina con las proteínas avidina y estreptavidina, llamado también biotina: estrept-avidina (Bayer & Wilchek, 1980). La biotina tiene una afinidad muy alta con las proteínas avidina y estreptavidina, con una constante de disociación a pH 7 de $0,6 \times 10^{-15}$ M y 4×10^{-14} M, respectivamente (Green, 1990). Dada esta propiedad, el sistema biotina: estrept-avidina es utilizado en la conjugación de moléculas para inmunoensayos y en la hibridación de ácidos nucleicos (Diamandis & Christopoulos, 1991).

La biotina es una molécula pequeña de 244,31 daltons (Da). Por su parte, la avidina es una glucoproteína que contiene cuatro subunidades idénticas de 16,4 kilodaltons (kDa), dando un peso molecular de aproximadamente 66 kDa (Green, 1975). Cada subunidad tiene un sitio de unión a una molécula de biotina y una modificación de oligosacárido que se encuentra vinculada a la asparagina. El alto componente de oligosacáridos consiste principalmente en manosa y N-acetilglicosamina, por lo que puede interactuar inespecíficamente con cargas negativas, especialmente con las de superficies celulares y ácidos nucleicos (Bruch & White, 1982). Por estas razones, actualmente se suele emplear como conjugado a la estreptavidina, homotetrámero de ~56 kDa de la bacteria *Streptomyces avidinii* con la capacidad de unir hasta cuatro moléculas de biotina con alta afinidad. Es una proteína con alta termoestabilidad, resistente contra pH extremo, agentes desnaturizantes y degradación enzimática (Wilchek et al., 2006). Estas propiedades han representado en la estreptavidina una herramienta sobresaliente para las diferentes disciplinas de biociencias, biomedicina y, recientemente, para otros campos de la ciencias naturales y tecnología. Se trata de una proteína no glicosilada de cuatro

subunidades, cada una de 159 aminoácidos. Las dos proteínas, avidina y estreptavidina, tienen un 33% de homología en su secuencia y cuatro residuos de triptófano que estarían involucrados en los sitios de unión a la biotina (Green, 1990). En general, el uso de estreptavidina ocasiona una menor unión inespecífica que la avidina debido a que no presenta carbohidratos.

La mayoría de las aplicaciones basadas en esta interacción requieren de la biotilación previa de las moléculas diana. Existen distintos métodos de biotilación, dentro de ellos se describe la técnica de biotilación química la cual es sencilla y de uso común.

1.1.3.2 Marcaje químico de proteínas con biotina

La D-biotina es, el componente básico para la construcción de reactivos de biotilación.

Para la incorporación de biotina en las proteínas, se utilizan derivados de biotina que contienen porciones reactivas capaces de unirse a determinados grupos funcionales en las proteínas. A través de esta modificación denominada biotilación, se obtienen proteínas biotiladas que contienen sitios de unión a la avidina/estreptavidina. Los agentes biotilantes empleados son relativamente pequeños, por lo que los reactivos no deberían afectar significativamente las propiedades químicas y físicas de la molécula (Della-Penna et al., 1986).

El diseño básico de un compuesto marcador de biotina se ilustra en la Figura 8 el cual presenta un anillo bicíclico de biotina en un extremo de la estructura, un grupo reactivo en el otro extremo que puede usarse para acoplarse con otras moléculas y grupos espaciadores construidos a partir de la cadena lateral del ácido valérico de la molécula.

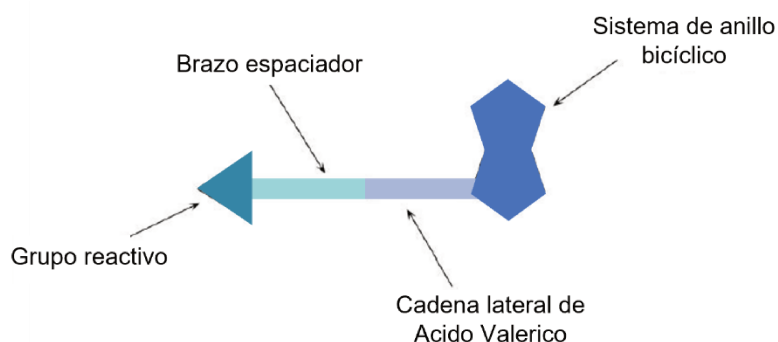


Figura 8: Diseño básico de un reactivo de biotilación. Incluye los anillos bicíclicos y la cadena lateral del ácido valérico de la D-biotina en un extremo y un grupo reactivo para acoplarse con los grupos diana en el otro extremo. Se pueden incluir grupos espaciadores en el diseño para extender el grupo de biotina lejos de las moléculas modificadas, asegurando así una mejor capacidad de interacción con las sondas de avidina o estreptavidina.

Existen varios reactivos de biotilación disponibles para la modificación de proteínas y otras biomoléculas. Dentro de ellos se encuentran los reactivos de biotilación con amina que contienen grupos reactivos fuera de la cadena lateral del ácido valérico de la biotina que pueden formar enlaces

covalentes con aminas primarias en proteínas y otras moléculas. Dos tipos básicos de reactivos de aminas que están comúnmente disponibles son: ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) y carboxilatos.

1.1.3.3 Ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS):

Los ésteres de NHS reaccionan espontáneamente por ataque nucleofílico de una amina en el grupo carbonilo, liberando el grupo NHS y formando un enlace amida estable (Figura 9). Mientras que los compuestos de biotina que contienen carboxilato pueden activarse en un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) mediante una reacción mediada por carbodiimida utilizando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), para luego acoplarse a amina para modificación directa de grupos amina en proteínas y otras moléculas. NHS-biotina es el reactivo de biotilación más simple disponible. Las reacciones de modificación se llevan a cabo en condiciones ligeramente alcalinas y generalmente dan como resultado una alta eficiencia de incorporación de biotina.

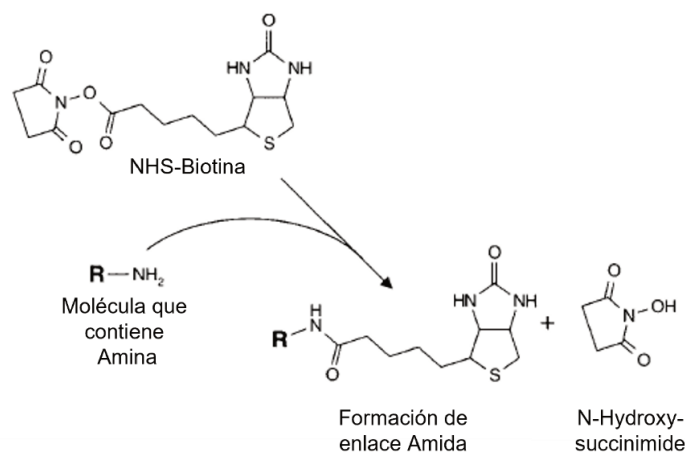


Figura 9: Reacción de biotilación. El grupo éster activo de NHS-biotina reacciona con compuestos que contienen amina para formar enlace de amida. *Imagen adaptada de Hermanson, 2008 (G. T. Hermanson, 2008).*

NHS-biotina es insoluble en ambientes acuosos. Debe disolverse primero en disolvente orgánicos como dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO). La adición de una solución de NHS-biotina a una reacción no debe exceder un nivel de aproximadamente 10 por ciento de solvente orgánico en el tampón para evitar problemas de precipitaciones de proteínas. Una vez añadida al medio de reacción, la NHS-biotina puede aparecer como una suspensión turbia o nebulosa, lo que indica una solubilidad incompleta. Sin embargo, tales microdispersiones todavía son efectivos en la modificación. Se puede realizar la biotilación de péptidos u otras moléculas que son insolubles en agua completamente en solvente orgánico (G. T. Hermanson, 2008).

1.2 Objetivos del capítulo 1

A los fines de obtener un nuevo antígeno útil para el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi*, en este capítulo se describe el diseño y obtención de CP4, una nueva proteína recombinante quimérica, compuesta por cinco Ags específicos de *T. cruzi*. En una primera etapa, dicho Ag se evaluó para la detección de Ac IgG en sueros de Chagas crónicos mediante ensayo de ELISA indirecto debido a que los sueros de Chagas agudos son muy escasos. Por último, se conjugó CP4 a moléculas de biotina y se evaluó su reactividad mediante ensayo de ELISA de captura de Ac IgG para posteriormente poder utilizarlo mediante ensayos de ELISA de captura para la detección de Ac IgM anti-CP4 para la detección de la infección vertical.

1.3 Materiales y métodos:

1.3.1 Diseño y obtención de la proteína recombinante CP4

1.3.1.1 Diseño y obtención de ADN codificante

Como se esquematiza en la Figura 10 la construcción de la nueva proteína recombinante quimérica a obtener, a la cual llamamos CP4, consiste en la fusión de las proteínas recombinantes CP1 y CP3.

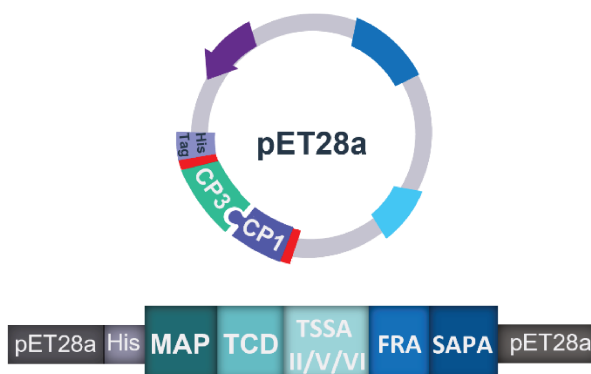


Figura 10: Representación esquemática de la construcción de una nueva proteína quimérica, CP4. Plásmido recombinante pET28a-CP4 fusionado a His; constituido por la unión de dos proteínas recombinantes que dan lugar a la expresión de los Ags: MAP, TcD, TSSA II/V/VI (CP3) FRA y SAPA (CP1).

Se diseñaron cuatro *primers* para unir, mediante PCR *overlapping* (OV), los dos fragmentos de ADN de interés (Figura 11). Los *primers* de los extremos contaron de las enzimas de restricción EcoRI y SalI (Gris) (Fw1:GAATTCCCGGCCATGTGG; Rv4:GTCGACATCGGGCAAATCAAACCATA).

Por su parte, los *primers* internos (Rv2:CTTCTACTTCCTGACGACGCTTCAGCC; Fw3:TCGTCAGGAAGTAAGAAGAAGCTTGCCGACC, se diseñaron de manera tal que tengan una zona de hibridación de 18 pb (Amarillo), incluyendo nucleótidos que den lugar a los aminoácidos glicina y serina (Negrita) para dar flexibilidad a la proteína en su conformación.

Se llevaron a cabo dos amplificaciones: en el paso 1 se realizó la amplificación del gen que expresa a CP3 utilizando Fw1 y Rv2, y en el paso 2 se realizó la amplificación del gen que expresa CP1 utilizando Fw3 y Rv4.

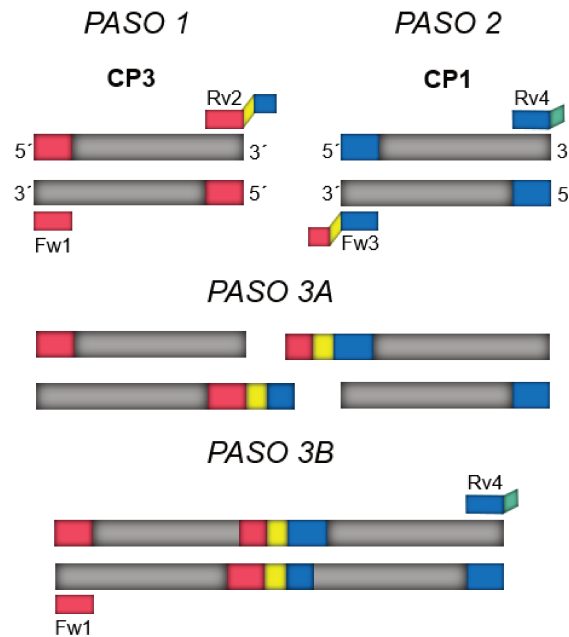


Figura 11: Obtención de una nueva proteína quimérica para el diagnóstico de *T. cruzi*. Esquema del diseño propuesto para realizar PCR-OV.

Tanto para el paso 1 como para el paso 2 realizamos PCR en un volumen final de 50 μ L utilizando como molde 5 μ L de *miniprep* (Mp) de CP3 como de Mp de CP1. La mezcla de amplificación consistió en 5x *buffer* de PCR (Promega), 250 μ M de dNTP (TransGen Biotech Co), 1 U de Taq DNA polimerasa (Promega) y 0,25 μ M de *primers* (Invitrogen) Fw y Rv. La amplificación de las muestras se realizó en el termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™) con un programa de desnaturalización inicial a 94°C durante 1,5 min, seguido de 10 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento a 51°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; 20 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; y por último un paso de extensión a 72°C durante 5 min.

Luego se realizó PCR-OV, paso 3, en la cual el perfil térmico de la PCR fue diseñado para fomentar la formación de un producto híbrido de los productos obtenidos de los pasos 1 y 2. El volumen final de la PCR fue de 50 μ L utilizando como molde 117 ng/ μ L de la amplificación obtenida de CP3 y 119,21 ng/ μ L de la amplificación obtenida de CP1. El paso 3A consistió en la desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, fue seguida de 10 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 45°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto; continuando con el paso 3B en el cual se procedió con la incorporación de los *primers* (Fw1 y Rv4) seguida por una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min y luego 20 ciclos de la siguiente secuencia: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 1 min; y por último un paso de extensión a 72°C durante 5 min.

1.3.1.2 Transformación de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α

Se purificó el fragmento de interés de 800 pb con precipitación de ADN con etanol, se chequeó la concentración de ADN utilizando un equipo nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™) y se ligó al vector de expresión p-GEM-T (Promega®) mediante el uso de la enzima T4 ADN Ligasa (Promega®). La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α por shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias fueron plaqueadas en medio LB-Agar suplementado con Ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. transformadas que captaron el vector con el gen (colonias blancas) y las que no lo hicieron (colonias azules). Luego, con el fin de verificar si el fragmento de interés se insertó dentro del vector, se seleccionaron colonias blancas a las cuales se les realizó una PCR de colonias. Para esto se utilizaron los *primers* Fw1 y Rv4. A las colonias que fueron positivas para la PCR, se les realizó Mp del ADN plasmídico utilizando un kit comercial (Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3.1.3 Extracción y Ligación del ADN recombinante

Una vez corroborada la presencia de ADN plasmídico en la Mp, se procedió a realizar el corte de la misma con las enzimas de restricción SaII (Promega®) y EcoRI (Promega®) y se ligó al vector de expresión pET-28a (Novagen™) en los sitios de restricción EcoRI y SaII. El vector de expresión pET-28a, de 5369 pb, presenta selección por resistencia a Kanamicina (Kan), promotor T7lac y produce proteínas fusionadas a 6 Histidinas (His) en su extremo N terminal. El mismo fue elegido debido a que la secuencia de His incorporadas permite su purificación en columna de Níquel inmovilizado. La ligación se realizó mediante el uso de la enzima T4 ADN Ligasa (Promega®). La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

1.3.1.4 Transformación de bacterias *E. coli*

Con el producto de ligación (pET28-CP4) se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) por shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias fueron plaqueadas en medio LB-Agar con Kan como agente selector.

Para verificar que el producto clonado en el vector pET-28 sea el correspondiente a CP4, se realizó una PCR de colonias utilizando los *primers* Fw1 y Rv4, y Mp de las colonias obtenidas.

1.3.1.5 Expresión de la proteína recombinante CP4

Para la expresión de la proteína recombinante las colonias obtenidas se replicaron en 3 mL de medio LB líquido con 50 μ g/mL de Kan a 37°C bajo agitación durante toda la noche (ON, del inglés: *over night*). Al día siguiente, las muestras se diluyeron 100 veces en un medio LB fresco suplementado con Kan y se incubaron, en iguales condiciones hasta llevar a crecimiento exponencial (2 h aproximadamente, DO₅₅₀ = 0,5-0,6), momento en que se indujo la expresión mediante el agregado del

agente inductor IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Con el fin de optimizar este paso de expresión proteica, se ensayaron dos condiciones de inducción: a) mediante el agregado de IPTG 0,1 mM ON a 180 rpm y 20°C b) mediante el agregado de IPTG 1 mM durante 3 h a 180 rpm y 37°C. En ambos casos se preparó también un cultivo sin IPTG como control de la inducción.

La expresión de la proteína de interés se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La composición de los geles y las distintas soluciones empleadas durante la electroforesis son detalladas en el anexo. Para ello, 250 μ L de cada cultivo inducido fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. Cada, precipitado fue solubilizado con 32 μ L de agua destilada y 8 μ L de *buffer* de muestra 5X y hervido durante 5 min. Luego, se sembraron 10 μ L en el gel junto al marcador de peso molecular Pierce Unstained Protein (14,4 a 116 kDa, Thermo Fisher ScientificTM). La corrida electroforética se realizó en una cuba BIO-RAD® a 150 V y el gel se tiñó con azul de Coomasie durante 40 minutos.

1.3.1.6 Obtención de la proteína recombinante CP4

Para, la preparación de proteína recombinante en las cantidades requeridas para los ensayos, una colonia fue repicada en 2 mL de medio LB-Kan e incubada a 37°C bajo agitación durante toda la noche. Al día siguiente, 1 mL del cultivo se repicó en 100 mL de medio LB-Kan y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una $DO_{550} = 0.5-0.6$. En ese punto, se agregó IPTG 0,1 mM y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo agitación para la expresión del Ag de interés. Paralelamente, la muestra fue repicada en 3 mL de medio LB-Kan sin agente inductor, como control de la expresión proteica.

El cultivo obtenido fue centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. El precipitado fue solubilizado con agua destilada en una proporción de 40% del volumen inicial y sonicado (Vibra-Cell, Sonic & Material Inc) hasta la clarificación del cultivo. Luego, el cultivo clarificado fue centrifugado durante 5 minutos a 10000 rpm. Para determinar si la proteína de interés se encontraba en la fracción soluble o en la precipitada, alícuotas de cada una de ellas fueron analizadas en SDS- PAGE.

1.3.1.7 Purificación de la proteína

Se utilizó una columna de agarosa con Níquel inmovilizado (Ni-NTA Agarose R901-15, InvitrogenTM) de 1 mL, con el objetivo de eliminar contaminantes celulares y evitar, de este modo, posibles interferencias en los ensayos de ELISA. El Níquel interacciona específicamente con la cola de His presentes en las proteínas recombinantes, de esta manera, la mismas, quedan retenidas en el interior de la columna separándose del resto. Para la elución de los fragmentos se utilizaron soluciones de Imidazol con concentraciones crecientes de 20 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM. Todas las fracciones recolectadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15% para visualizar en qué fracciones de elución se encontraba la proteína y a su vez para evaluar su integridad y pureza. Luego se

calculó la concentración de proteínas mediante el método colorimétrico del ácido bicinoninico (BCA) (Bainor et al., 2011).

1.3.1.8 Expresión y purificación de la proteína recombinante SAPA:

De modo similar se trabajó para la expresión y purificación de la proteína SAPA cuyo clon fue obtenido previamente en el Laboratorio de Tecnología Inmunológica, en *E.coli* DE3 (BL21) bajo la construcción plasmídica pET32a-SAPA (Camussone et al., 2009).

1.3.2 Proteínas recombinantes CP1, CP3, P2β, B13, TSNt y TSf:

En el Laboratorio de Tecnología Inmunológica se disponía de stock de las proteínas recombinantes CP1, CP3, P2β, B13, TSNt y Tsf purificadas y cuantificadas según las publicaciones del grupo (Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009; Peverengo et al., 2018; Prochetto et al., 2017, 2022).

1.3.3 Panel de suero

1.3.3.1 Panel de sueros para evaluación de Ac anti-IgG específicos de *T. cruzi* (Panel G):

Se obtuvieron muestras de sueros de donantes de sangre que asistieron al Hospital J. B. Iturraspe (Santa Fe, Argentina). Se excluyeron muestras con serología positiva para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), sífilis y hepatitis A, B y C. Dos pruebas comerciales diferentes incluyendo ELISA y HAI de Wiener Lab (Argentina) fueron empleadas para evaluar estado de infección crónica por *T. cruzi*. La condición serológica fue confirmada como positiva cuando se obtuvieron resultados concordantes, según lo establecido por procedimientos técnicos estándar de la OMS (WHO, 2002). Las muestras se clasificaron como: CH+: cuando dieron positivo para la infección crónica por *T. cruzi* y CH-: en el caso de ser negativos para *T. cruzi* (Figura 12).

El protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la FBCB-UNL (CE2020-58).

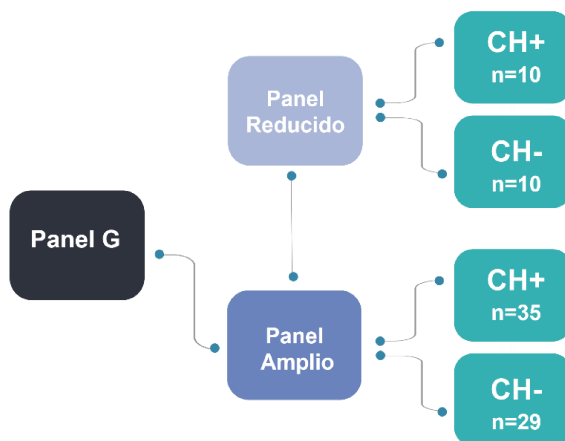


Figura 12: Panel de suero G. Panel reducido y amplio de sueros Chagas crónicos.

1.3.3.2 Pools de muestras positivas y negativas:

Para evaluar el conjugado de CP4-B se utilizaron pools de sueros, los cuales se conformaron, a partir de las muestras descriptas anteriormente, de la siguiente manera:

- Pool CH+: conformado por muestras perteneciente al grupo CH+.
- Pool CH-: conformado por muestras pertenecientes al grupo CH-.

1.3.4 Evaluación de la reactividad del antígeno CP4 obtenido

1.3.4.1 Puesta a punto del ensayo de ELISA:

En la puesta a punto del ensayo, para la sensibilización de la microplaca de ELISA, se utilizaron 100 μL de diferentes concentraciones de CP4 (100 ng y 500 ng por pocillo) en *buffer* carbonato (pH 9,6). Luego se realizó un bloqueo con 200 μL de leche descremada al 5% en PBS 1X (pH 7,4) y se evaluó incubando con 100 μL de sueros (dil 1/100) de un panel reducido (CH+; n=10 y CH-; n=10) y como Ac conjugado se utilizó 100 μL por pocillo de Ac de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidasa (anti-IgG_{hu}-HRP, Jackson) (dil 1/15000). Para las diluciones de los sueros como del Ac anti-IgG_{hu}-HRP se utilizó leche descremada al 1% en PBS 1X. Entre cada paso, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,05% (v/v) Tween 20 y cada paso de incubación fue a 37°C -30 min. La reacción enzimática se desarrolló con 100 μL por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo usando 100 μL por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Se determinó densidad óptica (DO) de las placas a 450 nm en un lector ELISA (Molecular Devices Emax).

Se calculó la relación entre la DO media de los sueros CH+ y la DO media de los sueros CH- ($\Delta\text{DO}+/\Delta\text{DO}-$) para evaluar la discriminación entre sueros positivos y negativos.

1.3.4.2 Evaluación del panel de sueros G:

Se sensibilizaron las microplacas de ELISA con 500 ng por pocillo del Ag CP4 en *buffer* carbonato (pH 9,6) y luego se procedió con el ensayo como se describe en el inciso anterior.

Las muestras de suero se evaluaron por duplicado y el resultado de la prueba fue el valor medio de densidad óptica (DO). Los valores de corte (*cut-off*) se calcularon como el DO medio de los controles negativos más 2 desviaciones estándar de esa media.

Para salvar la heterogeneidad propia de la técnica de ELISA, los valores de DO fueron expresados como el índice de densidad óptica (IDON) que corresponde a la DO de la muestra en relación con el valor de *cut-off* definido en la ecuación 1 como:

$$IDON = \frac{DO \text{ muestra}}{cut - off} \quad (1)$$

Los valores de IDON se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad (Versión 5.03) donde se determinó una LC que permitió obtener valores óptimos de Se, Es, área bajo la curva (AUC) e índice de Youden (J). La muestra se consideró positiva para la EC cuando se obtuvo un resultado \geq LC y negativa cuando se observó un resultado $<$ LC.

1.3.5 Conjugación de CP4 con Biotina

1.3.5.1 Biotinización de CP4:

Se dializó por diafiltración (1/1000) 1000 μ L de la proteína recombinante quimérica CP4 (C= 2 mg/ml) contra *buffer* Ácido Bórico/Borato (0,1M pH 8,8 a 4 °C) utilizando una columna de ultrafiltración Vivaspin™ de 20 mL, con una línea de corte de 10,000 MWCO (*molecular weight cut-off*). Se preparó una solución de 10 mg/mL de Biotinyl N-hydroxysuccinimide ester (Sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO). Luego de obtener CP4 dializada, se le adicionó 40 μ L de solución de éster biotina de manera de cumplimentar la relación de 100 μ g de biotina por cada mg de proteína. Se incubó durante 4 h en agitación en balanceador a temperatura ambiente.

Luego de la etapa de biotinización propiamente dicha, se inhibió la reacción agregando una solución de NH₄Cl 1M, para neutralizar la biotina remanente con iones amonio, respetando una relación de 20 μ L de solución por cada 250 μ g de biotina agregada. Se incubó en balanceador a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, para eliminar la biotina no reaccionante, se dializó (1/1000) mediante diafiltración contra *buffer* PBS 1X. Como último paso, se centrifugó el material biotinilado en microcentrífuga a 13.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el precipitado y se recuperó el sobrenadante conservándolo a -20 °C.

1.3.5.2 Evaluación de la reactividad del conjugado CP4-B:

Para determinar la correcta biotinización de la proteína, se realizó un ensayo de ELISA directo. Para esto, se sensibilizaron pocillos de la placa de ELISA con 20 μ L de CP4-B y se utilizó como control un pocillo sin sensibilizar. Se realizó un bloqueo con 40 μ L de PBS-Leche descremada al 5% en PBS 1X y luego se incubó con 20 μ L de una solución de Streptavidina-Peroxidasa (SAv-HRP; BD OptEIA™) en dil 1/150 en PBS 1X. Entre cada paso, las placas se lavaron tres veces con PBS con 0,05% (v/v) Tween 20. La reacción enzimática se desarrolló con 20 μ L por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo usando 20 μ L por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Se determinó la densidad óptica (DO) de las placas a 450 nm en un lector ELISA (Molecular Devices Emax).

1.3.5.3 Evaluación del comportamiento antigénico del conjugado CP4-B:

Se realizó un ensayo de ELISA de captura para la detección de Ac IgG específica enfrentando CP4-B a pools de sueros (panel G) CH+ y CH-. Se evaluaron diferentes variables: diluciones (1/100; 1/250) del Ac anti-IgG humano (anti-IgG_{hu}, Millipore), concentración de CP4-B (0,5 mg/ml; 1mg/mL y 1,5 mg/mL) y la utilización de la mezcla de CP4-B con SAv-HRP previamente incubados.

La cantidad óptima de los reactivos utilizados en el ensayo ELISA se determinó mediante valoración de tablero de ajedrez. Se calculó la relación entre la DO del pool CH+ y la DO del pool CH- ($\Delta DO+/\Delta DO-$) para evaluar la discriminación entre positivos y negativos.

1.4 Resultados

1.4.1 Obtención de la proteína recombinante CP4

1.4.1.1 Diseño y obtención del nuevo antígeno:

Con la finalidad de obtener una proteína recombinante quimérica que contenga a los cinco Ags que dan lugar a CP1 y CP3, se diseñó una nueva construcción quimérica multiepitope recombinante de *T. cruzi*, la cual llamamos CP4. Para llevar a cabo su obtención, como se detalla en el inciso 1.3.1.1, se diseñaron cuatro *primers* para unir mediante PCR-OV los dos fragmentos de ADN de interés que la componen.

De las amplificaciones llevadas a cabo, se obtuvo una banda de 370 pb correspondiente al gen que expresa CP3 y un fragmento de 430 pb correspondiente al gen que expresa CP1 (Figura 13 A). Utilizando estos dos fragmentos en la PCR-OV se obtuvo un fragmento de 800 pb (Figura 13 B).

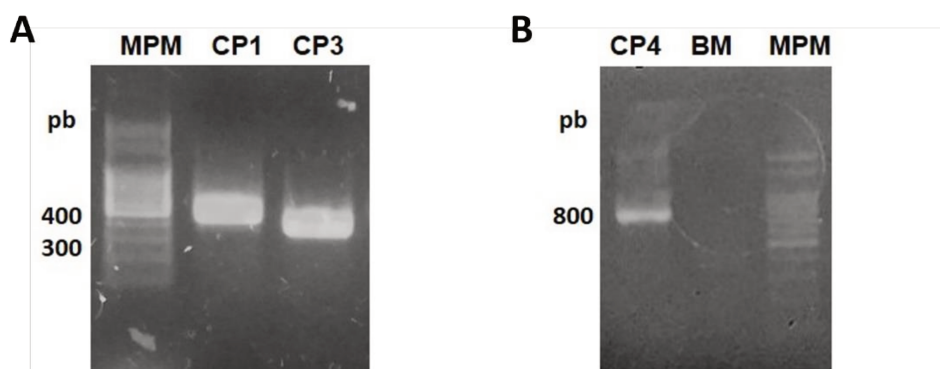


Figura 13: Obtención de una nueva proteína quimérica para el diagnóstico de *T. cruzi*. Gel de agarosa para los fragmentos obtenidos del paso 1 y paso 2 (izquierda) y PCR-OV (derecha).

Luego, el fragmento se ligó al vector pGEM-T y se transformó en bacterias *E coli*. Utilizando X-Gal, se pudo determinar que 6 de 65 colonias, eran blancas, por lo que podíamos interpretar que esas colonias captaron la ligación pGEM-T-CP4. Posteriormente se realizó una PCR de colonias y como tal como se observa en la Figura 14, de las 6 colonias, solo 4 amplificaron el fragmento de interés. Las colonias 11, 14, 23 y 33 presentaron una banda a aproximadamente 800 pb coincidiendo con la altura deseada para el fragmento de interés.

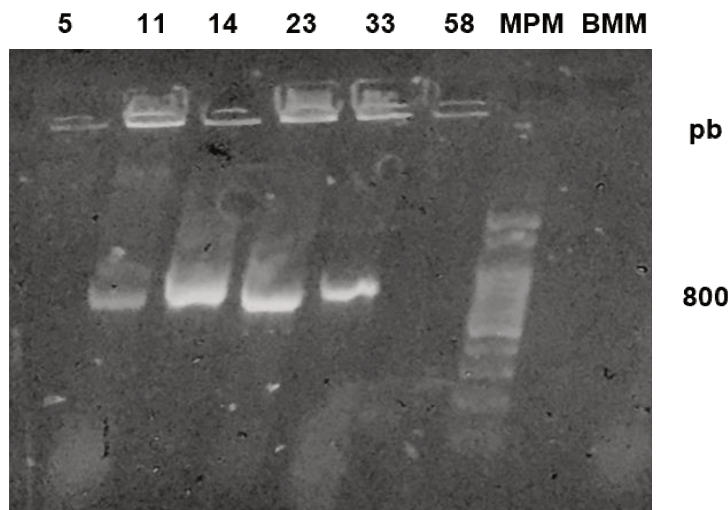


Figura 14: PCR de colonias para los clones pGEM-T-CP4 obtenidos. Clon 5 y 58 no presentaron banda de reacción. Clones 11, 14, 23 y 33 presentaron banda de reacción a una altura aproximada de 800 pb.

Se obtuvieron Mp de dichas colonias y se realizaron los cortes con enzimas de restricción. El fragmento de interés liberado de 800 pb se purificó y se ligó al vector de expresión pET28a. Luego de la transformación de la ligación pET28a-CP4 con células de *E. coli* BL21 (DE3) se obtuvieron 7 clones, todos positivos para la PCR de colonias realizada (Figura 15).

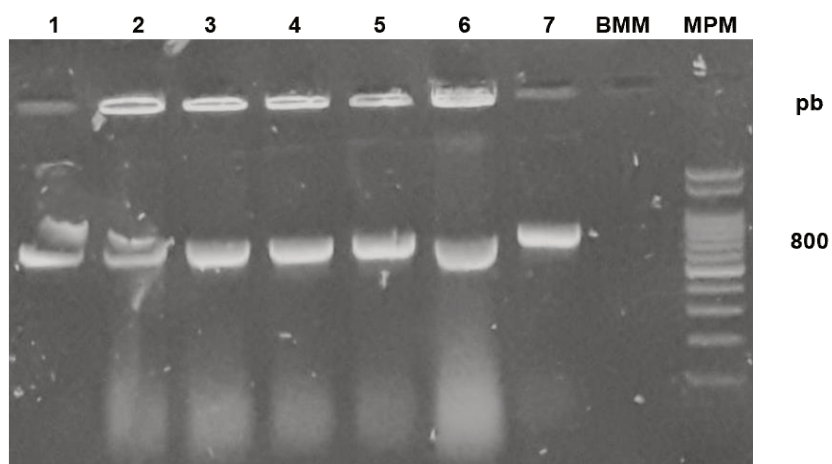


Figura 15: PCR de colonias para los clones pET28a-CP4 obtenidos. Clon 1 a 7 presentaron banda de reacción a una altura aproximada de 800 pb. BMM: blanco molecular de reacción. MPM: marcador de peso molecular.

1.4.1.2 Expresión y purificación de CP4:

Se verificó mediante SDS-PAGE la capacidad de expresión de la proteína recombinante quimérica con un peso molecular de 60 kDa. Se obtuvo inducción tanto con el protocolo de incubación durante toda la noche a temperatura ambiente y el protocolo de incubación de 3 h a 37°C. En la Figura 16 A, se puede observar, que solo un clon presentó inducción para el protocolo 3 h, mientras que 4 clones para el protocolo ON. Se seleccionó el clon de la calle 13, para ser inducido en un cultivo de

mayor volumen (100 mL). A su vez, para conservar un stock de este clon, se lo repicó en medio LB-glicerol y se congeló a -80°C .

Luego del sonicado, se verificó mediante SDS-PAGE la presencia de CP4 en la fracción soluble. Posterior a la purificación, las fracciones eluidas, fueron analizadas por SDS-PAGE. En la Figura 16 B se observa que la mayor cantidad de CP4 eluye con la solución de Imidazol 100 mM. Además, puede observarse, que las calles 8 a 11 no presentaron bandas relacionadas con impureza. Estas fracciones se juntaron y concentraron mediante centrifugación utilizando una columna de ultrafiltración VivaspinTM de 20 mL, con una línea de corte de 10,000 MWCO (*molecular weight cut-off*). Luego se cuantificó por el método del ácido bicinonínico obteniendo una concentración de 0,75 mg/ml.

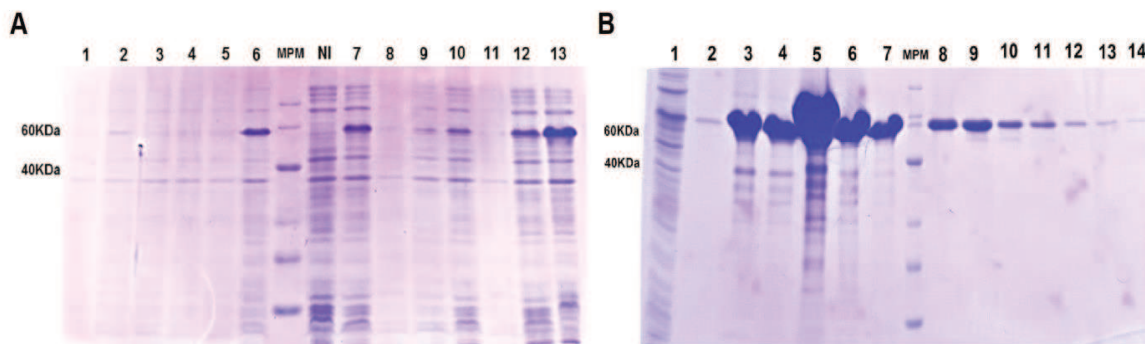


Figura 16: SDS- PAGE. A) Inducción de CP4. Calles 1 a 6 inducción de diferentes clones 3h; MPM, marcador de peso molecular; NI, cultivo no inducido; calles 7 a 13 inducción de diferentes clones ON. B) Purificación de CP4. Calle 1, eluido; calle 2, fracción de CP4 en Imidazol 20 mM; calle 3, fracción de CP4 en Imidazol 50 mM; calles 4 a 7, fracción de CP4 en Imidazol 100 mM; MPM, marcador de peso molecular; calles 8 a 11, fracción de CP4 en Imidazol 250 mM; calles 12 a 14 fracción de CP4 en Imidazol 500 mM.

1.4.1.3 Expresión y purificación de SAPA:

A partir del clon disponible en el laboratorio correspondiente a la secuencia repetitiva de SAPA insertada en el plásmido pET24 y clonada en *E. coli* BL21 (DE3), se expresó y purificó la proteína recombinante de *T. cruzi* de fase aguda SAPA.

Se verificó mediante SDS-PAGE la capacidad de expresión de la proteína recombinante quimérica con un peso molecular de 40 kDa. En la Figura 17 A, se pudo observar, que los cinco clones evaluados presentaron inducción para el protocolo de inducción utilizado. Se seleccionó el clon de la calle 3, para ser inducido en un cultivo de mayor volumen (100 mL). Luego del sonicado, se verificó mediante SDS-PAGE la presencia de SAPA en la fracción soluble.

Posterior a la purificación, las fracciones eluidas, fueron analizadas por SDS-PAGE. En la Figura 17 B y Figura 17 C se observa que la mayor cantidad de SAPA eluye con la solución de Imidazol 100 mM y 250 mM. Además, puede observarse, que las calles no presentaron bandas relacionadas con

impureza. Estas fracciones se juntaron y luego se cuantificaron por el método del ácido bicinónico obteniendo una concentración de 0,744 mg/ml.

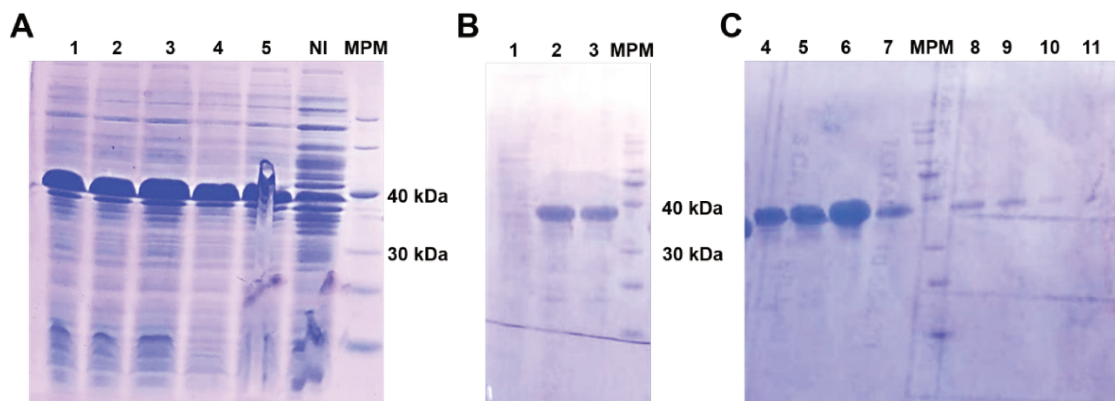


Figura 17: SDS- PAGE. A) Inducción de SAPA. Calles 1 a 5 inducción de diferentes clones ON; NI, cultivo no inducido; MPM, marcador de peso molecular. B y C) Purificación de SAPA. Calle 1, eluido; calle 2 y 3, fracción de SAPA en Imidazol 100 mM; MPM, marcador de peso molecular; calles 4 a 7, fracción de SAPA en Imidazol 250 mM; calle 8 a 11, fracción de SAPA en Imidazol 500 mM.

1.4.1.4 Análisis mediante SDS-PAGE de los Ags CP1, CP3, P2 β y B13:

Las proteínas recombinantes solubles CP1, CP3, P2 β y B13 con un peso molecular de 45, 35, 34 y 32 kDa respectivamente estaban en stock disponibles en el LTI. Antes de proceder con su utilización fueron evaluadas mediante SDS-PAGE para corroborar su integridad. Como se observa en la Figura 18, para las 4 proteínas analizadas, las calles no presentaron bandas relacionadas con impureza.

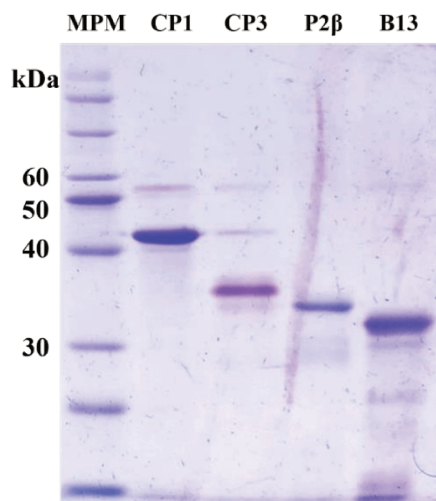


Figura 18: Evaluación de la integridad de los Ags CP1, CP3, P2 β , B13. SDS-PAGE al 15% de los Ags con un peso molecular de 45, 35, 34 y 32 kDa respectivamente.

1.4.2 Evaluación del comportamiento antigénico de CP4

En primera instancia, teniendo en cuenta la problemática respecto a la disponibilidad de sueros de bebés, para evaluar el desempeño antigénico de la nueva proteína recombinante, se la evaluó mediante ensayo de ELISA indirecto enfrentándola al panel de sueros G.

Para la puesta a punto del ensayo de ELISA indirecto para el diagnóstico de la infección crónica, mediante la detección de Ac IgG anti-CP4 específicos para *T. cruzi* se evaluaron diferentes concentraciones del Ag para la sensibilización de la placa de ELISA frente a sueros clasificados como Ch+ (n=10) y Ch- (n=10). Como se observa en la Tabla 1, se obtuvo una mejor discriminación entre sueros positivos de negativos con la condición de 500 ng.

Tabla 1: Valores de la relación $\Delta DO+/\Delta DO-$ obtenidos para las condiciones de ELISA de captura de IgG. Condiciones evaluadas de CP4 frente al panel reducido de sueros G, sueros Ch+ y sueros Ch

Condición	$\Delta DO+/\Delta DO-$
100 ng por pocillo	6,07
500 ng por pocillo	10,8

Por lo tanto, se decidió realizar la evaluación del panel de sueros ampliado (n=35 CH+ y n=29 CH-) utilizando 500 ng de CP4 en la sensibilización del ensayo de ELISA. En la Figura 19 se observa que, si bien se obtuvo buena discriminación entre sueros positivos y negativos ($\Delta DO+/\Delta DO- = 7,17$), la misma disminuyó en comparación al $\Delta DO+/\Delta DO-$ obtenido en la evaluación previa con el panel reducido.

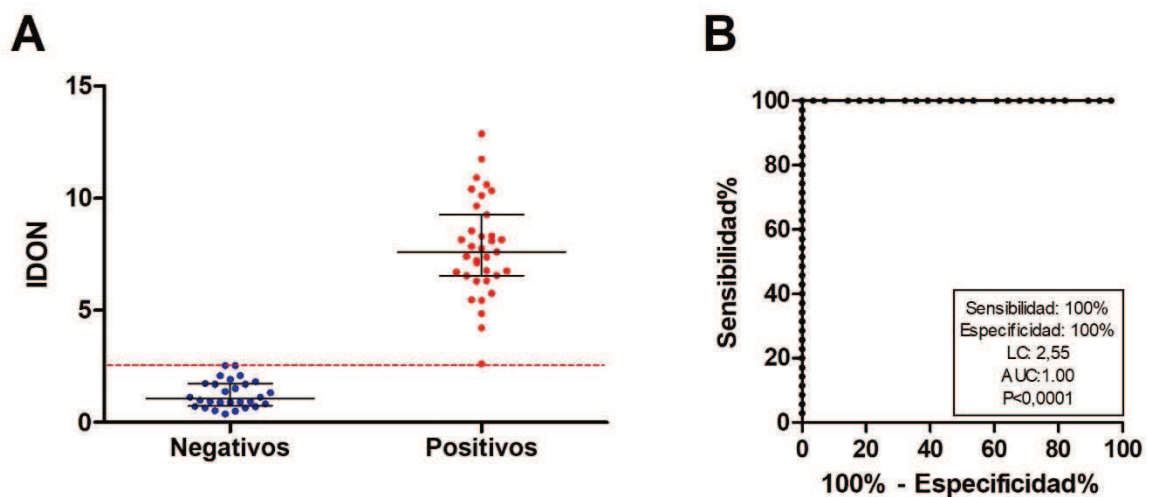


Figura 19: Desempeño diagnóstico de la quimera CP4 frente al panel de sueros G. A) Distribución de los valores de IDON y B) Curva ROC, para el panel de sueros evaluado (n=35 CH+ y n=29 CH-) La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar SD para cada grupo de sueros y la línea discontinua roja indica la LC para discriminar entre sueros positivos y negativos.

Los valores de Se y Es obtenidos a partir de la curva ROC de los valores de IDON fueron del 100%.

1.4.3 Conjugación del antígeno CP4 a Biotina

1.4.3.1 Evaluación de la reactividad del conjugado CP4-B

La evaluación del conjugado obtenido de CP4-B, se realizó de manera preliminar mediante un ensayo de ELISA directo, incubando la placa sensibilizada con el mismo y revelando con SA-HRP. Se observó muy buena señal para CP4-B en comparación con el control (DO=1,40 vs DO=0,5).

1.4.3.2 Evaluación del comportamiento antigénico del conjugado CP4-B

Como se mencionó anteriormente, teniendo en cuenta la variable limitante de los sueros de bebés, en primera instancia para evaluar el desempeño antigénico del conjugado CP4-B se llevó a cabo un ensayo de ELISA de captura de Ac IgG. Para ello se evaluaron diferentes variables: diluciones de Ac anti-IgG_{hu}, concentración de CP4-B y la utilización de la mezcla de CP4-B con SA-HRP previamente incubados, frente a un pool de sueros Ch+ y un pool de sueros Ch-, conformados por sueros de Chagas crónicos (panel reducido G).

La cantidad óptima de los reactivos a utilizar en el ensayo de ELISA de captura de Ac IgG anti-CP4 específicos de *T. cruzi*, se determinó preliminarmente mediante valoración de tablero de ajedrez.

Como puede observarse en la Tabla 2, la mejor condición con la cual se obtuvo una buena discriminación entre pool de sueros Ch+ del pool de sueros Ch- ($\Delta DO+/\Delta DO- = 3,54$) fue en la que se utilizó el Ac anti-IgG_{hu} con una dil de 1/250 y la mezcla de 500 ng de CP4-B con SA-HRP (1/150), incubados previamente.

Tabla 2: Valores de la relación $\Delta DO+/\Delta DO-$ obtenidos para diferentes condiciones de ELISA de captura de IgG utilizando CP4-B. Condiciones evaluadas frente a pool de sueros Ch+ y pool de sueros Ch-.

Condición	Ac anti-IgG _{hu}	Suero	CP4-B (ng por pocillo)	SA-HRP	$\Delta DO+/\Delta DO-$
I	1/250	1/100	500	1/150	2,37
II	1/250	1/100	1000	1/150	2,30
III	1/250	1/100	1500	1/150	2,18
III	1/250	1/100	500	1 en 50	1,10
IV	1/250	1/50	500	1/150	1,62
V	1/250	1/100	500 + 1/150		3,54

Por lo tanto, el ELISA de captura de Ac IgG permitió corroborar que la utilización del Ag CP4 conjugado a biotina, tiene un buen funcionamiento cuando es utilizado en el formato de ensayo de ELISA de captura para la determinación de IgG específica.

1.5 Discusión

Durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, la infección se diagnostica mediante la detección de Acs contra los Ags de *T. cruzi* presentes en el suero. La detección se logra a través de métodos serológicos convencionales basados en principalmente ensayo de ELISA, HAI o IFI.

La tendencia actual es producir ensayos de inmunodiagnóstico basados en proteínas recombinantes como elementos sensibilizantes para mejorar el rendimiento diagnóstico, lograr ensayos más estandarizados, reducir costos y evitar el uso de microorganismos patógenos (Aguirre et al., 2006; Camussone et al., 2009; da Silveira et al., 2001; Granjon et al., 2016; Houghton et al., 1999; Praast et al., 2011; F. L. N. Santos et al., 2017). Sin embargo, como los Ags individuales a menudo no son lo suficientemente sensibles, las mezclas de estos Ags son de uso común (WHO, 2010). Para mejorar el rendimiento de un inmunoensayo preparado con múltiples Ags, también se han propuesto proteínas multiepítotos que expresan varios determinantes Ags no relacionados (Aguirre et al., 2006; Houghton et al., 1999, 2000; F. L. N. Santos et al., 2016). Esta estrategia ofrecería varias ventajas, como (i) una disminución en la cantidad de Ags utilizados en los inmunoensayos, (ii) proporción controlada de determinantes antigénicos que se muestran a los Acs, (iii) mayor número de epítotos disponibles en la misma superficie, (iv) más simple procesos de producción (da Silveira et al., 2001; Marcipar & Lagier, 2012).

En este trabajo obtuvimos y evaluamos una nueva proteína recombinante quimérica, CP4, la cual fue obtenida mediante PCR-OV de dos proteínas recombinantes quiméricas CP1 (compuesta por los Ags FRA y SAPA) y CP3 (compuesta por los Ags MAP, TSSA II/V/VI y TcD), ambas previamente descritas por nuestro grupo de trabajo (Camussone et al., 2009; Peverengo et al., 2018). Por lo tanto, toda la composición de determinantes antigénicos de CP4 quedó conformada entonces por los Ags SAPA, FRA, MAP, TcD y TSSA II/ V/VI, los cuales fueron utilizados previamente en diferentes quimeras para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Carvalho et al., 1993; Houghton et al., 1999; Peverengo et al., 2018; Praast et al., 2011; A. P. D. Santos et al., 2018; Umezawa et al., 2003). El Ag quimérico novedoso pudo expresarse y purificarse en forma soluble, una característica que lo hace adecuado para su uso en diferentes plataformas diagnósticas.

Previamente, se ha destacado la complementariedad de las proteínas CP1 y CP3 cuando se utilizaban en mezcla, para definir correctamente la infección crónica por *T. cruzi* en humanos (Peverengo et al., 2018). Se observó que, si bien CP1 y CP3 tenían rendimientos similares según el análisis ROC, había sueros que arrojaban resultados negativos con la proteína CP1 y se clasificaban correctamente utilizando CP3. Así también los sueros que arrojaban resultados en la zona gris disminuían notablemente cuando se utilizaba la mezcla de CP1 y CP3.

En base a este hallazgo que destaca la complementariedad de estas proteínas, inferimos que los determinantes antigénicos de CP1 y CP3 serían útiles para definir la infección crónica por *T. cruzi* en humanos si se expresaran como una única proteína, CP4. Para evaluar esta posibilidad, usamos CP4 para determinar si resultaba igual en relación con el uso de las proteínas CP1 y CP3 en mezcla en cuanto a la discriminación entre la DO de sueros reactivos y no reactivos mediante ensayos de ELISA indirecto para la detección de Ac IgG.

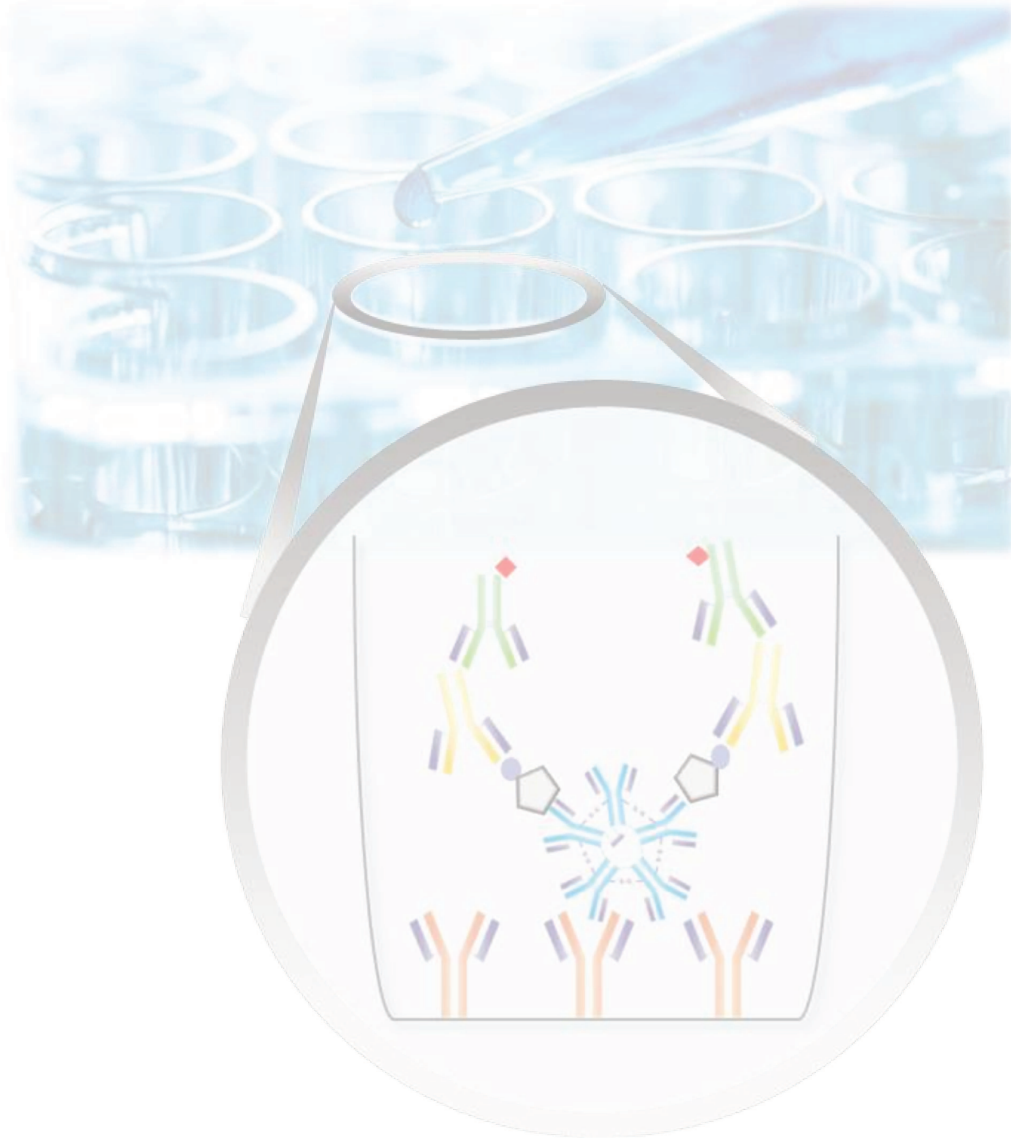
En cuanto a la evaluación de CP4 frente al panel de sueros completo, podemos decir que se clasificaron con éxito todos los sueros, lo que se vio reflejado en los valores de Se y Es obtenidos del 100%. Motivo por el cual CP4 presentó la misma Se y Es que la mezcla de CP1+CP3 (Peverengo et al., 2018) mediante la plataforma diagnóstica de ensayo de ELISA indirecto para detectar Ac IgG específica anti-*T. cruzi*.

Por otro lado, dado la propiedad de que el sistema biotina: estrept-avidina es utilizado en la conjugación de moléculas para inmunoensayos (Diamandis & Christopoulos, 1991), por la alta afinidad que tiene la biotina por la avidina y estreptavidina (Green, 1975), se procedió a conjugar a la nueva proteína recombinante quimérica CP4 con moléculas de biotina. Con la finalidad de poder utilizarla en la plataforma diagnóstica de ELISA, en principio para detectar la enfermedad de Chagas crónica y a posteriormente la enfermedad de Chagas vertical.

Fue posible obtener el conjugado de CP4-B con reactividad frente a estrept-avidina peroxidasa. Luego la aplicación diagnóstica del conjugado CP4-B se evaluó mediante ensayo de ELISA de captura de Ac IgG frente a sueros Chagas crónico (panel G), donde fue posible obtener buena discriminación entre el pool de sueros Ch+ del pool de sueros Ch-.

Motivo por el cual se decidió continuar y utilizar el conjugado frente a la evaluación de sueros de bebés para la detección de Ac IgM anti-CP4 frente a un ensayo de ELISA de captura utilizando el conjugado CP4-B obtenido que se describe en el siguiente capítulo.

2. Capítulo 2:
Desarrollo de un ensayo de ELISA de captura para la detección
de IgM específica frente a los antígenos de
T. cruzi



2.1 Introducción:

Los Ac IgM específicos para *T. cruzi* constituyen un biomarcador potencialmente efectivo para la detección de la infección vertical (Carrier & Truyens, 2015). Los Ac IgM maternos, en contraste con los Ac IgG, no son capaces de atravesar la membrana fetoplacentaria ni son transferidas por la lactancia. Por lo tanto, la detección de Ac IgM específicos para *T. cruzi* indica que se trata de Ac producidos por el sistema inmune del feto o del recién nacido en respuesta a la transmisión transplacentaria del parásito. Este criterio mostró buenos resultados al ser aplicado para otras infecciones de transmisión vertical como Toxoplasmosis, donde es posible detectar la infección congénita en alrededor del 70 al 80% de los recién nacidos (Carral et al., 2018; Fricker-Hidalgo et al., 1996; Lago et al., 2014; Naot et al., 1981), y Sífilis, siendo en este último caso, el método serológico más sensible para el diagnóstico de infección congénita (Herremans et al., 2010; Pastuszczak et al., 2018).

2.1.1 Ac IgM anti-*T. cruzi* en la enfermedad de Chagas vertical

Particularmente en el caso de la enfermedad de Chagas vertical, Umezawa y col. (1996) encontraron que mediante ensayos de Western blot (TESA blot) empleando Ag de excreción del parásito, era posible detectar Ac IgG (TESA blot IgG) e IgM (TESA blot IgM) específicos para SAPA y diferenciar entre pacientes en estadio crónico o agudo de la infección. La estrategia TESA blot IgM se evaluó para la detección de niños con infección vertical por *T. cruzi*. El método mostró una Se de 80,0% y una Es de 94,0%, considerando qPCR como prueba diagnóstica de referencia (Noazin et al., 2019). Sin embargo, TESA blot implica gran complejidad técnica, demanda mucho tiempo (1-2 días), requiere equipamiento e insumos costosos y personal experto, por lo que es poco transferible a los laboratorios de diagnóstico clínico.

Por otro lado, se han reportado distintas estrategias de ELISA para la detección de Ac IgM anti-*T. cruzi* en neonatos, las cuales se mencionan en la introducción de esta Tesis, indicándose que dichos enfoques no han sido satisfactorios originalmente debido a la falta de la captura de IgM en dichos ensayos. Sin embargo, más recientemente se ha descrito un ELISA indirecto para la detección de Ac IgM basado en el uso del Ag SAPA recombinante. Este método mostró una performance similar al diagnóstico por qPCR, con 94,3% de Se y 92,6% de Es al evaluar muestras de neonatos de menos de 1 mes de edad (Castro-Sesquen et al., 2021). Estos valores deben ser considerados con cautela ya que, en dicho trabajo, se consideró como gold estándar diagnóstico a la técnica de qPCR, por lo cual podríamos sugerir que la Se puede estar sobrevalorada, al no analizar el rendimiento diagnóstico frente a muestras clasificadas de acuerdo al algoritmo diagnóstico estándar sugerido por la OMS.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, para lograr una detección temprana de la enfermedad de Chagas vertical en este capítulo se describe el desarrollo de un ensayo de ELISA de captura de Ac IgM. Dicho ensayo se evaluó frente a sueros de bebés para determinar su desempeño.

2.1.2 Acoplamiento de ELISA a teléfonos inteligentes para pruebas en el punto de atención (POCT)

En este contexto, las pruebas POCT son necesarias para la detección de la ECv. Se espera que un sistema POCT ideal sea asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipo y entregable a los usuarios finales, para tener conectividad en tiempo real y fácil recolección de muestras. Estos criterios se conocen con el acrónimo REASSURED (por sus requisitos en inglés) (Land et al., 2019; Mabey et al., 2004). El paradigma de POCT es quizás el ensayo de flujo lateral que los pacientes pueden comprar en una farmacia para hacer por su cuenta; sin embargo, existe una variedad de ensayos que se pueden realizar fuera de los laboratorios convencionales, con la asistencia de personal capacitado; es decir, el paciente no es el operador de la prueba.

Sin embargo, el ELISA todavía requiere equipo de laboratorio tanto para la incubación (como baños secos o estufas) como para la lectura de señales (medidores de densidad óptica o los típicos lectores de placas ELISA). Además, se sabe que el ELISA requiere mucho tiempo y demanda operadores.

En la última década, los teléfonos inteligentes se han propuesto como equipo de lectura para ensayos de laboratorio utilizando la cámara integrada como sensor óptico (Martinez et al., 2008), que encontró aplicaciones que van desde dispositivos microfluidos a microscopios (Kim et al., 2020; Quesada-González & Merkoçi, 2017; Vashist et al., 2014). Además de la lectura, los teléfonos inteligentes ofrecen una diversidad de ventajas como almacenamiento de datos, potencia de cómputo, conectividad, numerosos sensores, geolocalización, trazabilidad, así como mecanismos de control y guía del usuario mediante el uso de aplicaciones de software (Schaumburg et al., 2018, 2022). Estas utilidades están ayudando a integrar fácilmente los POCT al campo de Internet de las cosas médicas (Jain et al., 2021).

En particular, la lectura de ELISA usando teléfonos inteligentes ha sido reportada para varias aplicaciones, como la detección de neuropéptidos (Murdock et al., 2013), hormonas (Zhdanov et al., 2018), biomarcadores de cáncer (Barbosa et al., 2015) y enfermedades que incluyen Zika (Kabir et al., 2020), sífilis (Laksanasopin et al., 2015), influenza A (Wu et al., 2017), paperas, sarampión y herpes (Berg et al., 2015). Algunos de los enfoques utilizan chips de materiales poliméricos personalizados (Laksanasopin et al., 2015; Zhdanov et al., 2018) o de papel (Wu et al., 2017), mientras que otros se basan en placas ELISA comerciales (Berg et al., 2015; Song et al., 2022), así como en alternativas imitando la matriz de pocillos de la placa ELISA (Carrilho et al., 2009; Murdock et al., 2013; Wang et al., 2021).

2.2 Objetivos del capítulo 2:

En este capítulo, se propuso diseñar, optimizar y evaluar ensayo de ELISA de captura para la detección de IgM específica frente a los antígenos de *T. cruzi* disponibles en el laboratorio y el obtenido en el capítulo 1. Luego, de modo de adaptar el ELISA de captura de IgM desarrollado a una plataforma POC, se desarrolló un método para reemplazar la lectura convencional del ELISA por la cámara de un teléfono inteligente destinado a ser utilizado como una herramienta práctica de diagnóstico en entornos de atención primaria de salud.

2.3 Materiales y métodos:

2.3.1 Panel de suero para evaluación de Ac anti-IgM específicos de *T. cruzi* (Panel M):

Se obtuvieron muestras de suero de neonatos y niños pequeños que asistieron a sus visitas de control regulares al Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" (Buenos Aires, Argentina). Se excluyeron los recién nacidos de mujeres con serología positiva para VIH. Las muestras se clasificaron de la siguiente manera:

2.3.1.1 Muestras positivas y negativas para optimizar el ensayo de ELISA:

Los grupos controles se conformaron de la siguiente manera:

- Grupo de control positivo (GCP): obtenidas de individuos infectados por transmisión vectorial durante la fase aguda, que muestran positividad para el método parasitológico, MH y por PCR.
- Grupo de control negativo (GCN): recién nacidos hijos de mujeres con serología negativa para la EC y cuyo estado fue confirmado por resultados negativo en el seguimiento serológico posterior de 9 meses después del Nacimiento.

En la Figura 20 se describe la cantidad de muestras que conformaron cada grupo.

2.3.1.2 Panel de sueros positivos y negativos para evaluar el ensayo de ELISA:

Se obtuvieron sueros de hijos de mujeres con serología positivos para la EC en el contexto de los controles neonatales habituales que presentaron MH+ o MH- con serología positivos 9 meses después del nacimiento, clasificando a los sueros como Ch+ y a los sueros que mediante el seguimiento serológico posterior a los 9 meses dieron negativo, se los clasifico como Ch-. A su vez, los sueros fueron clasificados como <15: para el caso de las muestras obtenidas dentro de los primeros 15 días después del nacimiento (primera consulta pediátrica, dada la dificultad de obtener sueros del Rn) y ≥ 15 : para el caso de las obtenidas 15 días después del nacimiento (Figura 20).

El protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la FBCB-UNL (CE2020-58) y el Comité ético del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (DI-2014-221). Se destaca que los restos de muestras de sangre empleadas en este trabajo se obtuvieron en el marco de los controles clínicos y bioquímicos habituales durante el seguimiento de los niños, conservados con codificación y protección adecuada de los datos personales.

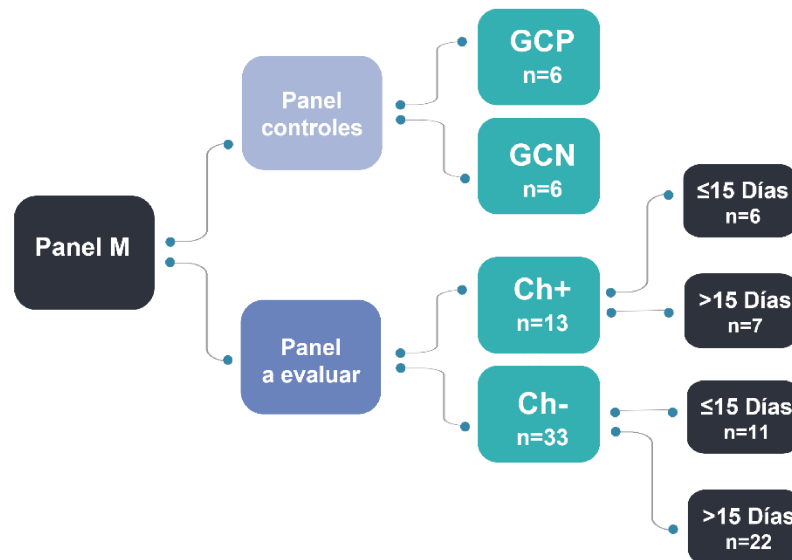


Figura 20: Panel de sueros M. Panel control: conformado por dos grupos, GCP n=6 y GCN n=6. Panel a evaluar: conformado por cuatro grupos Ch + <15 con n=6; Ch + ≥15 con n=7; Ch- <15 con n=11 y Ch- ≥15 con n = 22.

2.3.1.3 Sueros para evaluar reactividad cruzada

Además, se obtuvieron sueros de niños que han adquirido la infección del microorganismo de *Toxoplasma gondii* (T+ n=5) o de *Treponema pallidum* (S+ n=5) durante el embarazo para evaluar reactividad cruzada de la plataforma diagnóstica desarrollada.

2.3.2 Panel de sueros extendido (Panel M extendido):

Para esta instancia se obtuvieron más muestras de suero de neonatos y niños pequeños pertenecientes al Hospital Gutiérrez (Buenos Aires, Argentina).

- Ch-: muestras, pertenecientes a hijos de mujeres con serología positiva para la EC en el contexto de los controles neonatales habituales que presentaron MH- y serología negativa a los 9 meses, por lo cual fueron clasificadas como Ch-.
- Ch+: muestras, pertenecientes a hijos de mujeres con serología positiva para la EC que presentaron MH+ o MH- con serología positivos 9 meses después del nacimiento, clasificando a los sueros como Ch+.

En la Figura 21 se describe la cantidad de sueros clasificados.



Figura 21: Panel de sueros M extendido. Conformado por n=5 Ch+ y n = 66 Ch-.

2.3.3 Desarrollo de ELISA de captura de IgM

Como se observa en la Figura 22 se diseñó un ensayo de ELISA de captura de Ac IgM. El diseño consistió en principio en la búsqueda de un Ac anti-IgM humano (Ac anti-IgM_{hu}) que sea capaz de ser inmovilizado a las microplacas de ELISA. Luego, para el paso posterior a la incubación de las muestras de sueros de bebe (BB), se pensó en la incubación con un Ag específico de *T. cruzi* que sea expresado fusionado a una cola de polihistidina (Ag-His_{Tag}). Como paso siguiente, para que la interacción del Ag-Ac pueda ser detectada, se propuso la incubación con un Ac anti-Histidina (Ac anti-His), que sea capaz de unirse a la cola de polihistidina del Ag-His_{Tag} utilizado. Como último paso, y debido a que al Ac anti-His del cual se disponía no estaba conjugado a HRP, se necesitó de un paso más para poder revelar la reacción, por lo cual se necesitó de un Ac conjugado a peroxidasa (Ac conjugado).

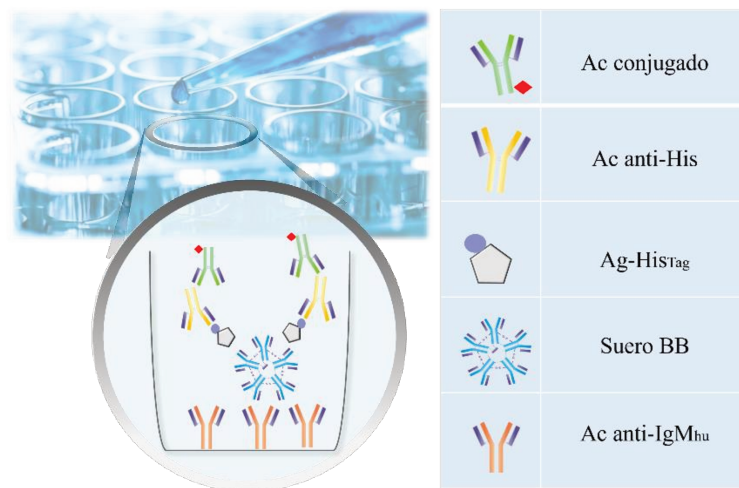


Figura 22: Diagrama de ensayo de ELISA desarrollado. Componentes utilizados.

2.3.3.1 Puesta a punto del ensayo:

Se realizó un ensayo de ELISA de captura de Ac IgM frente a sueros del GCP y del GCN utilizando como Ags la mezcla de proteínas recombinantes CP1+CP3 mencionadas en el capítulo 1. Como se observa en la Figura 23, se evaluaron diferentes condiciones de cada reactivo utilizado, las cuales se describen a continuación:

- Diluciones del suero: 1/50 y 1/100
- Diluciones del Ac anti-IgMhu hecho en conejo (Dako): 1/500 y 1/1000
- Diluciones del Ac anti-His Subclase IgG2a hecho en ratón (GE Healthcare): 1/500, 1/1000 y 1/5000
- Diluciones del Ac anti-IgG2 de ratón hecho en conejo conjugado a HRP (Sigma): 1/2500 y 1/5000
- Concentraciones de Ag-HisTag: 1 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL
- Bloqueo y sin bloqueo con Leche 5% en PBS 1X

La cantidad óptima de los reactivos utilizados en el ensayo ELISA se determinó mediante valoración de tablero de ajedrez.

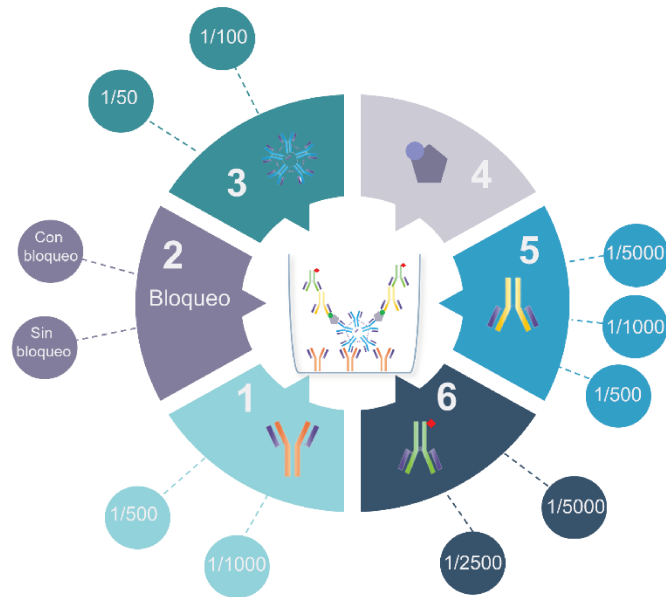


Figura 23: Puesta a punto del ensayo. Componentes y concentraciones utilizadas.

2.3.3.2 Optimización del ensayo:

A partir de los Ags mencionados y obtenidos en el capítulo 1, se realizaron diferentes formulaciones, siendo la Formulación 1 (F1) la mezcla conformada por CP1+CP3, Formulación 2 (F2): CP1+CP3+P2β+B13 y Formulación 3 (F3): la nueva proteína recombinante quimérica obtenida, CP4 y se evaluaron frente a los sueros del panel de control conformado por el GCP (n=6) y GCN (n=6).

Los pocillos de la placa ELISA (Geiner Bio-One) se revistieron con 100 μ L de Ac anti-IgM_{hu} (dil 1/500) 1 h a 37 ° C y luego 4 ° C durante la noche. Luego se incubó con 100 μ L de una dilución 1/100 de suero humano en PBS 1X (pH 7,4) - leche descremada al 1% durante (60 min 37°C). Después de eso, se prepararon las formulaciones que consistieron en 5 μ g/mL de cada Ag en *buffer* PBS 1X, complementado con Ac anti-His, (dil 1/1000) para reconocer las 6His de los Ags y el Ac conjugado a peroxidasa (dil 1/2500) para reconocer el complejo de los Ags unidos al Ac anti-His. La formulación se preparó antes del siguiente paso y se incubó a (45 min a 37 ° C). Luego se incubaron los pocillos con 100 μ L de cada formulación (60 min a 37 ° C). Entre cada paso, las placas se lavaron tres veces con 100 μ L de PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v). La reacción enzimática se desarrolló con 100 μ L por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo utilizando 100 μ L por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Finalmente se realizó la lectura de DO en un lector de ELISA a 450 nm (Molecular Devices Emax).

Se calculó la relación entre la DO media de los sueros del GCP+ y la DO media de los sueros del GCN (Δ DO+/ Δ DO-) para evaluar la discriminación entre sueros positivos y negativos.

2.3.3.3 Evaluación del ensayo:

Se realizó el ensayo de ELISA de captura de Ac IgM descrito en el inciso anterior (2.3.2.2) con las formulaciones F2 y F3 y se evaluaron frente al panel de sueros conformado por los sueros de bebés Ch+ (n=13) y Ch- (n=33).

Luego de leer los resultados en lector de ELISA se calculó el valor de *cut-off* como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros controles negativos (GCN) más 2 desviaciones estándar. Para salvar la heterogeneidad propia de la técnica de ELISA, los valores de DO fueron expresados como el índice de densidad óptica (IDON).

Los valores de IDON se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad donde se determinó una LC que permitió obtener valores óptimos de Se, Es, AUC e índice de J; y el parámetro de razón de verosimilitud, *likelihood ratio* (LR). Se consideraron casos de bebés positivos para Chagas vertical cuando se obtuvo un resultado \geq LC y bebés negativos cuando se observó un resultado $<$ LC.

2.3.3.4 Análisis de relación carga parasitaria vs ELISA de captura de Ac IgM

Con los sueros Ch+ (Ch+ $>$ 15; n=6 y Ch+ \leq 15; n=4) para los cuales se tenía información de los datos de qPCR, se realizó el análisis de correlación de Pearson con el respectivo resultado de cada uno de esos sueros para el ensayo de ELISA de captura de Ac IgM.

2.3.4 ELISA de captura de IgM utilizando CP4-B

Tal como se observa en la Figura 24, en este caso se diseñó un ensayo de ELISA de captura de Ac IgM partiendo de la utilización del conjugado CP4-B obtenido como se describió en el capítulo 1. El primer paso consistió en la inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} a las microplacas de ELISA. Luego de la incubación de las muestras de sueros de bebé se procedió a incubar con el Ag específico de *T. cruzi* conjugado a biotina (CP4-B). Como último paso, para poder revelar la reacción se utilizó SA conjugada a peroxidasa (SA-HRP).

La cantidad óptima de los reactivos utilizados en el ensayo ELISA de captura se determinó preliminarmente mediante valoración de tablero de ajedrez con sueros del GCP y del GCN.

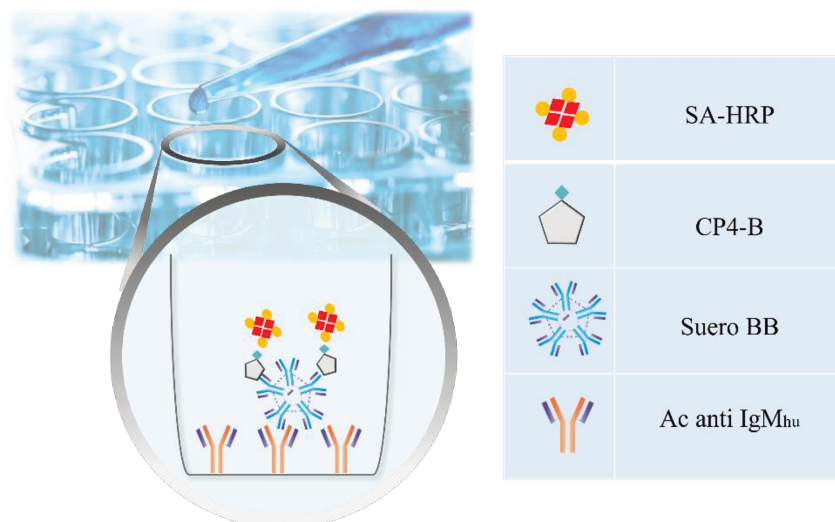


Figura 24: Diagrama de ensayo de ELISA de captura de IgM utilizando CP4-B. Componentes utilizados.

Las condiciones finales fueron las siguientes:

Los pocillos de la placa ELISA (Geiner Bio-One) se revistieron con 100 μ L de Ac anti-IgM_{hu} (dil 1/500) 1 h a 37 ° C y luego 4 ° C durante la noche. Luego se incubó con 100 μ L de una dilución 1/100 de suero humano en PBS 1X (pH 7,4) - leche descremada al 1% durante (60 min 37°C). Luego, se preparó la mezcla que consistió en 10 μ g/mL de CP4-B con SA-HRP diluído 1/150 en *buffer* PBS 1X. La formulación se preparó antes del siguiente paso y se incubó a (45 min a 37 ° C). Luego se incubaron los pocillos con 100 μ L de la mezcla (60 min a 37 ° C). Entre cada paso, las placas se lavaron tres veces con 100 μ L de PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v). La reacción enzimática se desarrolló con 100 μ L por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo utilizando 100 μ L por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Las placas se leyeron a 450 nm en lector de ELISA (Molecular Devices Emax).

El ensayo se evaluó frente al panel de sueros conformado por los sueros de bebés Ch+ (n=8) y Ch- (n=32), descritos en el inciso 2.3.1.2. Luego de leer los resultados en lector de ELISA se calculó el valor de *cut-off* como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros controles negativos (GCN) más 2 desviaciones estándar. Para salvar la heterogeneidad propia de la técnica de ELISA, los valores de DO fueron expresados como el índice de densidad óptica (IDON).

Los valores de IDON se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad donde se determinó una LC que permitió obtener valores óptimos de Se, Es, AUC e índice J. Se consideraron casos de bebés positivos para Chagas vertical cuando se obtuvo un resultado \geq LC y bebés negativos cuando se observó un resultado $<$ LC.

2.3.5 ELISA de captura de IgM utilizando Ac anti-Histidina-HRP (Invitrogen)

Para este ensayo, como se observa en la Figura 25, en este caso se diseñó un ensayo de ELISA de captura de Ac IgM con la utilización de un Ac anti-Histidina conjugado a peroxidasa (Ac anti-HIS_{HRP}, Invitrogen). El primer paso consistió en la inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} a las microplacas de ELISA. Luego, posterior a la incubación de las muestras de sueros de bebé se procedió a incubar con el Ag CP4-HIS_{Tag} específico de *T. cruzi*. Como último paso, para poder revelar la reacción se utilizó el Ac anti-HIS_{HRP}.

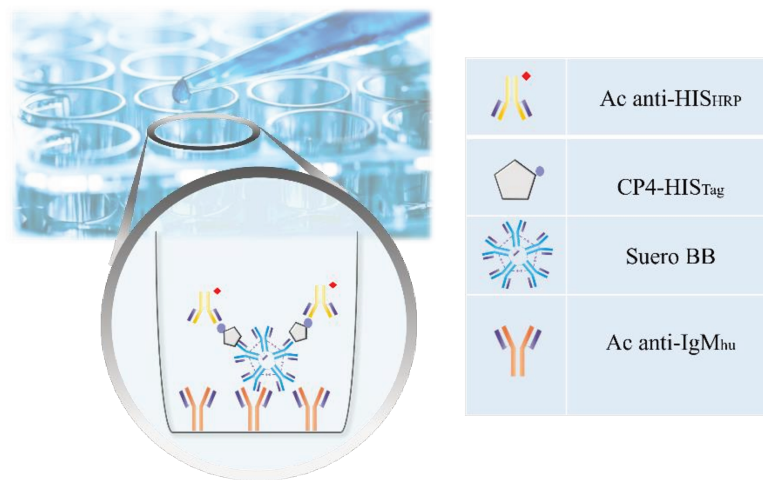


Figura 25: Diagrama de ensayo de ELISA de captura de Ac IgM utilizando Ac anti-HIS_{HRP}. Componentes utilizados.

La cantidad óptima de los reactivos utilizados en el ensayo ELISA se determinó preliminarmente mediante valoración de tablero de ajedrez con sueros del GCP y del GCN.

Las condiciones finales fueron las siguientes:

Los pocillos de la placa ELISA (Geiner Bio-One) se revistieron con 100 μ L de Ac anti-IgM humana, hecho en conejo (Dako) (dil 1/500) 1 h a 37 ° C y luego 4 ° C durante la noche. Luego se incubó con 100 μ L de una dilución 1/100 de suero humano en PBS 1X (pH 7,4) - leche descremada al 1% durante (60 min 37°C). Luego, se preparó la mezcla que consistió en 5 μ g/mL de CP4 con Ac anti-Histidina, hecho en cabra, conjugado a peroxidasa (Invitrogen) diluido 1/10000 en *buffer* PBS 1X. La formulación se preparó antes del siguiente paso y se incubó a (45 min a 37 °C). Luego se incubaron los pocillos con 100 μ L de la mezcla (60 min a 37 °C). Entre cada paso, las placas se lavaron tres veces con 100 μ L de PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v). La reacción enzimática se desarrolló con 100 μ L por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo utilizando 100 μ L por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Las placas se leyeron a 450 nm en lector de ELISA (Molecular Devices Emax).

El ensayo se evaluó frente al panel de sueros conformado por los sueros de bebés Ch+ (n=8) y Ch- (n=32), descriptos en el inciso 2.3.1.2.

Luego de leer los resultados en lector de ELISA se calculó el valor de *cut-off* como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros controles negativos (GCN) más 2 desviaciones estándar. Para salvar la heterogeneidad propia de la técnica de ELISA, los valores de DO fueron expresados como el índice de densidad óptica (IDON).

Los valores de IDON se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad donde se determinó una LC que permitió obtener valores óptimos de Se, Es, AUC e índice J. Se consideraron casos de bebés positivos para Chagas vertical cuando se obtuvo un resultado \geq LC y bebés negativos cuando se observó un resultado $<$ LC.

2.3.6 Acoplamiento de la lectura del ensayo de ELISA a smartphones (ELISA POCT)

Este trabajo se realizó en conjunto con el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, UNL-CONICET) con el Dr. Federico Schaumburg y el Dr. Claudio Berli (Co-Director de Tesis).

Para este objetivo se utilizó un teléfono con una aplicación personalizada que guía al usuario a través de los pasos del ensayo, la lectura robusta de resultados, los informes y conexión a la nube. La aplicación fue creada por el grupo de trabajo de INTEC usando una plataforma previamente desarrollada por el mismo grupo, llamada “appuente”, que permite la integración de dispositivos microfluídicos, dispositivos móviles y la nube (Schaumburg et al., 2022). En esta plataforma, los usuarios finales emplean la aplicación que los va guiando mientras se realiza el ensayo.

Se llevo a cabo el ensayo de ELISA de captura de Ac IgM descripto en el inciso 2.3.4, pero con la particularidad de que se utilizaron microplacas de ELISA de fondo plano (Nunc, Immuno MaxiSorp, F8) y con el fin de minimizar el equipo necesario, las incubaciones se realizaron en un dispositivo de calentamiento controlado por *Bluetooth*, miniaturizado y hecho a medida en vez de realizarse en estufa.

Se utilizaron como controles sueros del GCN (n = 3; descriptos en la sección 2.3.1.1). Se analizaron muestras de sueros de neonatos y niños cuyas madres tuvieron EC y que han sido diagnosticados como Ch+ (n = 5; descriptos en la sección 2.3.1.2 y n=5 descriptos en la sección 2.3.2) o Ch- (n = 32; descriptos en la sección 2.3.1.2 y n = 66 descriptos en la sección 2.3.2). Respecto a las muestras Ch+, se tuvo en cuenta que 6 muestras eran positivas con valores de DO altos por ELISA de captura de IgM y las otras 4 caían en la zona gris (pero con DO por encima del punto de corte). Mientras que los negativos 94 muestras tenían un valor de DO por debajo del límite de ELISA y 4 dentro de la zona gris (pero valores de DO por debajo del límite).

Se realizaron cuatro ensayos en tres días diferentes, utilizando 27 pocillos en cada caso. Las lecturas de los ensayos se realizaron en espectrofotómetro y mediante el teléfono celular. El procedimiento de lectura basado en teléfonos inteligentes se llevó a cabo utilizando un celular Redmi 8 (Xiaomi, Beijing, China).

2.4 Resultados

Para la puesta a punto de un ELISA de captura de IgM, se evaluaron diferentes reactivos y diseños del ensayo. Finalmente, se evaluó un panel sueros de bebés para la detección de Acs IgM frente al Ag CP4. El ensayo se logró acoplar con éxito la lectura del resultado del ensayo a telefonía celular, permitiendo de esta manera obtener un ensayo de ELISA POCT destinado a ser utilizado como diagnóstico en entornos de atención primaria de salud.

2.4.1 Desarrollo de ELISA de captura de IgM

2.4.1.1 Puesta a punto del ensayo

Se evaluaron diferentes concentraciones de reactivos frente a sueros del GCP (n=6, sueros clasificados como Ch+ por infección vectorial) y GCN (n=6, sueros de bebés clasificados como Ch-, hijos de mamás Ch-).

La puesta a punto se llevó a cabo utilizando como Ags la mezcla de CP1+CP3 y la cantidad óptima de los reactivos utilizados en el ensayo ELISA se determinó mediante valoración de tablero de ajedrez. En la Figura 26 se detallan las concentraciones elegidas en la puesta a punto del ensayo de ELISA de captura de Ac IgM.



Figura 26: Condiciones elegidas en la puesta a punto del ensayo de ELISA de captura de Ac IgM. Se detalla la concentración utilizada de cada reactivo; de izquierda a derecha: Ac anti-IgM_{his}, muestra de suero, Ag-HIS_{Tag}, Ac anti-His y Ac conjugado.

2.4.1.2 Optimización del ensayo

Para continuar con la optimización del ensayo de ELISA de captura de Ac IgM específicos para *T. cruzi*, se utilizaron diferentes formulaciones antigénicas: F1, F2 y F3 y se evaluaron frente a los sueros del panel de control conformado por el GCP (n=6) y GCN (n=6).

Como puede observarse en la Tabla 3, las tres formulaciones se analizaron a partir de la relación $\Delta DO+/\Delta DO-$ obtenido mediante el ensayo de ELISA de captura de IgM evaluando frente a sueros del GCP y del GCN. Se observó que, aunque F3 incluye el mismo Ag que la F1, la formulación quimérica mostró un incremento de unidades $\Delta DO+/\Delta DO-$ (5,74) en sueros positivos mejorando la discriminación entre muestras positivas y negativas. En cuanto a F2 (4,71), se puede observar que la relación $\Delta DO+/\Delta DO-$ obtenida con la F1 (4,81) no mejoró mediante la adición de los Ags P2 β y B13 (presente en F2). Sin embargo, esos resultados no permitían descartar que los determinantes antigénicos complementarios P2 β y B13 puedan mejorar la Se del ensayo con un panel ampliado de sueros. Entonces se decidió evaluar todo el panel de sueros contra F3 pero también contra F2.

Tabla 3: Optimización del ELISA de captura de IgM para diferentes formulaciones antigénicas. Se detalla la composición de las formulaciones, las relaciones de $\Delta DO+/\Delta DO-$ y los valores de media obtenidos para los sueros evaluados del GCP y GCN.

Formulación	Composición	$\Delta DO+/\Delta DO-$	Media GCP	Media GCN
F1	CP1+CP3	4,81	0,779±0,363	0,162±0,009
F2	CP1+CP3+P2 β +B13	4,71	1,52±0,607	0,323±0,060
F3	CP4	5,74	2,12±0,690	0,369±0,028

2.4.1.3 Evaluación del panel de sueros con la F2 y la F3

Una vez determinadas las condiciones óptimas para llevar a cabo el ensayo de ELISA de captura de Ac IgM específicos para *T. cruzi*, se evaluó el panel de sueros conformado por sueros de bebés Ch+ (n=13) y Ch- (n=33) frente a las dos formulaciones antigénicas mencionadas anteriormente: F2 y F3.

Tabla 4: Comparación de la F2 y la F3 mediante el ensayo de ELISA de captura de Ac IgM. Se expresan los valores de mediana de IDON (IQR) para cada grupo evaluado (Ch+ y Ch-) acorde al periodo de obtención de la muestra (≤ 15 y > 15 días).

		Mediana IDON Ch+	Mediana IDON Ch-
F2	≤ 15	1,67 (1,09-3,25)	0,700 (0,638-0,843)
	> 15	1,25 (0,89-3,46)	0,756 (0,645-0,837)
F3	≤ 15	1,88 (1,30-3,22)	0,807 (0,721-0,841)
	> 15	2,46 (1,10-4,09)	0,815 (0,719-0,885)

Como se observa en la Tabla 4, comparando la F2 y la F3, el valor de mediana de IDON obtenido para Ac anti-IgM entre pacientes Ch- fue ligeramente inferior para F2 en ambos grupos (> 15

y ≤ 15 días), mientras que para F3 se observaron valores más altos en pacientes Ch+, acompañando a los resultados de $\Delta DO+/\Delta DO-$ referidos anteriormente.

En la Figura 27 A, podemos observar el grafico de distribución de los valores de IDON obtenidos para cada suero evaluado frente a la F2. Se observa que se obtuvieron tres sueros FN para los pacientes Ch+ >15 y uno para los pacientes Ch+ ≤ 15 . Con respecto al grupo Ch- >15 como al grupo Ch- ≤ 15 se obtuvo un FP incluyendo a este valor dentro de la zona gris.

En cuanto a la evaluación de reactividad cruzada, podemos observar que no se obtuvo reactividad con sueros de niños con diagnóstico de S+, sin embargo, si se observó reactividad en la zona gris con un suero para T+.

La Se y la Es se calcularon para el total de sueros Ch+ y Ch- a partir del análisis de la curva ROC con la LC=1 (Figura 27 B) con un índice J de 0,73. F2 presento 69,2% (IC 95% 38,6-90,9%) de Se y 93,9% (IC 95% 79,8 - 99,3%) de Es, con un valor de AUC de 0,914 (0,805-1,02; $p \leq 0,001$).

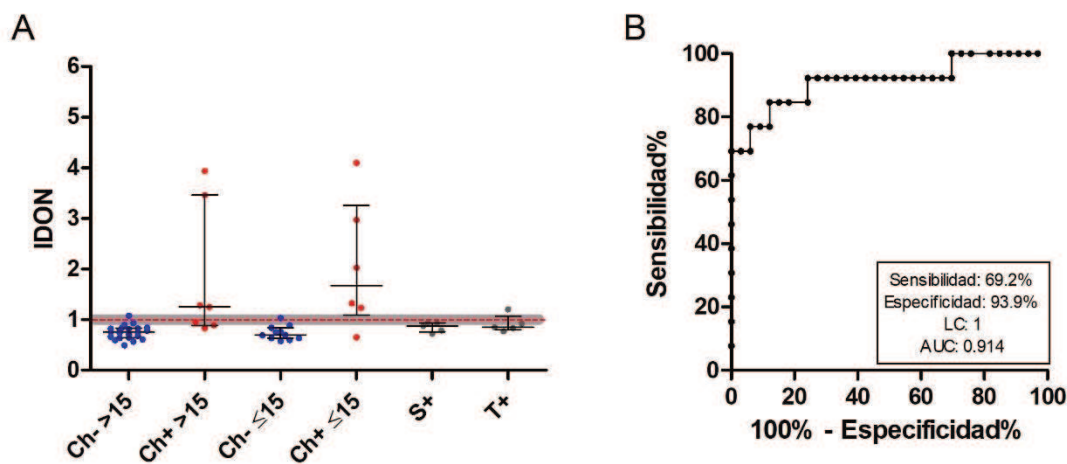


Figura 27: Determinación específica de Acs IgM contra *T. cruzi* en recién nacidos y niños pequeños para la F2. A) IDO obtenido con sueros de los grupos Ch+ >15 , Ch+ ≤ 15 , Ch >15 , Ch- ≤ 15 y sueros T+ y S+ para analizar la reactividad cruzada. La línea de tendencia central muestra los valores de la mediana relativa (IQR) para cada grupo de sueros en cada ensayo, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo (LC = 1). La zona gris se presenta como una línea continua en este color. B) Curva ROC obtenida para los IDON de los Acs detectados para los sueros de los grupos Ch+ y Ch-.

En cuanto a la evaluación de la formulación F3, podemos observar el grafico de distribución de los valores de IDON obtenidos para cada suero que solo se obtuvo un FN para el grupo Ch+ >15 incluyéndose dentro de la zona gris (Figura 28 A). Con respecto al grupo Ch- >15 , se clasificaron dos pacientes como FP mientras que para los pacientes Ch- ≤ 15 no. No se obtuvo reactividad cruzada frente a la evaluación de sueros de niños con diagnóstico S+ y T+.

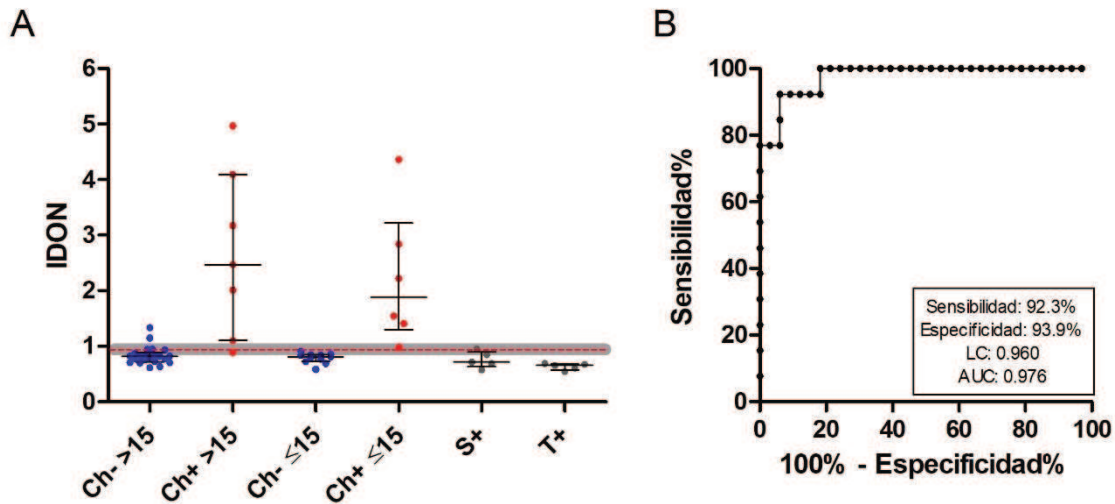


Figura 28: Determinación específica de Acs IgM contra *T. cruzi* en recién nacidos y niños pequeños para la F3. A) IDON obtenido con sueros de los grupos Ch+ >15, Ch+ ≤15, Ch >15, Ch- ≤15 y sueros T+ y S+ para analizar la reactividad cruzada. La línea de tendencia central muestra los valores de la mediana relativa (IQR) para cada grupo de sueros en cada ensayo, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo (LC = 0,976). La zona gris se presenta como una línea continua gris. B) Curva ROC obtenida para los IDON de Acs detectados para los sueros de los grupos Ch+ y Ch-, $p < 0,0001$.

La F3 a partir del análisis de la curva ROC para una LC=0,960 y un índice de J de 0,86 mostró un desempeño diagnóstico con una Es del 93,9% (IC 95% 79,8 - 99,3%) y una Se de 92,3% (IC 95% 63,9 - 99,8%) con un AUC de 0,976 (0,940-1,01; $p \leq 0,001$) (Figura 28 B).

2.4.1.3.1 Comparación de las performances diagnósticas de las formulaciones F2 y F3

Como puede observarse en la Tabla 5, ambas formulaciones para detectar Ac anti-IgM mostraron la misma Es. Sin embargo, la F3 presentó significativamente mayor Se que F2 con un valor de AUC también mayor. En cuanto a otros parámetros de rendimiento diagnóstico de los Acs, empleando F2, se observaron tres resultados FN entre los Ch >15 días (uno incluido dentro de la zona gris) y uno en el grupo de Ch ≤15 días. Por otro lado, solo se detectó un FN con la F3 para el grupo de Ch >15 días, incluido dentro de la zona gris. Tanto F2 como F3 clasificaron a dos pacientes como FP, pero en el caso de F3, no se observaron pacientes FP en los Ch ≤15 días grupo.

Cabe destacar que los valores positivos de LR fueron significativamente más altos para F3 en comparación con F2, acompañado de un LR negativo significativamente más bajo. Para F3, no se obtuvo reactividad con sueros de niños con un diagnóstico positivo de Sífilis o Toxoplasmosis; sin embargo, para F2 se observó reactividad con un suero T+.

Tabla 5: Comparación del desempeño diagnóstico de las formulaciones F2 y la F3 para el ensayo de ELISA de captura de IgM. Se detallan los parámetros diagnósticos de Se, Es, AUC, FP, FN para cada condición. Ns, no significativo. La línea de corte de obtenida mediante curva ROC para cada condición fue F2=1,00 y F3=0,960

	F2	F3	P
Se	69,2% (95% CI 38,6 - 90,9%)	92,3% (95% CI 63,9 - 99,8%)	0,005
Es	93,9 (95% CI 79,8 - 99,3%)	93,9 (95% CI 79,8 - 99,3%)	Ns
AUC	0,914 (95% CI 0,806 -1,00)	0,976 (95% CI 0,940 -1,01)	Ns
LR (+)	11,4	15,2	
LR (-)	0,330	0,082	
FP	1 (Ch ≤15 días)	-	Ns
	1 (Ch >15 días)	2 (Ch >15 días)	
FN	1 (Ch ≤15 días)	-	Ns
	3 (Ch >15 días)	1 (Ch >15 días)	

2.4.1.4 Carga parasitaria vs Ac IgM

Se logró obtener los datos de las qPCR realizadas solo de diez del total de muestras de sueros de niños utilizadas para la detección de Ac IgM. Estas muestras, resultaron positivas para la detección de Ac IgM, salvo un suero Ch+ ≤15 días que se encuentra en ZG.

La Figura 29 A permite visualizar la relación de la carga parasitaria en función de los Acs IgM para los sueros evaluados. En el mismo se observa en el eje x los datos obtenidos de carga parasitaria y en el eje y los valores obtenidos de Ac IgM detectados por ELISA de captura con la F3, que utiliza a CP4 como Ag, con su respectivo *cut-off*. En este trabajo se estableció una línea de corte de 50 eq par/mL para diferenciar cargas altas o bajas de parásitos. Dicho valor corresponde a la cantidad de parásitos por encima del cual pueden ser detectados por la técnica de MH y por debajo del cual siguen detectándose mediante qPCR (Bustos et al., 2019).

A su vez, las muestras se encuentran clasificadas como <15 y >15 días de vida del momento de la toma de muestra. Se observa que los sueros de Ch+ ≤15 días tiene menos carga parasitaria, respecto de los sueros Ch+ >15. De acuerdo con el análisis de regresión lineal (Figura 29 B) que muestra una asociación positiva entre los Ac IgM y los niveles de parasitemia medidos por qPCR para los sueros evaluados, si bien no es significativa, podemos sugerir que habría una tendencia de a mayor carga parasitaria, mayor nivel de Acs.

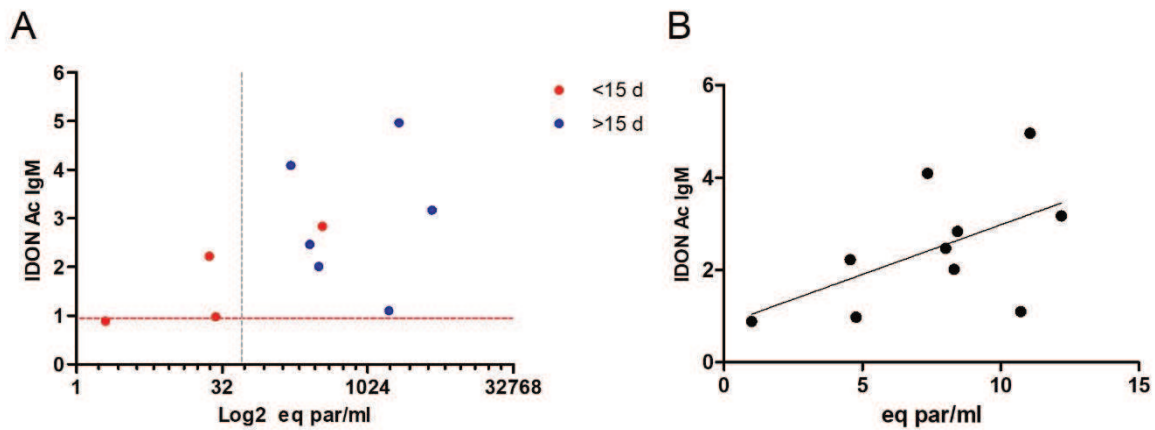


Figura 29: PCR vs ELISA de captura de Ac IgM. A) Relación del Log2 de *eq par/mL* de *T. cruzi* (eje X) vs IDON de los Acs IgM (eje Y) obtenidos con la F3 para los sueros de los grupos $Ch^+ >15$ ($n=6$) y $Ch^+ \leq 15$ ($n=4$). La línea discontinua roja indica el valor de corte relativo ($IDON=DO / cut-off = 0,976$) para en ensayo de ELISA. La línea discontinua gris indica el límite establecido como bajo valor de *eq* para qPCR y equivale a un valor por debajo del cual la qPCR permite detecciones, pero para el cual el MH es habitualmente negativo. B) Análisis de correlación entre los Ac IgM obtenidos y los *eq par/mL* para el grupo de sueros evaluados, correlación de Pearson $r=0,545$; $p=0,10$.

De acuerdo con este límite establecido (50 *eq par/ml*), se puede observar en la Tabla 6, que tres muestras diagnosticadas como positivas por qPCR, están por debajo del límite de detección del MH. De estas muestras, dos resultaron negativas para el MH (≤ 2 y 27,5 *eq par/ml* por qPCR, ID 61 e ID 101 respectivamente), mientras que solo una muestra pudo ser detectada por el MH (23,6 *eq de par/ml* por qPCR, ID 32). Cabe destacar que estas tres muestras resultaron positivas para el diagnóstico mediante ELISA da captura de IgM que utiliza el Ag CP4, siendo la muestra con ID 61 la que cae en Zona Gris.

Según la Tabla 6, analizando cada muestra en particular podemos observar que la muestra 32 con 5 días de vida, pese a su bajo *eq par/ml*, presenta un IDON correspondiente a valores positivos que es alto para la formulación F3. La muestra 118 de 1 mes de vida, se destaca por tener elevado nivel de Ac IgM con un *eq par/mL* no tan alto respecto de las otras muestras. Por otro lado, la muestra 141 con 1 mes y medio de vida, es llamativa ya que el nivel de Ac IgM anti-CP4 (F3) da alto (2,01) en comparación con el IDON negativo de F2 (0,837).

Tabla 6: Clasificación de los sueros positivos obtenidos de acuerdo con el algoritmo actualmente utilizado. Se detallan los resultados de las técnicas de MH, qPCR (eq par/mL), ELISA de IgG luego de los 10 meses, días del sujeto al momento de la toma de muestra y niveles de Acs de tipo IgM (IDON) obtenidos para las muestras analizadas (n=13) tanto para la F2 como para la F3.

ID del sujeto	Días de Vida	MH	qPCR (eq par/mL)	ELISA IgG luego de los 10 meses	IDON IgM F2	IDON IgM F3
5	18	+	No hay dato		2,97	4,36
15	6	+	No hay dato		2,03	1,54
32	5	+	23,6		1,32	2,22
37	9	+	347,8		4,10	2,83
42	212	+	4718,3		1,25	3,17
53	226	NR	2145,3	+	3,94	4,97
61	15	-	≤2	+	0,892	0,889
66	4	+	No hay dato		1,24	1,41
84	53	+	257,8		1,29	2,47
101	11	-	27,5	+	0,654	0,977
118	29	+	164,7		3,46	4,09
140	84	+	1698		0,956	1,10
141	44	+	320		0,837	2,01

Si bien el ELISA de captura de Ac IgM con la F3 presentó un muy buen rendimiento diagnóstico, cabe destacar que uno de los reactivos que lo componen, el Ac anti-His (GE, Healthcare) dejó de fabricarse, motivo por el cual fue necesario proponer otros diseños en el cual no necesitaríamos de este reactivo para llevar a cabo el ensayo.

2.4.2 ELISA de captura de IgM con CP4-B

Se realizó el ensayo de ELISA de captura para el diagnóstico de la infección vertical en bebés, mediante la detección de Ac IgM específicos para *T. cruzi* pero en esta instancia utilizando el conjugado de CP4-B obtenido en el capítulo 1. En este diseño, el cambio respecto al diseño anterior (inciso 2.4.1) es que se cambia el uso del Ag-HIS_{Tag} por el Ag conjugado a Biotina (CP4-B), lo que conlleva al cambio de los reactivos consecuentes. En vez del Ac anti-His y el posterior Ac conjugado a HRP ahora se utiliza un conjugado de SA-HRP.

Para llevar a cabo este ensayo, luego de la inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} a las microplacas de ELISA y posterior incubación de las muestras de sueros de bebé se procedió a incubar con el conjugado de CP4-B. Como último paso, para poder revelar la reacción se utilizó SA-HRP. El ensayo se evaluó frente al panel de sueros conformado por sueros de bebés Ch+ (n=8) y Ch- (n=32).

Como se observa en la Figura 30 A, no se obtuvieron resultados FN. Sin embargo, si se obtuvieron 10 FP, de los cuales 3 cayeron dentro de la ZG. Por otro lado, con respecto a la evaluación de reactividad cruzada, se obtuvo reactividad con dos sueros de niños con diagnóstico T+ que cayeron dentro de la zona gris y con un suero S+.

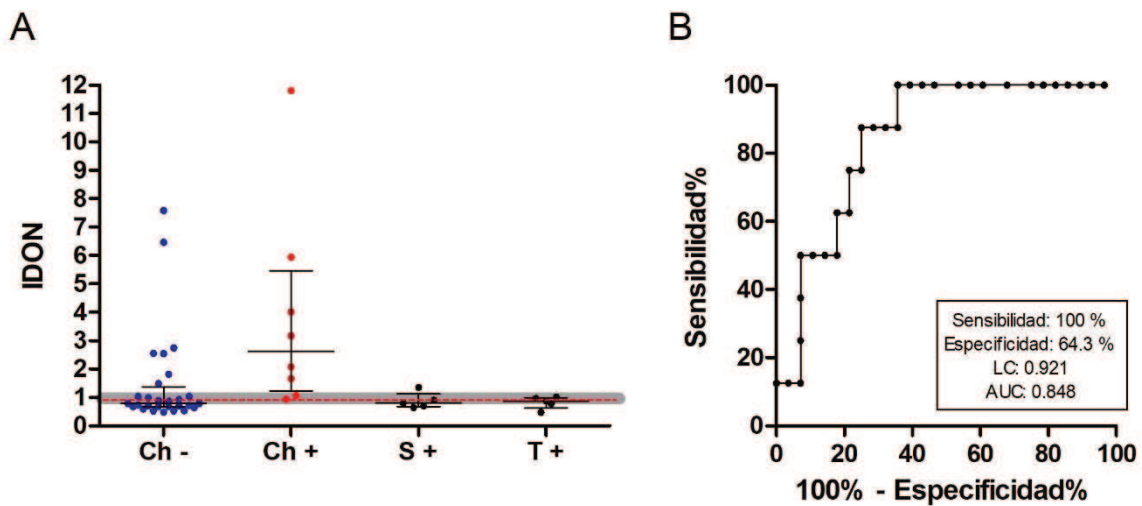


Figura 30: Determinación específica de Acs IgM contra *T. cruzi* en recién nacidos y niños pequeños utilizando el conjugado de CP4-B. A) IDO obtenido con sueros de los grupos Ch+ (n=8), Ch- (n=32) y sueros T+ y S+ para analizar la reactividad cruzada. La línea de tendencia central muestra los valores de la mediana relativa (IQR) para cada grupo de sueros en cada ensayo, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo (LC = 1). La zona gris se presenta como una línea continua gris. B) Curva ROC obtenida para el IDON de los Acs detectados para los sueros de los grupos Ch+ y Ch-.

La línea de corte (LC=0,921) se estableció mediante análisis de curva ROC con valores óptimos de Se y Es para las muestras evaluadas (Figura 30 B) obteniendo un índice J de 0,643 y un AUC de 0,848 (0,689-0,945; $p < 0,001$). La prueba diagnóstica presentó 100% (IC 95% 63,1-100%) de S y 64,3% (IC 95% 44,1 – 81,4%) de E para el total de sueros Ch+ y Ch- evaluados.

2.4.3 ELISA de captura de IgM con anti-HIS_{HRP} (Invitrogen)

Se realizó el ensayo de ELISA de captura para la detección de Ac IgM específicos para *T. cruzi* utilizando un Ac anti-HIS_{HRP}. En este diseño, el cambio respecto al diseño anterior (inciso 2.4.1) es que se cambia el uso del Ac anti-HIS y el posterior Ac conjugado por la utilización directa de un Ac conjugado, el Ac anti-HIS_{HRP}.

Para llevar a cabo el ensayo, luego de la inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} a las microplacas de ELISA y posterior a la incubación de las muestras de sueros de bebé, se procedió a incubar con el Ag

CP4-His específico de *T. cruzi*. Por último, para poder revelar la reacción se utilizó el Ac anti-HIS_{HRP}. El ensayo se evaluó frente al panel de sueros conformado por sueros de bebés Ch+ (n=8) y Ch- (n=32).

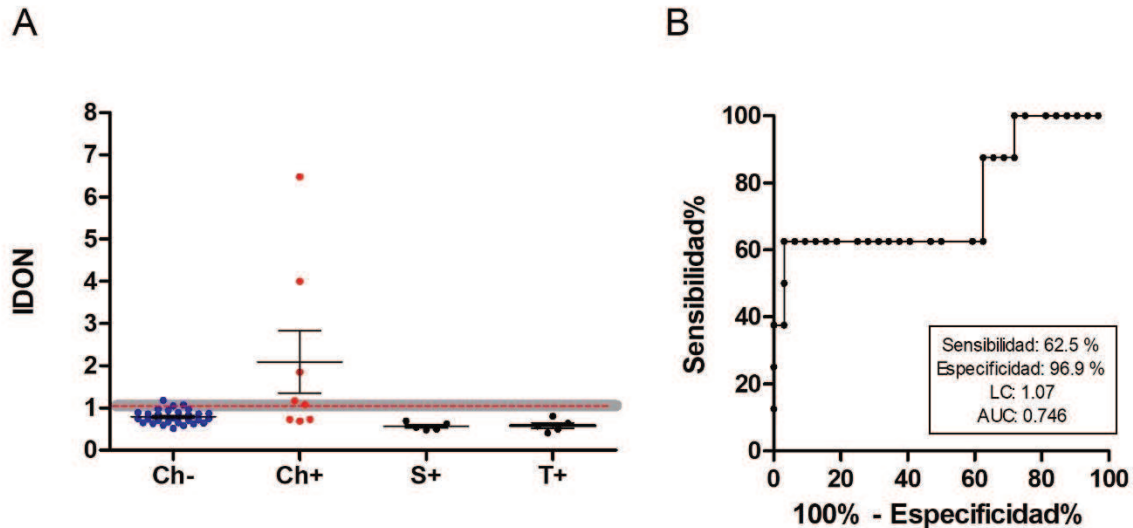


Figura 31: Determinación específica de Acs IgM contra *T. cruzi* en recién nacidos y niños pequeños utilizando el Ac conjugado anti-HIS_{HRP}. A) IDON obtenido con sueros de los grupos Ch+ (n=8), Ch- (n=32) y sueros T+ y S+ para analizar la reactividad cruzada. La línea de tendencia central muestra los valores de la mediana relativa (IQR) para cada grupo de sueros en cada ensayo, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo (LC:1,07). La zona gris se presenta como una línea continua gris. B) Curva ROC obtenida para el IDON de los Acs detectados para los sueros de los grupos Ch+ y Ch.

Como se observa en la Figura 31 A, se obtuvieron tres resultados FN y un FP. No se obtuvo reactividad con sueros de niños con diagnóstico T+ y S+.

La S y la E se calcularon a partir de la línea de corte (LC=1,071) establecida mediante análisis de la curva ROC (Figura 31 B) con un índice de J de 0,594 para el total de sueros Ch+ y Ch- evaluados. La prueba diagnóstica presentó 62,5% (IC 95% 24,5-91,5%) de S y 96,9% (IC 95% 83,8 – 99,9%) de E, con un valor de AUC de 0,746 (0,584-0,870; p=0,04).

2.4.4 Comparación de los ensayos de ELISA de captura de Ac IgM evaluados:

A modo de resumen, en la Tabla 7 se detallan los valores de Se, Es, AUC e índice J obtenidos para los tres diseños de ensayo de ELISA de captura evaluados. Dentro de los tres ELISA de captura evaluados, el ELISA IgM CP4-B presentó el 100% de Se y la mayor Es se obtuvo con el ELISA IgM anti-HIS_{HRP}. Sin embargo, al evaluar el rendimiento diagnóstico de ambos parámetros, el ELISA IgM

F3 fue el que mejor desempeño demostró con una Se del 92,3% y una Es del 93,9 %, mostrando un muy buen rendimiento diagnóstico con un AUC de 0,976 y un índice J de 0,860.

Tabla 7: Comparación de las performances diagnósticas de los ensayos de ELISA de captura de Ac IgM evaluados. 95% IC: intervalo de confianza de 95%.

	Se % (95% IC)	Es % (95% IC)	AUC	J
ELISA IgM F3	92,3 (63,9 - 99,8)	93,9 (79,8 - 99,3)	0,976	0,860
ELISA IgM CP4-B	100 (63,1-100)	64,3 (44,1 – 81,4)	0,848	0,643
ELISA IgM anti-HIS_{HRP}	62,5 (24,5-91,5)	96,9 (83,8 – 99,9)	0,746	0,594

2.4.5 ELISA POCT

El ensayo de ELISA de captura de Ac IgM (con el Ac anti-HIS_{HRP}) se llevó a cabo realizando las incubaciones en un dispositivo miniaturizado, logrando uniformidad y estabilidad de $\sim\pm 1$ °C. El lector de placas de ELISA fue reemplazado por la cámara del teléfono inteligente y algoritmos de procesamiento de imágenes.

A partir de la plataforma “appuente”, previamente desarrollada para ensayos POCT (Schaumburg et al., 2022), el grupo de trabajo de microfluídica de INTEC creó una aplicación personalizada que permitió guiar al usuario a través de los pasos del ensayo, la lectura robusta de resultados, los informes y conexión a la nube.

En la Figura 32 se presentan algunas capturas de pantalla de la aplicación destinadas a guiar a los usuarios a lo largo de la prueba y proporcionar mecanismos de control. La orientación consiste en instrucciones secuenciales de texto y gráficos.

Se analizó un panel de muestras que incluyó sueros de neonatos y niños cuyas madres tuvieron EC y que han sido diagnosticados como Ch+ (n = 10) o Ch- (n = 98) para la ECv.

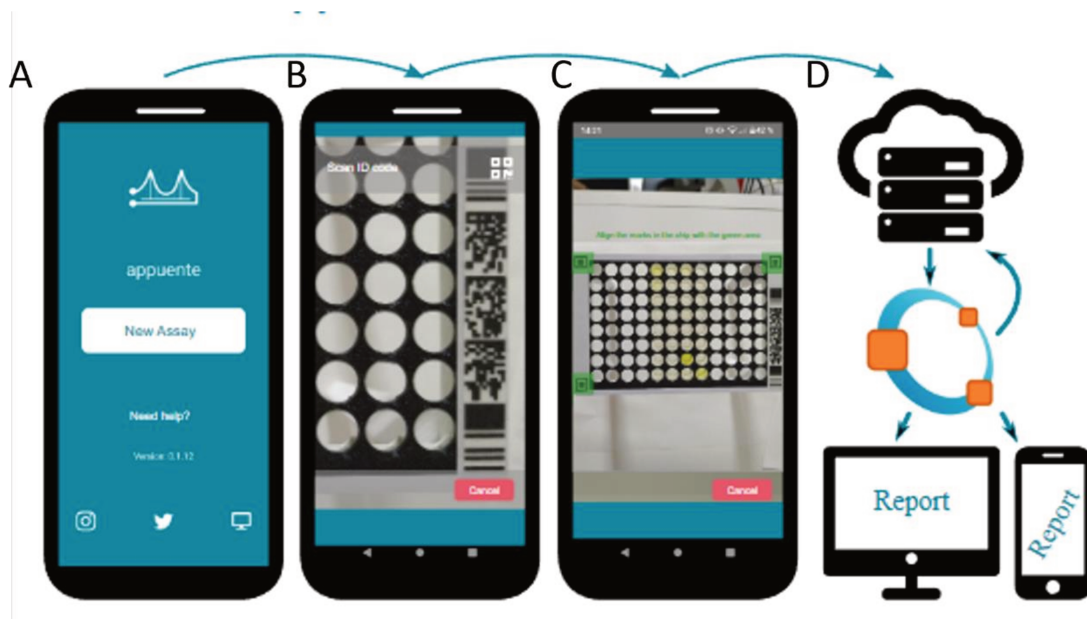


Figura 32: Capturas de pantalla de aplicaciones seleccionadas. A) Pantalla de inicio. B) Lectura del código QR de la aplicación. C) Lectura de resultados usando la cámara del teléfono inteligente. D) Esquema representativo del procesamiento de datos y conexión a la nube.

En la Figura 33, se puede observar el resultado de uno de los cuatros ensayos realizados, donde se comparan las lecturas obtenidas con el espectrofotómetro y el teléfono inteligente, junto con las líneas de corte y las zonas grises obtenidas para cada método. Entre las 108 muestras evaluadas, en los cuatros ensayos realizados en diferentes días, el 95,4% se clasificaron correctamente en positivas o negativas. Se realizó una discriminación exitosa entre los sueros clasificados como positivos y los clasificados como negativos. Las cinco muestras clasificadas incorrectamente como FN se ubicaron cerca de las líneas de corte, es decir, en la zona indeterminada o gris, donde el error inherente de los métodos cobra relevancia.

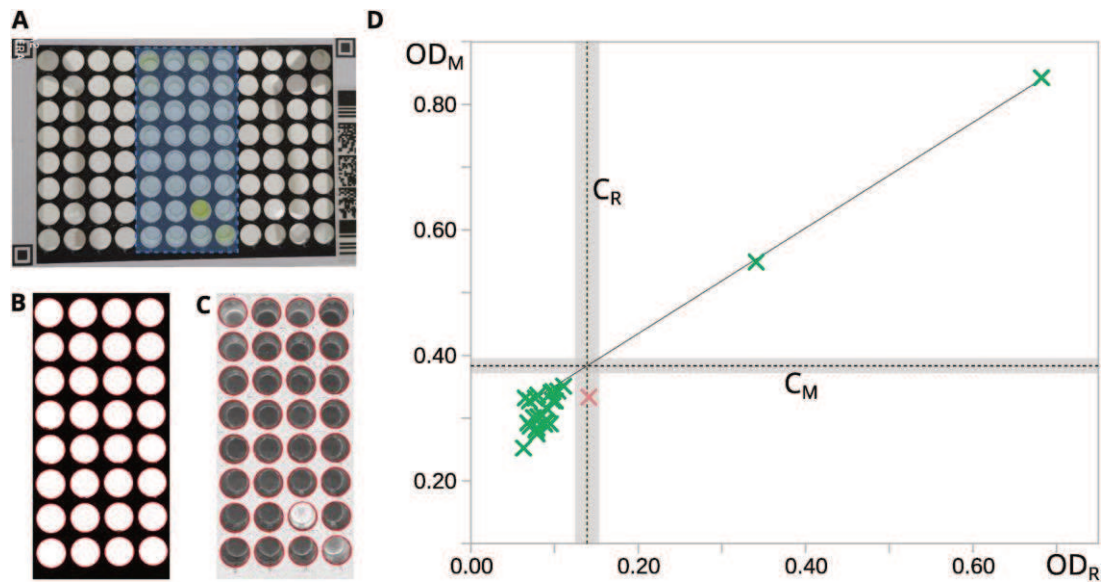


Figura 33: POCT ELISA para la enfermedad de Chagas congénita. A) Imagen original y área procesada (remarcada en celeste). B) Imagen segmentada para detección de pozos. C) Pozos detectados y canal azul invertido para obtener la densidad óptica (ODM). D) Comparación de ODM y la densidad óptica obtenida con el lector de placas (ODR) para un ensayo particular. También se muestran líneas de corte (C_M y C_R), zonas grises (indeterminadas), curva de calibración (línea negra continua) y clasificación (verde: muestras clasificadas correctamente, rojo: muestras clasificadas incorrectamente).

Las lecturas realizadas con el teléfono inteligente, es decir, las imágenes tomadas, las regiones analizadas y los resultados devueltos por la aplicación, se guardaron automáticamente en una base de datos en el sitio web appuente.com. Estos datos se pueden inspeccionar y descargar para su posterior estudio.

2.5 Discusión

El tratamiento antiparasitario de la infección por *T. cruzi* es muy efectivo durante la etapa aguda, particularmente en neonatos y niños, para quienes los fármacos disponibles (Bz y Nf) generan tasas muy bajas de efectos adversos (Altcheh et al., 2011). Por el contrario, una vez establecida la infección crónica, la eficacia del tratamiento disminuye a lo largo de los años y presenta frecuentes efectos adversos que limitan su uso (Morillo et al., 2015). En este contexto, el diagnóstico precoz es relevante porque promueve una mayor tasa de efectividad del tratamiento. La optimización del diagnóstico también tiene como objetivo evitar la pérdida de pacientes durante el seguimiento posterior, favoreciendo el beneficio potencial de los medicamentos en etapas tempranas y, en consecuencia, contribuyendo a eliminar la transmisión materno infantil. En el contexto latinoamericano, el principal desafío para lograr este objetivo es contar con métodos diagnósticos efectivos que puedan realizarse en centros de salud con equipos de baja complejidad para complementar la técnica del MH.

Para abarcar esta problemática, en el presente trabajo, se desarrolló un ensayo de ELISA basado en la captura de Ac IgM específico de anti-*T. cruzi* y se comparó con los procedimientos estándar para el diagnóstico de la ECv. Para seleccionar el Ag más apropiado, que permita el mejor desempeño del ensayo, se realizó una evaluación preliminar de diferentes formulaciones antigénicas, siendo estas F1, F2 y F3. Las mismas se evaluaron en el ELISA de IgM para el diagnóstico de la ECv. La F3, se conformó con el Ag CP4 con la hipótesis de que un Ag único podía mejorar el desempeño en un sistema de captura, destacando a su vez que este Ag, ha mostrado buena performance diagnóstica en la detección de Ac IgG específicos por ELISA indirecto.

En primera instancia se evaluaron las formulaciones frente a un panel de sueros reducidos. Se observó que, si bien la condición F1 y F3, comparten los mismos determinantes antigénicos, el rendimiento diagnóstico mejoró para la F3 cuando se usó la quimera única (CP4), incluyendo todos los Ags, permitiendo valores de IDON promedio más altos para sueros Ch+. Una ventaja adicional de usar una sola quimera es que facilita la estandarización de la técnica al reducir los costos y pasos de producción. Este resultado podría atribuirse a un efecto conformacional del Ag reconocido por los Acs IgM específicos. Nuestro grupo ha descrito previamente este efecto en un ELISA indirecto para determinar Ac IgG anti-*T. cruzi* en el que los epítomos unidos en una sola molécula mejoraron la señal en relación con el uso de los mismos epítomos en diferentes moléculas (Camussone et al., 2009). Usando los seis sueros de control positivos y seis negativos, F3 mostró mejores resultados en comparación con la formulación F2 que comprende los Ag de F1 Ag con la adición de B13 y P2 β . No obstante, para descartar que los Ags B13 y P2 β pudieran mejorar potencialmente la Se del ensayo, el estudio de estas dos formulaciones se amplió a un panel de 13 muestras de bebés infectados y 33 de bebés no infectados,

todos nacidos de mujeres con la EC crónica. Ambas formulaciones permitieron la misma Es, aunque el uso de F3 mostró una Se significativamente mayor y resultó en valores de IDON promedio más altos para sueros positivos. Desde el punto de vista clínico, es importante considerar los valores de LR en el rendimiento diagnóstico de cada formulación. Se observó un LR positivo más alto para F3 en comparación con F2, lo que implica mayor cambio en la probabilidad posterior a la prueba de infección congénita en niños con resultados positivos. Además, valores significativamente más bajos de LR negativa, refuerza el excelente desempeño de esta formulación sobre Ac IgM anti-*T. cruzi* con respecto a su posible contribución para descartar la infección con un grado considerable de certeza si estos resultados se confirman en muestras más grandes.

Estos resultados indicarían que la adición de los determinantes antigénicos B13 y P2 β no traería beneficios. Una ventaja adicional de usar una sola quimera es que facilita la estandarización de la técnica al reducir los pasos y costos de producción. El objetivo principal de este desarrollo fue determinar la Se en los primeros días de vida. Dada la dificultad de obtener sueros de recién nacidos, se incluyeron sueros obtenidos en la primera consulta pediátrica, cuando se realizó a los 15 días del nacimiento y después de los 15 días del nacimiento durante el primer año de vida. En el primer grupo, para F3 no se obtuvieron FN y FP para este Ag. Mientras que para F2 se obtuvieron tanto FN como FP.

Con respecto al análisis de correlación del ELISA y la carga parasitaria de los casos estudiados, habría una tendencia de correlación entre el valor de la carga parasitaria y el nivel de Ac de tipo IgM anti-CP4 detectados en las muestras de suero utilizadas. Esta relación ha sido previamente reportada por Volta y col., para el análisis de la carga parasitaria en relación con el nivel de Ac IgG anti-SAPA (Volta et al., 2015). Sin embargo, en el caso de una de las muestras obtenida a los 5 días de vida, para la cual se había detectado una baja carga parasitaria, la misma presentó un alto nivel de anticuerpos IgM anti-CP4. Desde el punto de vista del diagnóstico, este comportamiento podría indicar una mayor sensibilidad de la detección de IgM específica con relación a la de carga parasitaria por qPCR. Este resultado es interesante y de corroborarse en más muestras, podría hablar de una fortaleza del método en diagnóstico precoz para lo cual sería importante aumentar el número de muestras para poder realizar un análisis estadístico.

Como antecedente del uso de la determinación de IgM específica para la determinación de Chagas agudo, previamente a nuestro estudio se han reportado dos trabajos que proponían el uso de un ELISA indirecto (sin captura). Uno de ellos se llevó a cabo con Ag de epimastigotes y ha permitido obtener 95% de concordancia con la PCR y del 71% con la técnica de IFI (Antas et al., 2000). En dicho trabajo, no se analizó un panel de recién nacidos ya que la población ensayada fueron pacientes con infección aguda entre 2 y 15 años, por lo que la utilidad del mismo para el diagnóstico en recién nacidos no fue reportada. En el otro estudio publicado, se utilizó como Ag a la proteína recombinante SAPA, y el ensayo se evaluó frente a muestras de neonatos de menos de un mes de edad, mostrando una

performance similar al diagnóstico por qPCR, con 94,3% de Se y 92,6% de Es (Castro-Sesquen et al., 2021). Por otro lado, también se describió un método inmunoquímico pero basado en la técnica de Western Blot, usando antígenos de excreción (TESA BLOT IgM) para determinar IgM específicas contra *T. cruzi*. El método consistió en separar las proteínas de excreción TESA del parásito y luego enfrentarlas al suero problema. En dicho trabajo, se informó una Se del 80% y una Es del 94% al comparar el resultado con qPCR (Noazin et al., 2019). Estos resultados, como los mencionados mediante el uso de ELISA indirecto, han sido muy prometedores, pero a diferencia del descrito en esta Tesis no han realizado captura de Ac IgM, lo que favorece la sensibilidad y especificidad de las determinaciones de IgM específica. Además, en dichos estudios no se reportó ni la Se ni la Es en relación con el MH o la serología mediante el seguimiento (que son los métodos de referencia), sino que se consideró solo a la PCR como prueba de referencia. Cabe destacar que ha sido demostrado que la Se de la PCR aumenta recién en el segundo o tercer mes desde el nacimiento (Diez et al., 2008; Simón et al., 2019; Volta et al., 2018), motivo por el cual algunos de los casos positivos de los trabajos mencionados anteriormente, pueden haber sido mal clasificados y la Se puede ser menor en estos trabajos. Aun así, nuestros resultados son similares a los obtenidos con los métodos TESA BLOT IgM y el del ELISA indirecto de IgM anti-SAPA. Por tanto, nuestros resultados realizando captura de Ac IgM en recién nacidos como los de otros autores que han detectado IgM específica, sugieren que el diagnóstico de IgM sería útil para la determinación de Chagas agudo y, en particular, nuestro estudio indica que la ECv mediante la determinación de Ac IgM sería útil durante los primeros días y meses de vida. Se requieren más muestras para validar el resultado, pero dado el bajo número de casos que se reportan, somos conscientes que dicha validación será a muy largo plazo.

Una limitación del uso de Ac IgM específicos para detectar la infección congénita por *T. cruzi* sería que, si el contagio se produce al final del embarazo o al nacer, el Ac IgM puede estar ausente. De hecho, en la infección por toxoplasma, esta es probablemente la razón por la cual la Se de la detección de IgM específica en el recién nacido es del 80% (Carral et al., 2018; Fricker-Hidalgo et al., 1996; Lago et al., 2014; Naot et al., 1981). En ese sentido es de destacar que el FN obtenido con F3 también fue negativo para el método por MH, lo que indica que estas infecciones se pueden adquirir al nacer o a los pocos días antes de tomar en cuenta que este suero era de un bebé de 17 días. Aunque estos casos no pudieron detectarse con el ensayo de Ac IgM, la Se que observamos indica la utilidad del método para la detección de la ECv, principalmente durante los primeros días en las maternidades en las que podría no haber personal capacitado para realizar la técnica de MH. Cabe señalar que el servicio del Hospital Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires) es el centro de referencia de la ECv en Argentina y donde se dispone de personal experto para realizar MH con la mayor Se que permite el método. Esta alta sensibilidad se reflejó en el hecho de que de 13 pacientes con ECv en el presente estudio, 10 han sido diagnosticados por MH al nacer. En este centro se reportó una Se superior al 80-90% para la técnica directa (Freilij & Altcheh, 1995), cercana a la obtenida aquí para el ELISA de captura de IgM con F3, pero otros autores

reportaron sensibilidades del 10% (L. A. Messenger et al., 2017; Simón et al., 2019). Es concebible que en centros no especializados la Se de la MH sea baja, pero la detección de IgM por ELISA, que no es operador dependiente y no requiere personal altamente capacitado, permitiría mejorar el tamizaje de la infección por *T. cruzi*. De hecho, uno de los sueros del grupo Ch+ >15 días que fue MH negativo da un resultado positivo por IgM ELISA lo que indicaría una mayor Se de detección de Ac IgM que MH, aunque se deben analizar más casos para confirmar este resultado.

En relación, a los FP, ambos corresponden a Ch->15 días (33 y 55 días respectivamente). Estos positivos son reactivos débiles y teniendo en cuenta la edad de estos bebés, la colonización del intestino y el desarrollo de IgM contra la flora intestinal pueden aumentar la reactividad cruzada de estos sueros. Una LC más alta podría resolver este problema porque estos sueros son reactivos débiles. En este estudio utilizamos el criterio de determinar la mejor Se y Es al mismo tiempo, pero en futuros estudios con un panel ampliado puede llevarnos a determinar cuál es el criterio más apropiado para seleccionar el punto de corte con el fin de evitar resultados FP.

Luego de haber realizado el desarrollo que fue muy prometedor, y motivo de una publicación, se ensayaron nuevos insumos para el diseño del ensayo ya que, como se mencionó, el Ac anti-HIS (GE, Healthcare) dejó de fabricarse. Uno consistió en la utilización de un conjugado de CP4 a biotina y otro en la utilización de un Ac anti-HIS conjugado a peroxidasa. La utilización del conjugado de CP4-B permitiría reducir los costos del ensayo al prescindir de la utilización de dos Ac que forman parte del primer diseño propuesto (Ac anti-HIS y Ac conjugado) además de proveer una mayor señal de reacción (Ag-Ac) al utilizar el sistema de alta afinidad que provee la unión de la biotina a la avidina y estreptavidina. Y la utilización del Ac anti-HIS_{HRP} reduciría uno de los reactivos del ensayo propuesto al prescindir del Ac anti-HIS y por consiguiente se reemplazaría el conjugado que se venía utilizando.

Cabe destacar que para la instancia de evaluación de estos diseños propuestos el panel de sueros, ya se veía reducido, particularmente los sueros positivos, contando con 5 sueros menos Ch+. En cuanto a la performance diagnóstica obtenida con las modificaciones de estos reactivos podemos decir que el ELISA IgM CP4-B si bien presentó una Se del 100%, la Es disminuyó mucho respecto al diseño anterior (64,3%), lo que se vio reflejado en muchos sueros con resultados FP. Y con respecto al ELISA anti-HIS_{HRP}, sucedió lo contrario, se obtuvo una muy buena Es del 96.9%, pero el parámetro de sensibilidad se redujo a un 62,5 %, reflejándose en la presencia de sueros con resultados FN. Dados estos resultados, es necesario seguir ensayando nuevos Ac anti-His que permitan lograr la Se y Es obtenida con la primera versión del ELISA de captura.

Finalmente, presentamos un sistema POCT basado en el ELISA desarrollado para la detección de la ECv. Con el fin de minimizar el equipamiento necesario, la incubación se realizó en un dispositivo de calentamiento controlado por *Bluetooth*, miniaturizado y hecho a medida, mientras que el lector ELISA convencional fue reemplazado por la cámara del teléfono inteligente y algoritmos de

procesamiento de imágenes. A partir de la plataforma “appuente”, el grupo de microfluidica de INTEC, desarrolló una aplicación para smartphone que permite guiar al usuario durante el ensayo, brindar conectividad y llenar una base de datos, lo que, a futuro, ayudará a cubrir las necesidades de vigilancia del paciente y facilitar el seguimiento de los pacientes para brindar un mejor tratamiento.

El POCT propuesto para ser utilizado como una herramienta práctica de diagnóstico en entornos de atención primaria de salud se basó en el ensayo de ELISA. Este mostró resultados prometedores para los ensayos de detección, mejorando significativamente el diagnóstico de la ECV en entornos donde la aplicación para teléfonos inteligentes que se presenta podría jugar un papel fundamental a través de las múltiples funciones que permite cubrir. Estas funciones abarcan guiar al usuario durante la realización del *test*, facilitar la determinación en entornos con escaso equipamiento, procesar datos, generar informes, registrar la situación epidemiológica en tiempo y espacio, lo que permitiría una mejor atención del paciente y la implementación de medidas de prevención.

Se requiere más trabajo para optimizar la prueba, que está siendo retrasada por la escasa disponibilidad de muestras de sangre de recién nacidos que portan la enfermedad. Esta escasez de muestras para el análisis es la razón detrás del bajo número de positivos evaluados. Por otro lado, cabe mencionar que esta evaluación se realizó con el sistema de captura que utiliza Ac anti-HIS_{HRP} el cual, como se describió previamente, presenta menor Se que el ensayo ELISA de captura de IgM originalmente descrito en este capítulo. Por tanto, en futuras evaluaciones se ensayará el sistema con un ELISA de captura optimizado.

Es importante considerar que este estudio se llevó a cabo utilizando sueros de niños cuyas madres provenían de Argentina, Bolivia y Paraguay, países que comparten los mismos linajes predominantes UDT V y VI. Por lo tanto, en estudios futuros, sería necesario incluir muestras de niños cuyas madres pertenezcan a otras regiones geográficas para evaluar el desempeño de los antígenos en relación con otras UDT.

3. Capítulo 3:

Uso del Ag de fase aguda SAPA y el Ag TS para la determinación de la infección aguda por *T. cruzi* en el recién nacido mediante la determinación de IgG específicas



3.1 Introducción

La cinética de los anticuerpos IgM e IgG luego de una determinada infección, puede variar según el patógeno y la respuesta inmune individual, pero generalmente sigue un patrón similar. En la etapa aguda de la enfermedad infecciosa, los Ac IgM aumentan rápidamente ya que son los primeros en aparecer luego de unos días posterior a la infección, alcanzan un pico máximo alrededor de una o dos semanas y luego disminuyen. A medida que la enfermedad progresa, la respuesta inmunitaria comienza a enfocarse en la producción de Ac IgG. Los niveles de Ac IgG pueden aumentar durante la etapa aguda, pero generalmente aumentan lentamente, siendo en la etapa crónica donde son producidos en mayor cantidad pudiendo persistir durante meses o incluso años. Ante el caso de un embarazo, existe una transferencia fisiológica de inmunoglobulinas de la madre al feto para proporcionar inmunidad pasiva contra enfermedades infecciosas. El isotipo de Ac IgG es la única clase de Ac que atraviesa significativamente la placenta humana brindando una protección fundamental durante los primeros meses de vida cuando la respuesta humoral neonatal es ineficiente. Si bien los anticuerpos IgM son un isotipo que permite la determinación de una infección aguda cuando son detectados en forma específica, los mismos son más difíciles de determinar debido a las limitaciones mencionadas en el capítulo 2, por lo que existen muchas aproximaciones que se han descripto para determinar infecciones agudas mediante la determinación de IgG específica.

Con la finalidad de poder realizar el diagnóstico de la etapa aguda de diferentes enfermedades, se han implementado varias estrategias que permiten, a partir de la medición del nivel de Acs IgG presentes, diferenciar si una infección es reciente o lejana.

3.1.1 Diagnóstico de infecciones agudas mediante la detección de anticuerpos IgG

Un método para diagnosticar la fase aguda de una infección, que ha sido reportado para el diagnóstico de la enfermedad de Toxoplasmosis es medir los títulos de Ac IgG en el suero de un paciente en dos muestras tomadas en un intervalo de 3 semanas; el aumento de Ac sugiere que la infección comenzó menos de 2 meses antes de la primera muestra (Durlach et al., 2003).

Por otro lado, ha sido descripto que, durante la fase aguda de determinadas enfermedades infecciosas, algunos de los Acs que se expresan durante esta fase (proteínas de fase aguda), generan niveles de Ac de tipo IgG que son bajos o insignificantes durante la fase crónica de la infección (Martin et al., 2004; Parmley et al., 1992). Esta función podría usarse para desarrollar inmunoensayos para la diferenciación entre las etapas de la infección, según la identificación de los niveles de umbral del Ac generado, como ha sido reportado para las enfermedades de Hepatitis B (Aldershvile et al., 2008; Gerlich et al., 1986), Toxoplasmosis (Li et al., 2000; Redlich & Müller, 1998) y Mononucleosis infecciosa por virus de Epstein-Barr (De Paschale et al., 2010).

Otro de los métodos utilizados para el diagnóstico de infecciones agudas son los ensayos de avidez de Ac IgG. La avidez es descrita como la fuerza de unión entre una mezcla de Ac policlonales y los epítomos de un Ag. Esta afinidad de unión funcional aumenta progresivamente luego de una exposición prolongada o repetida a un Ag, proceso también conocido como maduración de la respuesta inmunitaria humoral (Teimouri et al., 2020).

El *test* de avidez de Ac IgG, descrito por primera vez por Hedman y col. (1989), para identificar la infección primaria de la Rubeola, ha permitido diferenciar entre Ac IgG de baja avidez producidos en una infección adquirida recientemente y Ac IgG de alta avidez producidos en una infección distante en el tiempo, mediante el uso del índice de avidez (IA). El formato de prueba más común utilizado es el ELISA. En este, luego de una incubación del Ac con el Ag inmovilizado en la fase sólida se agrega un agente desnaturizante, como por ejemplo urea en altas concentraciones (4-8 M), como diluyente o como agente de lavado. Este desnaturizante actúa previniendo la formación (diluyente) o permitiendo la disrupción (agente de lavado) de los puentes de hidrógeno en los complejos Ag/Ac débiles (Teimouri et al., 2020). Por lo tanto, se requieren concentraciones de iones caotrópicos más elevadas para romper los enlaces de hidrógeno de los Acs de alta avidez que permanecen unidos al Ag en comparación con los Acs de baja avidez que se disocian casi por completo (Berth et al., 2014; Goldblatt, 2001; Hedman et al., 1989). Las muestras se evalúan por duplicado y en paralelo, y el IA de una muestra es calculado como la relación entre los niveles de Ac detectados luego del tratamiento con el agente desnaturizante y los niveles de Ac en las muestras no tratadas (Teimouri et al., 2020).

Desde entonces los ensayos de avidez de Ac IgG han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico de varias enfermedades como Toxoplasmosis, Citomegalovirus y Hepatitis B (Besteiro, 2010; Hedman et al., 1989; Minosse et al., 2021; Remington et al., 2004), permitiendo diferenciar entre infección reciente (aguda) y lejana (crónica) (Barros et al., 2017; de Castro Zacche-Tonini et al., 2017).

En el caso del diagnóstico de Toxoplasmosis aguda, por ejemplo, si bien la tasa de maduración de Ac IgG varía para cada individuo, un IA elevado confirma la fase crónica, descartando así una infección reciente. Por otro lado, un IA bajo sugiere que el individuo ha sido recientemente infectado (García et al., 2018).

3.1.2 Criterios para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la etapa aguda mediante la detección de Ac IgG

En el diagnóstico serológico para la detección de la enfermedad de Chagas agudo se han utilizado y evaluado una gran variedad de preparaciones antigénicas: homogenatos, Ag excretados del parásito en sus diferentes estadios, lisados de epimastigotes y proteínas recombinantes. En los últimos años, los estudios se han enfocado en encontrar marcadores serológicos específicos que permitan la detección temprana de la infección.

3.1.2.1 Detección de Ac IgG mediante seguimiento serológico

Como hemos mencionado en el capítulo 2, el algoritmo actual de diagnóstico procede con la detección de la infección en el recién nacido realizando en primera instancia la técnica del MH. Si el MH resulta positivo se indica inmediatamente el tratamiento antiparasitario. Mientras que si el MH es negativo debe realizarse el seguimiento mediante las pruebas serológicas mencionadas anteriormente en el capítulo 1. El diagnóstico serológico se realiza a partir de los 10 meses de vida, cuando los niveles de Ac maternos transferidos al niño disminuyen por debajo de niveles detectables y, por lo tanto, la presencia de Ac IgG específicos para *T. cruzi* puede asociarse a una infección vertical (L. Messenger & Bern, 2018).

Estos 10 meses mínimos que se deben esperar para confirmar el resultado, constituyen la principal limitación del diagnóstico en neonatos.

3.1.2.2 Detección de Ac IgG anti- Ag de fase aguda SAPA

Affranchino y col. (1998) clonaron y caracterizaron un Ag de *T. cruzi* el cual era reconocido mayormente por sueros de pacientes con infección aguda y no por suero de personas con infección crónica. Luego demostraron que el Ag se liberaba al medio de cultivo en la etapa infectiva del tripomastigote. Tras comprobar que era posible detectar este Ag en sangre de ratones con infección aguda para la enfermedad de Chagas lo denominaron antígeno de fase aguda (SAPA, Shed Acute Phase Antigen), siendo una de las principales proteínas eliminadas durante el período agudo de la enfermedad.

A diferencia del Ag SAPA, se ha demostrado que durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, los pacientes presentan Ac IgG anti-TS que neutralizan a la enzima Trans-sialidasa (Leguizamón et al., 1994). Estos Acs permitieron el desarrollo del ensayo de inhibición de TS (TIA), para el diagnóstico de infecciones crónicas por *T. cruzi* en reservorios de mamíferos humanos, domésticos y silvestres (Leguizamón et al., 1997; Sartor et al., 2013).

Mientras que la TS es un Ag de fase crónica, la fracción SAPA se ha evaluado frente a sueros humanos y se ha detectado que el 93% de las personas que cursaban la enfermedad en etapa aguda presentaban reactividad contra SAPA mientras que, sólo el 8-10% de los sueros humanos que padecían la enfermedad en estadio crónico contenían niveles detectables de Acs contra SAPA. Además, han podido demostrar que los Acs contra SAPA son detectables 15 días después de la manifestación de los síntomas agudos de la enfermedad de Chagas en humanos (Affranchino et al., 1989).

Por tales motivos, a partir de la aparición temprana de Acs anti-SAPA, se abre la posibilidad de diseñar ensayos de detección de dichos anticuerpos para identificar la enfermedad de Chagas en infectados recientemente (Affranchino et al., 1989). Reyes y col. (Reyes et al., 1990) han demostrado que el Ag SAPA es un marcador de fase aguda, que resulta confiable y altamente sensible para la detección de la infección vertical por *T. cruzi*. Posteriormente se ha desarrollado una prueba de ELISA,

denominada ELISA-SAPA, que detecta Ac IgG contra la proteína recombinante SAPA en niños nacidos de madres infectadas con alta sensibilidad a los 3 meses de edad (Russomando et al., 2005, 2010), ya que los Acs específicos SAPA de transmisión materna desaparecen en los bebés antes que los Acs convencionales. El uso de esta prueba permitió identificar casos de Chagas vertical entre aquellos lactantes infectados por *T. cruzi* no detectados o que habían resultado FP por la serología convencional (Russomando et al., 2010). El ELISA-SAPA es aplicado actualmente en el sistema de Salud Pública de Paraguay.

Por otro lado, se planteó que los altos niveles de Ac IgG anti-SAPA en bebés al nacer no son un indicador suficiente de infección vertical por *T. cruzi* debido a la presencia de Ac transferidos por la madre (Mallimaci et al., 2010). Sobre esta base, se ha propuesto comparar los niveles de Ac IgG anti-SAPA en muestras de sangre binomiales de madres seropositivas y sus bebés (ELISA-SAPA). Para tal fin se determina el diferencial entre los valores de DO de IgG anti-SAPA del neonato y de la madre, de manera de diferenciar la reactividad debida a los Ac producidos por el bebé de la reactividad debida a los Ac maternos. La evaluación de esta estrategia en Argentina permitió el diagnóstico del 90,5% de los niños estudiados infectados por *T. cruzi* alrededor del mes de edad (Mallimaci et al., 2010; Volta et al., 2015). En línea con estos resultados, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de parasitemia en madres y bebés evaluados por qPCR y los títulos de Ac IgG anti-SAPA detectados por ELISA-SAPA, lo que probablemente se explica por la secreción del Ag por los tripomastigotes en el torrente sanguíneo en forma temprana (Volta et al., 2015). Sin embargo, en otros intentos de aplicación de la estrategia en el sistema de salud se han observado resultados discordantes (datos sin publicación) y no se ha logrado su implementación para el diagnóstico de rutina de la infección vertical en nuestro país.

3.1.2.3 ELISA de avidéz

Para nuestro conocimiento, no hay antecedentes de ELISA de avidéz para el diagnóstico de infecciones por *T. cruzi*. Considerando que los Ac de la madre con infección crónica que son transferidos a su hijo son Ac IgG de AA, mientras que los anticuerpos del neonato transcurriendo la infección aguda son Ac IgG de BA, la medición de la avidéz de Ac representa una potencial estrategia para la detección de la infección vertical.

3.1.3 Correlación y relación de transferencia de Ac maternos hacia los bebés

Los niveles de anticuerpos IgG se deben al transporte mediados por el receptor Fc neonatal (FcRn) presente en las células del sincitiotrofoblasto. Dicho transporte de Acs durante el embarazo puede verse afectado por una serie de factores y condiciones clínicas, además de la edad gestacional como factor importante en la transferencia de Acs. El proceso está influenciado por varios aspectos como la inmunocompetencia materna, infecciones concomitantes, niveles de Acs específicos adquiridos postinmunización, integridad placentaria, clase de IgG y tipo de Ag (Palmeira et al., 2012). Por otro

lado, existe una correlación entre los niveles de IgG específica presentes en las mamás y los bebés, la cual también está relacionada con la duración del embarazo (Palmeira et al., 2012; Suzuki, 1988).

Se ha encontrado que los Acs maternos transferidos al feto con diferentes especificidades antigénicas tienen diferentes vidas medias en los lactantes. Por ejemplo, aunque en un embarazo normal, la IgG específica contra la tos ferina presenta niveles en la sangre del cordón mayores del 100% a los de los niveles maternos, estos presentan una vida media de 6 semanas en lactantes y disminuyen a niveles indetectables a los 4 meses de vida (Van Savage et al., 1990). Por el contrario, la IgG específica contra el sarampión adquirida pasivamente de la madre permanece cerca de los niveles protectores a los 6 meses después del nacimiento y todavía es detectable al año de vida (Ciobanu et al., 2020).

Esta información reportada en relación con la cinética de transferencia de anticuerpos IgG de la madre al feto indica la necesidad de establecer estrategias para discriminar en qué medida los niveles de anticuerpos presentes en el bebé son propios o transferidos por la madre.

3.2 Objetivos del capítulo 3

De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, en este capítulo proponemos al Ag marcador de fase aguda SAPA y al de fase crónica TS, para su aplicación en el diagnóstico de infección aguda connatal mediante una estrategia basada en un ensayo de ELISA SAPA/TS, que consistió en la medición de los Ac IgG y, por otro lado, en el uso del Ag SAPA mediante una estrategia consistente en un ELISA de avidez de IgG.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Paneles de sueros para evaluación de Ac anti-IgG específicos de *T. cruzi*:

3.3.1.1 Panel de sueros: binomios MM BB:

A partir del panel de sueros M, mencionado en el capítulo 2, sección 2.3.1, conformado por muestras de niños, y la disponibilidad de sueros de las madres de esos niños, que asistieron a sus visitas regulares al Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" (Buenos Aires, Argentina), se conformó el panel de sueros de binomios Mamá (MM)-Bebé (BB).

Las muestras se clasificaron de la siguiente manera:

- Muestras de sueros de madres (n=22) con serología positiva para la EC en contexto de los controles prenatales. Dos pruebas comerciales diferentes incluyendo ELISA e IHA de Wiener Lab (Argentina) fueron empleadas para evaluar estado de infección crónica por *T. cruzi*. En todos los casos la condición serológica fue confirmada como positiva, según lo establecido por procedimientos técnicos estándar de la OMS (WHO, 2002), ya que se obtuvieron resultados concordantes.
- En cuanto a los BB, los sueros que presentaron MH+ o MH- con serología positiva 9 meses después del nacimiento, se clasificaron como Ch+ (n=7) y los sueros que mediante el seguimiento serológico posterior a los 9 meses dieron negativos, se clasificaron como Ch- (n=15).

El panel quedó conformado como se observa en la Figura 34.

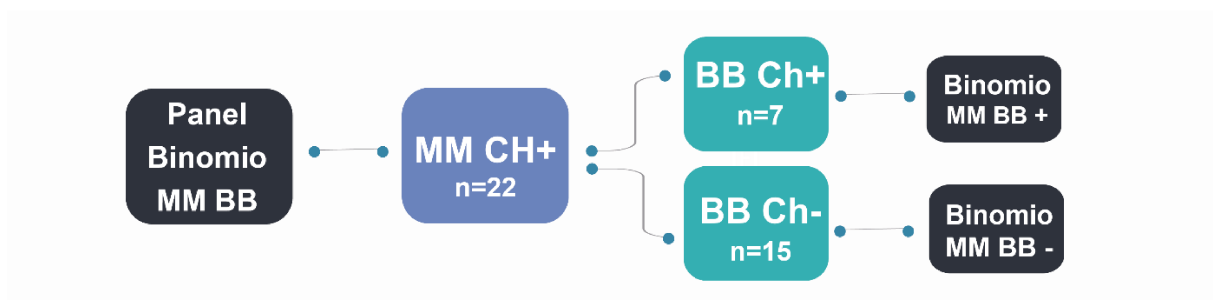


Figura 34: Panel de sueros binomios MM BB. Panel conformado por MM CH+ con un n=22, para las cuales sus BB se clasificaron como Ch+ (n=7) conformando el Binomio MM BB+ y Ch- (n=15) conformando el Binomio MM BB-.

El protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la FBCB-UNL (CE2020-58) y el Comité ético del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (DI-2014-221). Se destaca que los restos de muestras de sangre empleadas en este trabajo se obtuvieron en el marco de los controles clínicos y bioquímicos habituales durante el seguimiento de los niños, conservados con codificación y protección adecuada de los datos personales.

3.3.1.2 Panel de sueros G: sueros crónicos

Se utilizaron sueros de pacientes que resultaron positivos (n=9) y negativos (n=9) para la infección crónica de Chagas. Los mismos corresponden al panel reducido G, descrito en el capítulo 1, sección 1.3.3.

3.3.2 Antígenos recombinantes utilizados

3.3.2.1 Antígeno de fase aguda: SAPAx4

Se utilizó SAPA (GenBank: ACM47956.1) (Camussone et al., 2009) como antígeno de fase aguda obtenido en el laboratorio, descrito en el capítulo 1, con una concentración de 0,744 mg/mL.

3.3.2.2 Antígeno de fase aguda: SAPAx13

El Ag SAPA de fase aguda, al cual denominamos SAPAx13, fue cedido gentilmente por el Dr. Carlos A. Buscaglia (IIB-INTECh-UNSAM). La secuencia aminoacídica que codifica dicha proteína recombinante se conforma por 13 repeticiones antigénicas. Se dispuso del Ag SAPAx13 purificado y cuantificado para emplear en el presente trabajo, con una concentración de 0,590 mg/mL.

3.3.2.3 Antígeno de fase crónica: Trans-sialidasa

Se trabajó con una mezcla de dos fragmentos de la proteína TS (Figura 35), que han sido clonados previamente en el LTI: el fragmento N-terminal, denominado TSNt (GenBank: MZ215730.1) que incluye los aa 63 a 346 (Prochetto et al., 2022) y el fragmento C-terminal, llamado TSf (GenBank: MZ215729.1) que incluye la región del aa 338 al 627 (Prochetto et al., 2017). Ambas proteínas fueron obtenidas en *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción plasmídica pET-28a(+)/TSNt o TSf. Se dispuso de los Ag TSNt y TSf purificados y cuantificados, en una concentración de 0,230 mg/mL y 0,760 mg/mL, respectivamente.

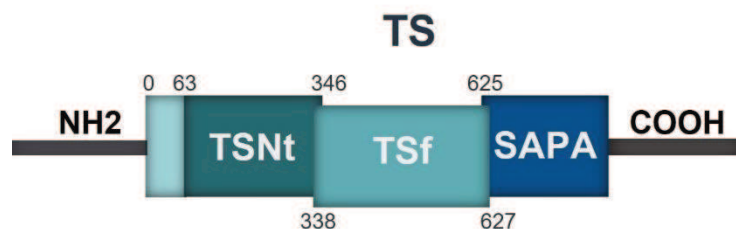


Figura 35: Diagrama de los fragmentos de TS. Imagen representativa de los fragmentos TSNt y TSf en comparación con la proteína TS de longitud completa.

3.3.3 *Análisis de la secuencia SAPAx4*

Se procedió con el análisis de la secuencia SAPAx4 mediante programas bioinformáticos. Se realizó un Blastp para el alineamiento con las secuencias reportadas y una predicción de epítomos con el servidor ABCpred para una longitud de 12 aa.

Luego se realizó una predicción de epítomos para la secuencia SAPAx4 modificada, que consiste en la secuencia SAPAx4 con la sustitución del aa 29 Leucina (L) por un aa Histidina (H).

3.3.3.1 *Análisis de la diversidad genética de la secuencia SAPAx4*

Para evaluar la diversidad de la secuencia SAPAx4, se realizó un Blastp contra 50 secuencias de *T. cruzi* compiladas previamente mediante análisis bioinformático.

3.3.4 *Evaluación de los Ag SAPA recombinantes mediante ensayos de ELISA*

3.3.4.1 *Evaluación de SAPAx4*

Se llevaron a cabo ensayos de ELISA indirecto para detectar Ac IgG anti-SAPA en muestras binomiales de sueros de madres y sus hijos. Se evaluaron binomios pertenecientes al panel de sueros A: binomios MM BB+ (n=7) y binomios MM BB- (n=15).

Las microplacas de ELISA (Greiner Bio-One) se sensibilizaron con 100 μ L del Ag SAPAx4 (500 ng por pocillo) diluido en *buffer* carbonato (pH 9,6) y se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego a 4°C durante toda la noche. Luego se realizó el bloqueo de los sitios de unión inespecífica con 200 μ L de PBS-Leche descremada 5%. Posteriormente se incubaron 100 μ L de las muestras de sueros de las madres o los bebés diluidas (dil 1/100) en PBS-Leche 1%. Como Ac secundario se emplearon 100 μ L de un Ac de cabra anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (anti-IgG_{hu}-HRP, Jackson) diluido en PBS-Leche 1% (dil 1/5000). Cada paso de incubación se realizó a 37°C durante 30 min y entre cada uno de estos pasos se efectuaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0,05% (v/v). El revelado se llevó a cabo mediante el agregado de una gota de TMB (Life Technologies) por pocillo y la adición de H₂SO₄ 0,5 N para detener la reacción.

Finalmente se realizó la lectura de DO en un lector de ELISA a 450 nm (Molecular Devices Emax). Para salvar la heterogeneidad propia de la técnica de ELISA, los valores de DO fueron expresados como el índice de densidad óptica (IDON), que corresponde a la DO de la muestra en relación con el valor de *cut-off* o línea de corte (LC).

Los valores de IDON se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad donde se determinó una LC que permitió obtener valores óptimos de Se, Es, AUC e índice J. Se consideraron

casos de bebés positivos para Chagas vertical cuando se obtuvo un resultado \geq LC y bebés negativos cuando se observó un resultado $<$ LC.

3.3.4.2 Comparación de SAPAx4 y SAPAx13

Se evaluó un panel de sueros reducido del panel de sueros A, conformado por madres infectadas por *T. cruzi* (n=5) y sueros de bebés clasificados como positivos (BB+, n=3) y negativos (BB-, n=6).

Se realizó un ELISA indirecto como se detalla en el inciso 3.2.3.1, sensibilizando la placa alternativamente con el Ag SAPAx4 o el Ag SAPAx13 (500 ng por pocillo) diluido en *buffer* carbonato (pH 9,6). Los valores obtenidos de la lectura de DO se expresaron finalmente como IDON.

3.3.5 Estrategia 1: ELISA SAPA/TS

En el marco del presente trabajo se propuso una estrategia para el diagnóstico de infecciones verticales por *T. cruzi*, basada en la medición de los Ac IgG anti-SAPA en los binomios mamá-bebé y su comparación con Ac que solo se desarrollan en fase crónica como son los Ac IgG anti-TS.

Se consideró que, para cada binomio, todos los Ac IgG maternos son transferidos al niño en igual proporción (independientemente de la especificidad). Conociendo dicho valor a partir de la medición de los Ac IgG anti-TS, se estimó la proporción de Ac IgG anti-SAPA producidos por el propio bebé debido a la infección vertical.

3.3.5.1 Evaluación de TS como Ag de fase crónica

Se realizaron ensayos de ELISA indirecto para detectar Ac IgG anti-TS específicos de *T. cruzi* en muestras de pacientes crónicos, siguiendo la metodología ya empleada en el laboratorio (Peveengo y col., 2018). Se analizaron muestras del panel G, clasificadas como Ch+ (n=9) y Ch- (n=9) para la infección crónica.

Se evaluaron cuatro condiciones de sensibilización de los Ag a la placa de ELISA: I) 500 ng del fragmento amino terminal (TSNt), II) 500 ng del fragmento carboxilo terminal (TSf), III) 100 ng de cada fragmento por pocillo (TSNt+TSf) y IV) 500 ng de cada fragmento por pocillo (TSNt+TSf). Se calculó la relación entre la DO media de los sueros Ch+ y la DO media de los sueros Ch- (Δ DO+/ Δ DO-) para evaluar la discriminación entre sueros positivos y negativos.

3.3.5.2 ELISA SAPA/TS

El panel utilizado en este ensayo consistió en muestras binomiales madre-hijo del panel de sueros A: binomios MM BB+ (n=5) y binomios MM BB- (n=11).

Las microplacas (Greiner Bio-One) se sensibilizaron con 500 ng del Ag SAPA o con 100 ng de cada fragmento de la mezcla antigénica TSNT+TSf, diluidos en *buffer* carbonato (pH 9,6). Se incubaron a 37°C durante 1 h y luego a 4°C durante toda la noche. Luego se realizó un bloqueo con 200 µL PBS-Leche 5% durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de las muestras de sueros de las madres o los bebés diluidas (dil 1/100) en PBS-Leche 1%. Como Ac conjugado se empleó el Ac anti-IgG_{hu}-HRP (Jackson), sembrando 100 µL de una dilución 1/5000 en PBS-Leche 1%. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 30 min y entre cada paso se efectuaron lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v). Finalmente, el revelado de la reacción se realizó mediante el agregado de 1 gota de TMB (Life Technologies) y 1 gota de H₂SO₄ 0,5 N para detener la reacción. La lectura de las DO obtenidas se llevó a cabo en un lector de ELISA a 450 nm (Molecular Devices Emax).

3.3.5.3 Cálculo del índice de Acs anti-SAPA/Acs anti-TS

El índice de Acs anti-SAPA/Acs anti-TS ($I_{SAPA/TS}$) en cada binomio se determinó como se muestra en la ecuación 2:

$$I_{SAPA/TS} = \frac{SAPA \frac{DO_{BB}}{DO_{MM}}}{TS \frac{DO_{BB}}{DO_{MM}}} \quad (2)$$

Donde DO_{BB} y DO_{MM} es el promedio de la DO obtenida para Acs anti-SAPA y Acs anti-TS de cada muestra de los binomios MM BB.

Los valores de $I_{SAPA/TS}$ se evaluaron mediante curva ROC con el programa GraphPad. Se determinó como LC aquella que permitió obtener valores óptimos de sensibilidad, especificidad AUC e índice J. Se consideraron casos de bebés positivos para Chagas vertical cuando se obtuvo un resultado de $I_{SAPA/TS} \geq LC$ y bebés negativos cuando se observó un resultado de $I_{SAPA/TS} < LC$.

3.3.5.4 Análisis de correlación y tasa de transferencia de Ac maternos hacia sus bebés:

La relación entre los niveles de Ac IgG maternos y de Ac IgG de bebés tanto anti-SAPA como anti-TS fue analizada usando el coeficiente de correlación de Pearson.

Se calculó la relación (“*ratio*”) de transferencia de cada binomio MM BB como el cociente del nivel de Ac IgG de BB sobre el nivel de Ac IgG de la MM. Luego, la tasa total de transferencia se calculó como el promedio de las relaciones de todos binomios MM BB tanto para los Ac IgG anti-SAPA como para los Ac IgG anti-TS.

3.3.6 Estrategia diagnóstica 2: ELISA de Avidéz IgG anti-SAPA

Se aplicó un protocolo de ensayo de avidéz ya empleado en el laboratorio (García y col., 2018). Se sensibilizaron microplacas de poliestireno de ELISA de fondo plano (Greiner Bio-One) con 100 μ L del Ag SAPA (500 ng por pocillo en *buffer* carbonato, pH 9,6) y se incubaron 1 h a 37 °C y luego durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las superficies sin modificar fueron bloqueadas con 200 μ L de leche descremada al 5% en PBS 1X (pH 7,4) durante 1 h a 37 °C. Luego, las microplacas se incubaron con 100 μ L de muestras de sueros de las madres o los bebés, las cuales se utilizaron por duplicado y diluidas en serie (dil 1/100 a 1/3200) en *buffer* PBS-Leche 1%. Luego los pocillos dobles se incubaron con 100 μ L de PBS 1X o urea 6 M en PBS 1X. Posteriormente se incubaron con una dilución 1:5000 del Ac anti-IgG_{hu}-HRP (Jackson) en leche descremada al 1% en PBS 1X. Las incubaciones fueron realizadas 1 h a 37°C y entre cada incubación se realizaron tres lavados con PBS que contenía 0,05% (v/v) Tween 20.

La reacción enzimática se desarrolló con 100 μ L por pocillo de TMB (Invitrogen) y se detuvo usando 100 μ L por pocillo de 0,5 N H₂SO₄. Se determinó densidad óptica (DO) de las placas a 450 nm en un lector ELISA (Molecular Devices Emax).

3.3.6.1 Cálculo del índice de avidéz % y del índice de relación de avidéz MM BB

El índice de avidéz porcentual (IA%) se calculó para cada suero (mamá o bebé) a partir del método del área bajo la curva (AUC) descrito por nuestro grupo (García et al., 2018), como se muestra en la ecuación 3:

$$IA\% = \frac{AUC \text{ urea}}{AUC \text{ PBS}} \times 100 \quad (3)$$

Donde AUC Urea y AUC PBS son las áreas bajo las curvas obtenidas mediante el programa bioestadístico GraphPad a partir de graficar los valores de DO del ensayo de ELISA de avidéz en función de las diluciones en serie para las muestras del binomio, tratadas con Urea y PBS 1X, respectivamente.

Finalmente, el resultado se expresó como la relación (IA_{relación}) entre el IA% de Ac IgG anti-SAPA de la madre con infección crónica (Ac de alta avidéz) y el IA% de su hijo con posible infección aguda (Ac de baja avidéz), como se muestra en la ecuación 4.

$$IA_{relación} = \frac{IA\% \text{ MM}}{IA\% \text{ BB}} \quad (4)$$

Los valores de $IA_{\text{relación}}$ fueron evaluados mediante curva ROC, para obtener los parámetros diagnósticos de sensibilidad y especificidad, AUC e índice J. Se consideraron bebés positivos para la infección vertical por *T. cruzi* aquellos que presentaron un valor de $IA_{\text{relación}} \geq LC$ y bebés negativos cuando se obtuvo un resultado de $IA_{\text{relación}} < LC$.

3.4 Resultados

Como primer paso para el desarrollo de este capítulo, se realizó un análisis de la secuencia del Ag SAPA utilizado ya que se ha reportado una importante diversidad en este antígeno de hasta un 70% (Majeau et al., 2021). Luego se desarrollaron dos estrategias diagnosticas: un ELISA de Avidéz utilizando como Ag SAPA y un ELISA indirecto utilizando como Ags SAPA y TS.

3.4.1 Análisis de la secuencia SAPAx4

La secuencia que expresa al Ag SAPA utilizada en este trabajo corresponde a la del clon disponible en LTI, la cual fue reportada por Camussone y col (2022). La misma se muestra en la Figura 36. Está compuesta por 73 aa y contiene 4 repeticiones de una variante antigénica repetitiva.

**LIGTEAHMDSSSDSSAHSTPSTPADSSALSTPSTPA
DSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPAGHGATGMVLILPD**

Figura 36: Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante SAPAx4 utilizada. En negro se destaca la secuencia no repetitiva, en azul la secuencia repetitiva y en rojo los aminoácidos en los que difieren a la secuencia reportada por Affranchino y col., 1989.

Al realizar el alineamiento con la secuencia tomada como referencia reportada por Affranchino (Affranchino et al., 1989), que consta de 257 aa con 13 repeticiones de 4 variantes antigénicas, se obtuvo un 83% de identidad. Como puede observarse en la Figura 37, la región no repetitiva al inicio de la secuencia (*LIGTEAHMDSSS*) presenta completa identidad, mientras que la secuencia no repetitiva hacia el final de la secuencia difiere en 3 aa (*GHGATGMVLILPD*) respecto a la secuencia reportada. En cuanto a las regiones repetitivas tres presentan completa identidad a la secuencia reportada (*DSSAHSTPSTPA*), mientras que una secuencia repetitiva difiere en un aa (*DSSALSTPSTPA*: sustitución L:H) de la secuencia mencionada anteriormente.

unnamed protein product

Sequence ID: Query_310393 Length: 257 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 257 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

NW Score	Identities	Positives	Gaps
108	70/257(27%)	72/257(28%)	166/257(64%)
Query 1	NSIEL-----LIGTEAHMSSSDSSAH-----		22
	N++ L LIGTEAHMSSSDSSAH		
Sbjct 1	EFGPTISHVTVNNVLLYNRQLNAEEIKTLFLSQDLIGTEAHMSSSDSSAHGTPSTPVDS		60
Query 23	-----STPSTPADSSALSTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPA--		65
	STPSTPADSSA STPSTP DSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPA		
Sbjct 61	TAHGTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPADS		120
Query 66	-----GHG-----		68
	HG		
Sbjct 121	SAHSTPSTPVDSAHGTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPVDS		180
Query 69	-----ATGMVLILPD-----		78
	A G VLILPD		
Sbjct 181	SAHSTPSTPADSSAHGTPSTPVDSAHSTPSTPADSSANGTVLILPDGAALSTFSGGGLL		240
Query 79	-----VD 80		
Sbjct 241	LCACALLLHVFFTAVFF 257		

Figura 37: Blastp para el alineamiento de la secuencia SAPAx4. La proteína recombinante SAPAx4 utilizada mostro una identidad de aminoácidos del 83% alineada con la proteína SAPA indexada en GenBank: AAA03000.1.

Se realizó la predicción de epítomos de células B, de la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante SAPAx4 utilizada con la finalidad de poder comparar los epítomos antigénicos de la misma con los reportados experimentales en bibliografía. El análisis se llevó a cabo con el servidor ABCpred, donde se realiza una clasificación evaluando por score, a los péptidos que conforman la secuencia de acuerdo con la probabilidad más alta de ser un posible candidato a epítomo. A su vez, la predicción de los epítomos varía de acuerdo con el número de aa que se establece para el análisis. En este caso, se realizó la predicción para una longitud de 12 aa donde se observó que las secuencias con los aa **DSSAH** y **STPSTP** son las que más se repiten dentro de los epítomos predichos, presentando scores desde 0,54 a 0,86 (Figura 38 A). Por otro lado, se observa en la Figura 38 B que, de los epítomos predichos, dos contienen el aa L en la región central y presentan score de 0,61 y 0,78.

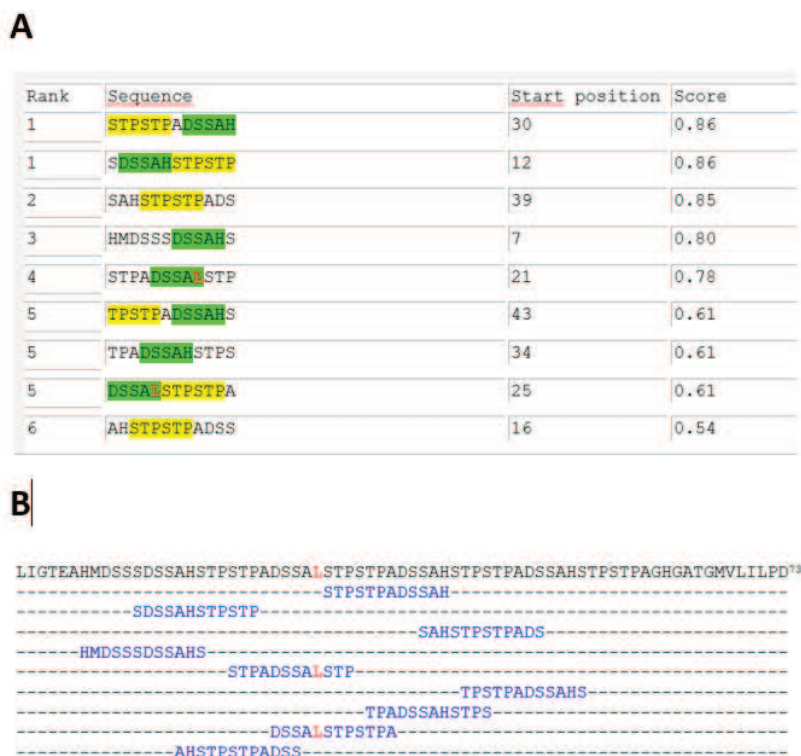


Figura 38: Análisis obtenido de la secuencia SAPAx4 utilizada mediante el servidor ABCpred. Análisis de epítomos establecido para n=12 aa. A) Resultados de las secuencias de epítomos, posición de inicio de la secuencia y score obtenido. Se destaca con amarillo y verde las dos secuencias que más se repiten en cada predicción. B) Ubicación del epítopo predicho dentro de la secuencia completa de SAPAx4.

Luego se realizó la predicción para la secuencia SAPAx4 pero modificando (secuencia SAPAx4 modificada) el aa L por un aa H de manera de ver como cambiaría la predicción de epítomos si la secuencia variable sería igual a una de las variables reportadas por Affranchino y col. (1989), es decir, sin sufrir ninguna sustitución. La predicción se realizó también para una longitud de 12 aa y se observó, como en la predicción anterior, que las secuencias con los aa **DSSAH** y **STPSTP** son las que más se repiten, pero en este caso presentando scores desde 0,61 a 0,86 (Figura 39 A). En la Figura 39 B se observa que, de los epítomos predichos, dos contienen el aa H (modificado) en la región central y presentan score de 0,61 y 0,86. Por lo que pudimos corroborar que la modificación del aa L por H no afectaría a la predicción de epítomos ya que los scores y las secuencias predichas son muy similares.



Figura 39: Análisis obtenido de la secuencia SAPAx4 modificada mediante el servidor ABCpred. Análisis de epítomos establecido para n=12 aa. A) Resultados de las secuencias de epítomos, posición de inicio de la secuencia y score obtenido. Se destaca con amarillo y verde las dos secuencias que más se repiten en cada predicción. B) Ubicación del epítomo dentro de la secuencia completa de SAPAx4 modificada.

3.4.1.1 Análisis de la diversidad de la secuencia SAPAx4

Para analizar la diversidad de la secuencia SAPA realizamos un blastp con 50 secuencias de *T. cruzi* compiladas en un trabajo realizado previamente, el cual utilizó la sección del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para obtener las secuencias TS representativas de diferentes UDT pertenecientes al grupo 1 de la trans-sialidasa (Pacini et al., 2023). El resultado de este alineamiento reveló que la secuencia del Ag SAPAx4, presenta una conservación de secuencia en todas las cepas analizadas con una identidad media del 77% (tabla completa en el anexo).

3.4.2 Evaluación del Ag SAPAx4

Se realizó un ensayo de ELISA indirecto para el diagnóstico de la infección aguda en bebés, mediante la detección de Ac IgG específicos para SAPA.

Se evaluó el panel de sueros A, conformado por binomios de madres infectadas por *T. cruzi* (n=22) y sus hijos, clasificados como bebés Ch- (MM BB-, n=15) y bebés Ch+ (MM BB+, n=7).

Como se observa en la Figura 40, de las madres evaluadas 16 presentaron Ac IgG anti-SAPA. Respecto a los niños, se observó que 8 de los 15 bebés no infectados y 5 de los 7 bebés infectados

presentaron Ac IgG anti-SAPA. Los niveles de Ac IgG anti-SAPA en muestras de bebés no infectados se asocian a la presencia de Ac IgG anti-SAPA transferidos por la madre.

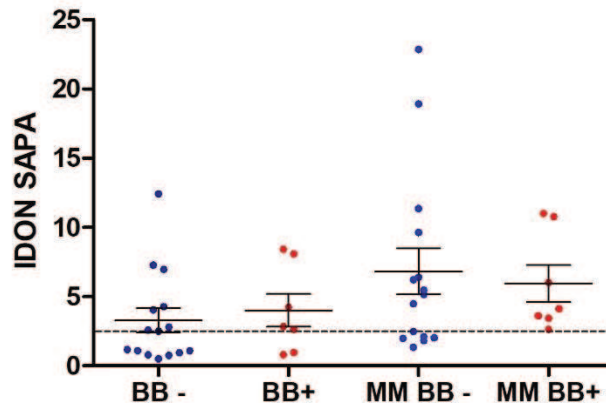


Figura 40: Sueros del binomio MM BB utilizados para la detección de Acs anti-SAPA. Gráfico de dispersión. La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar (SD) para cada grupo de sueros, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo.

3.4.3 Comparación de los Ag SAPAx4 y SAPAx13

Al analizar los niveles de Ac IgG anti-SAPA en las muestras binomiales empleando el Ag SAPAx4, se encontró que la mayoría de las MM mostraron mayores valores de DO en comparación con sus BB, independientemente de si se trataba de BB+ o de BB-. Sin embargo, las estrategias que aplican ELISA-SAPA reportan que los casos de BB+ presentan mayores valores de DO que sus madres (Mallimaci et al., 2010; Volta et al., 2015). Teniendo en cuenta estos resultados discordantes y que el Ag SAPAx4 empleado está conformado por menos unidades repetitivas que lo reportado en bibliografía, se decidió evaluar el Ag SAPAx13 antes de avanzar con la aplicación de las estrategias propuestas. Para tal fin, se realizaron ensayos de ELISA indirecto para la detección de Ac IgG anti-SAPA frente a muestras del panel A reducido, utilizando como Ag SAPAx4 o SAPAx13, alternativamente. Se evaluaron sueros pertenecientes a BB+ (n=3), BB- (n=6) y MM (n=5).

Como puede observarse en la Figura 41, al emplear como Ag SAPAx4 o SAPAx13 se obtuvo un patrón diferente de dispersión en la distribución las muestras evaluadas, resultando en mayores valores de reactividad de los sueros frente a SAPAx4. Los sueros de BB+ se clasificaron 3 de 3 y 2 de 3 como positivos con SAPAx4 y SAPAx13, respectivamente. En el caso de los sueros de BB-, ambos Ag permitieron clasificar correctamente 2 de los 6 sueros como negativos. Respecto a las MM, se clasificaron como positivas 5 de 5 y 4 de 5 muestras al emplear SAPAx4 y SAPAx13, respectivamente. Además, las MM mostraron un valor de DO mayor que los BB+ independientemente del Ag utilizado. Por lo tanto, se decidió continuar trabajando con el Ag SAPAx4 en el desarrollo de este trabajo.

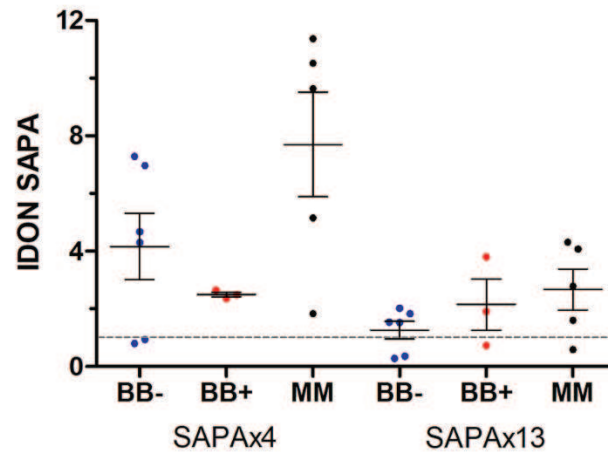


Figura 41: Comparación del desempeño diagnóstico de SAPAx4 con SAPAx13. La línea de tendencia central muestra el valor medio con SD para cada grupo de sueros. La línea discontinua indica el valor de corte relativo.

3.4.4 Estrategias diagnósticas propuestas

Dado que las estrategias de ELISA propuestas en el presente trabajo se basan en la detección de Ac específicos para el Ag SAPA, en adelante el desempeño diagnóstico de estas estrategias fue evaluado sólo con aquellas muestras binomiales, del panel de sueros de los binomios MM BB, que mostraron niveles detectables de Ac IgG anti-SAPA: binomios (n=16) de madres seropositivas con sus correspondientes hijos bebés Ch- (MM BB-, n=11) y bebés Ch+ (MM BB+, n=5).

3.4.5 Estrategia 1: ELISA SAPA/TS

La primera estrategia evaluada en este capítulo, denominada ELISA SAPA/TS, para diagnosticar la infección aguda en bebés consistió en la medición de los Ac IgG anti-SAPA en los binomios mamá-bebé y su comparación con Ac que solo se desarrollan en fase crónica como son los Ac IgG anti-TS. La hipótesis para esta alternativa es que la proporción relativa de Ac IgG maternos, tanto anti-TS como anti-SAPA, transferidos al niño en un determinado binomio debería de ser un valor constante mientras el BB no produzca Ac propios. Se propone entonces comparar las proporciones transferidas de Ac IgG anti-SAPA y de Ac IgG anti-TS, siendo estos últimos producidos solo por la madre con infección crónica. En base a la hipótesis antes planteada, de este modo, se debería poder identificar la fracción de anticuerpos producidos por el propio BB en respuesta a la infección vertical.

3.4.5.1 ELISA TS

En un comienzo se realizaron ensayos de ELISA indirecto para evaluar el comportamiento diagnóstico del Ag TS, ya que no ha sido reportada la utilización de este Ag frente a la detección de Ac IgG en sueros Chagas crónico. Se evaluaron diferentes composiciones de Ag y se analizó la relación $\Delta DO+/\Delta DO-$ (Tabla 8). Como se observa en la Figura 42, los resultados indican niveles detectables de Ac IgG anti-TS en las muestras ensayadas. Se observó que la concentración óptima para sensibilizar las microplacas de ELISA resultó ser la mezcla antigénica de TSNT-TSf con 100 ng de cada fragmento por

pocillo, ya que con esta mezcla se obtuvo el mayor valor de $\Delta OD^+/\Delta OD^-$, logrando una mejor discriminación entre sueros positivos y negativos. Por lo tanto, esta fue la condición establecida para evaluar los sueros de los binomios mamá-bebé mediante la detección de Ac IgG anti-TS en ensayos de ELISA indirecto.

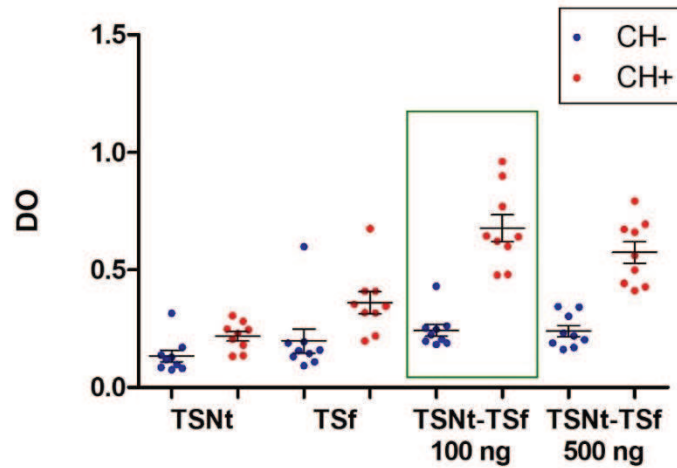


Figura 42: Determinación de Acs IgG contra *T. cruzi* en sueros del panel de crónicos utilizando como Ag TSNt y TSf. DO obtenidas con sueros CH+ (n=10) y CH- (n=10) del panel G frente a los Ags TSNt y TSf y frente a la mezcla TSNt-TSf en diferentes concentraciones. La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar (SD) para cada grupo de sueros.

Tabla 8: Valores de la relación $\Delta DO^+/\Delta DO^-$ obtenidos con diferentes composiciones del Ag TS (TSNt+TSf). Evaluadas frente a muestras Ch+ (n=9) y Ch- (n=9).

Composiciones de Ag	$\Delta DO^+/\Delta DO^-$
I: 500 ng TSNt	1,62
II: 500 ng TSf	1,83
III: 100 ng TSNt + 100 ng TSf	2,78
IV: 500 ng TSNt + 500 ng TSf	2,39

3.4.5.2 ELISA SAPA/TS

La evaluación de la estrategia ELISA SAPA/TS propuesta se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA indirecto para la detección de los niveles de Ac IgG anti-SAPA e IgG anti-TS en los binomios de sueros mamá-bebé.

Se ensayaron muestras binomiales de madres con infección crónica por *T. cruzi* (n=16) y de sus hijos Ch+ (MM BB+, n=5) y Ch- (MM BB-, n=11). Posteriormente, se calculó el $I_{SAPA/TS}$ para cada

binomio a partir del cociente de los valores de DO obtenidos para los Ac IgG anti-SAPA e IgG anti-TS (Figura 43 A).

La línea de corte establecida de acuerdo con el análisis de la curva ROC fue $LC=1,22$ (Figura 43 B). Según la hipótesis planteada, los resultados con un $I_{SAPA/TS} \geq 1,22$ corresponderían a casos de binomios de niños positivos (MM BB+) mientras que para los casos de niños negativos (MM BB-) los resultados deberían presentar un $I_{SAPA/TS} < 1,22$. Como se observa en la Figura 44, esta estrategia permitió clasificar correctamente como negativos a 10 de los 11 bebés de los binomios MM BB-, resultando en una especificidad del 90,9%. Se obtuvo una sensibilidad del 80,0%, clasificando correctamente como positivos a 4 de los 5 bebés de los binomios de MM BB+.

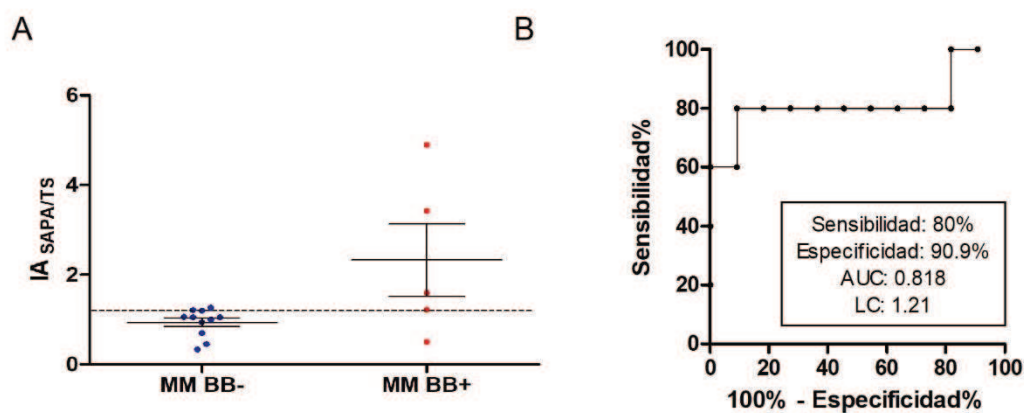


Figura 43: Determinación del $I_{SAPA/TS}$ de Acs IgG contra *T. cruzi* en muestras de binomios MM BB utilizando como Ag SAPA y TS. A) Distribución de valores del índice SAPA/TS y B) curva ROC, para el panel de binomios MM/BB- ($n=11$) y MM/BB+ ($n=5$). La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar SD para cada grupo de sueros y la línea discontinua indica la LC determinado por curva ROC.

3.4.5.3 Análisis de correlación de Ac MM BB:

Como criterio para analizar la validez del método antes descripto, se realizó un análisis de correlación de Ac MM BB anti los Ag TS y SAPA: se observa que los niveles de Acs IgG anti-TS de los BB no presentan correlación con los niveles de Acs IgG anti-TS de las MM. Este resultado indicaría que los Ac anti TS no serían un buen marcador del pasaje de anticuerpos IgG de las MM a los BB. Por su parte, los niveles obtenidos de Acs IgG anti-SAPA de los BB si presentan correlación con el nivel de Acs de sus respectivas MM, con una relación de transferencia del 47,0% (Figura 44).

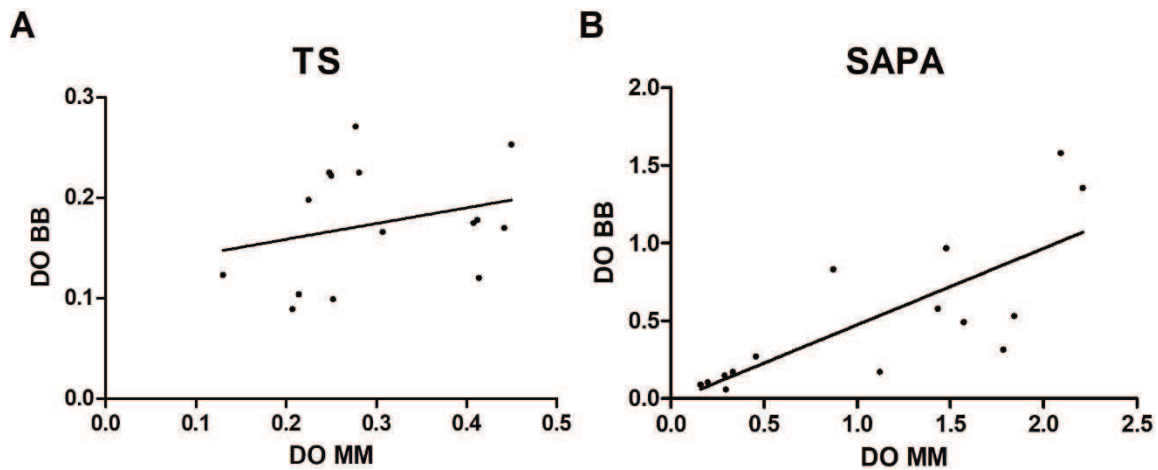


Figura 44: Correlación de los niveles de Ac IgG en sueros de MM y sueros de BB no reactivos con A) TS; correlación de Pearson $r=0,269$; $p=n.s.$ y B) SAPA; correlación de Pearson $r=0,7696$; $p=0,0008$.

3.4.6 Estrategia 2: ELISA de Avidéz

La segunda estrategia mencionada anteriormente, para lograr diagnosticar la infección aguda en bebés consistió en la detección de Acs IgG específicos anti-SAPA en el binomio MM y BB pero mediante ensayo de ELISA de Avidéz. La hipótesis planteada en este caso es que la madre con infección crónica presenta Ac IgG anti-SAPA de alta avidéz que transfiere a su hijo durante el embarazo; pero a su vez los bebés con infección aguda también presentarán Ac propios de baja avidéz producidos durante la infección reciente, resultando en una menor avidéz de Ac en comparación con un bebé no infectado. De esta manera, se espera que el cociente entre los IA% de las muestras de MM y sus BB permita determinar los casos de transmisión vertical. Se determinaron los valores de la relación entre los IA% de cada binomio mamá-bebé ($IA_{relación}$). Los resultados se muestran en la Figura 45.

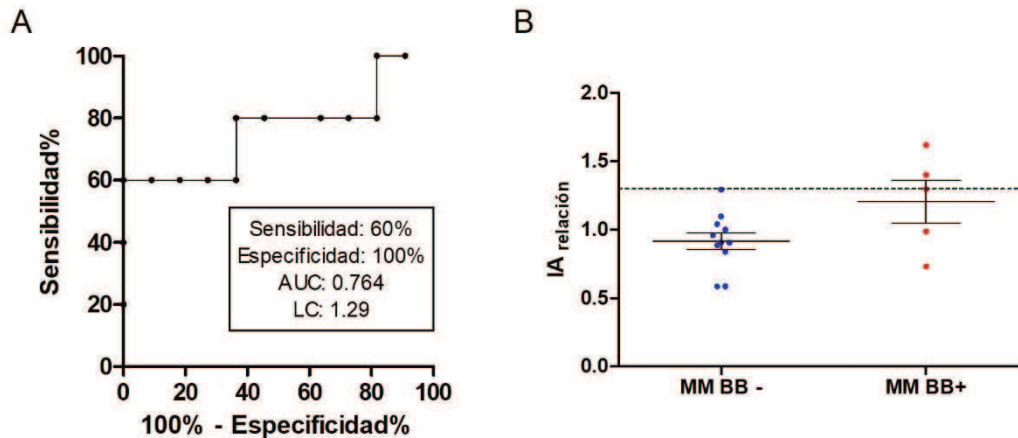


Figura 45: Determinación de la relación del IA de Acs IgG contra *T. cruzi* en los binomios MM BB utilizando como Ag SAPA. A) Curva ROC y B) distribución de valores de la relación del IA, obtenidos en sueros de los binomios MM BB- ($n=11$) y MM BB+ ($n=5$). La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar (SD) para cada grupo de sueros y la línea gris discontinua indica el valor de corte relativo determinado por curva ROC.

La línea de corte ($LC=1,29$) se estableció mediante análisis de curva ROC con valores óptimos de sensibilidad y especificidad para las muestras evaluadas (Figura 45 A) obteniendo un índice J de 0,600 y un AUC de 0,764. Por lo tanto, según la hipótesis planteada, los resultados del $IA_{relación} \geq 1,29$ corresponderían a casos de binomios MM BB+, mientras que para los casos de los binomios MM BB- los resultados deberían presentar un $IA_{relación} < 1,29$.

Como se observa en la Figura 45 B, todos los sueros de BB para los binomios MM BB-, fueron clasificados correctamente como negativos dando una especificidad del 100% y en cuanto a los binomios MM BB+, 3 de 5 sueros de BB fueron clasificados correctamente como positivos reflejándose en un valor de sensibilidad del 60%.

Bajo la misma hipótesis planteada, se analizaron los valores de IA% de los bebés, sin relacionarlos con las muestras de sus respectivas madres. A partir del análisis por curva ROC (Figura 46 A) se estableció una LC de 39,5%, obteniendo un índice J de 0,600 con un AUC de 0,791. Se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad de 60% y 100% respectivamente. En este caso los resultados del $IA\% < 39,5$ corresponderían a BB+, mientras que para los casos de BB- los resultados deberían presentar un $IA\% \geq 39,5$. Esto se vio reflejado en 3 de las 5 muestras de BB+ que fueron clasificados correctamente como positivos, mientras que todos los BB- resultaron correctamente clasificados como negativos (Figura 46 B).

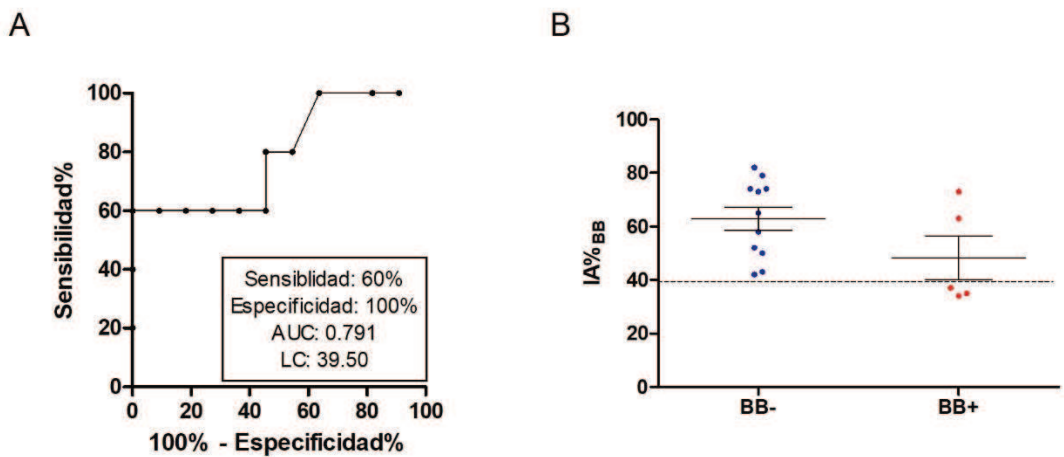


Figura 46: Determinación del Índice de Avidéz porcentual de Acs IgG anti-SAPA en sueros BB. A) Curva ROC y B) distribución de valores de la relación del IA%_{BB}, obtenidos en sueros de BB- (n=11) y BB+ (n=5). La línea de tendencia central muestra el valor medio con desvío estándar (SD) para cada grupo de sueros, y la línea discontinua indica el valor de corte relativo determinado por curva ROC.

3.4.7 Comparación de las estrategias de ELISA evaluadas

A modo de resumen, en la Tabla 9 se detallan los valores de Se, Es, AUC e índice J obtenidos para las estrategias de ELISA propuestas. Dentro de las dos estrategias propuestas evaluadas, el ELISA SAPA/TS presentó la mejor performance diagnóstica frente al panel de muestras estudiado, mostrando una sensibilidad de 80,0%, una especificidad de 90,9% y un buen rendimiento diagnóstico (AUC=0,818; J=0,710).

Tabla 9: Comparación de las performances diagnósticas de las estrategias evaluadas. 95% IC: intervalo de confianza de 95%.

	Se % (95% IC)	Es % (95% IC)	AUC	J
ELISA SAPA/TS	80,0 (28,36 - 99,49)	90,9 (58,72 - 99,77)	0,818	0,710
ELISA Avidéz IgG anti-SAPA	60,0 (14,66 - 94,73)	100 (71,51 - 100)	0,764	0,600

Analizando las estrategias evaluadas de acuerdo con el tiempo de la toma de la muestra de los BB, se observa que la estrategia 1, ELISA SAPA/TS (Figura 47 A), discrimina mejor positivos de negativos en los primeros meses de vida que la estrategia 2, ELISA Avidéz IgG anti-SAPA (Figura 47 B). Esto particularmente se observa en 2 casos. Uno en donde la muestra de suero del BB corresponden a menos de 1 un mes de vida y presenta un $I_{SAPA/TS}$ de 4,89 y un $IA_{relación}$ de 1,40. En el otro caso la muestra de suero del BB corresponde a 3 meses de vida y presenta un $I_{SAPA/TS}$ de 4,42 y un $IA_{relación}$ de 0,986.

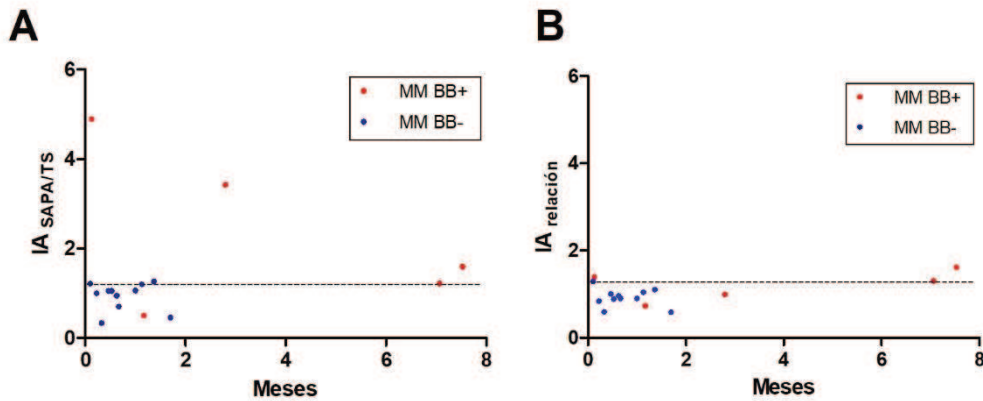


Figura 47: Correlación de las estrategias diagnosticas evaluadas en función del tiempo de la toma de muestra. A) Para el $I_{SAPA/TS}$, estrategia 1 y B) Para el $IA_{relación}$, estrategia 2. Se grafican los Meses correspondientes para la toma de muestra del BB del binomio en el eje X vs los puntos de valores obtenidos para cada estrategia en el eje Y. Con rojo se representan los sueros de los binomios para los BB+ y con azul los sueros de los binomios para los BB-. La línea discontinua indica el valor de corte relativo determinado.

3.5 Discusión

Durante la fase aguda de la infección de *T. cruzi* se expresa predominantemente el Ag SAPA, el cual está asociado con el estadio infectivo de tripomastigote (Affranchino et al., 1989). En este contexto, se ha propuesto el uso del Ag recombinante SAPA para la detección de Ac IgG específicos (ELISA-SAPA) en la determinación de la infección vertical en bebés de 3 meses de edad, debido a que los Ac anti-SAPA de transmisión materna desaparecen antes que los Ac contra epimastigotes empleados en la serología convencional (Russomando et al., 2010).

Debido a que en nuestra experiencia no hemos obtenido resultados que permitan clasificar a las infecciones agudas determinando anticuerpos anti-SAPA con las técnicas propuestas en la bibliografía (Mallimaci et al., 2010; Russomando et al., 2010), nos propusimos evaluar nuevas estrategias que permitan obtener un diagnóstico temprano de la infección vertical utilizando este antígeno de fase aguda.

En un principio se realizó el análisis de la secuencia de la proteína recombinante SAPAx4 utilizada (Camussone et al., 2009), la cual presenta 4 repeticiones de una secuencia de 12 aminoácidos. Esta presenta un 83% de identidad respecto a la reportada por Affranchino y col. (1989). De las 4 repeticiones, 1 repetición difiere en un aa en relación con los aa de la secuencia reportada (sustitución de H por L). Respecto a esta variante antigénica que expresa el Ag SAPAx4 utilizado, ha sido reportado que, para humanos, la zona más antigénica sería la comprendida entre los aa **SAHSTPSTP**, siendo **STPSTP** la zona más fuerte de reconocimiento (Alvarez et al., 2001). Coincidiendo con lo reportado, observamos que la predicción realizada en el servidor ABCpred ubica a la secuencia mencionada **STPSTP** y además a la secuencia **DSSAH**, como las regiones más antigénicas. Por otro lado, pudimos corroborar que la modificación del aa L por H no afectaría a la predicción de epítomos ya que los scores y las secuencias predichas son muy similares. De acuerdo con esto, podríamos sugerir que el reconocimiento de los sueros evaluados daría reactividad similar al utilizarse la secuencia SAPAx4 o SAPAx4 modificada.

A su vez, cabe mencionar que la secuencia SAPAx4, presenta una conservación con una identidad del 77.0% frente al análisis de secuencias en 50 cepas de *T. cruzi* tal como ha sido reportado (Majeau et al., 2021). Majeau (2021) sostiene que el Ag de referencia utilizado actualmente en serología es bastante diferente de muchas secuencias de otras cepas. Y que, si bien, la diversidad de secuencias del Ag SAPA es alta, no parece estar estructurada según el origen geográfico de las cepas o del UDT del parásito, y esta diversidad ha sido observada tanto para la región repetitiva de la proteína que se usa en las pruebas de diagnóstico como para la proteína de longitud completa. Por lo que en general, alude que al bajo nivel de conservación de la secuencia del Ag SAPA en los UDT de parásitos y la diversidad geográfica pueden explicar el rendimiento limitado de las pruebas basadas en estos Ag en América

Central y del Norte. Mas allá de dicho análisis, en este estudio hemos encontrado altos niveles de reactividad con este antígeno. Sin embargo, cabe destacar que las muestras provienen de individuos de nuestra región en la que predominan las variantes UDT V y UDT VI principalmente.

Una vez realizados los análisis bioinformáticos procedimos con la evaluación de los niveles de Ac IgG específicos empleando el Ag recombinante SAPA en muestras binomiales de madres seropositivas y sus correspondientes hijos (infectados o no infectados). En un estudio previo, la mayoría de las madres de niños infectados por *T. cruzi* no presentaban niveles detectables de Ac anti-SAPA (Reyes et al., 1990), mientras que otros autores han reportado que aproximadamente el 50% de las madres eran reactivas frente a la determinación de Ac IgG anti-SAPA (Mallimaci et al., 2010; Volta et al., 2015). En el presente trabajo se detectó Ac IgG anti-SAPA en el 72,7% de las madres seropositivas evaluadas. Además, mientras que los estudios que aplican ELISA-SAPA han reportado que los niveles de Ac anti-SAPA en los bebés infectados resultaron superiores que los de sus madres (Mallimaci et al., 2010; Volta et al., 2018), en este trabajo se encontró que la mayoría de las madres mostraron mayores niveles de Ac IgG anti-SAPA que sus hijos (infectados o no infectados).

Respecto a los niños, se detectaron Ac IgG anti-SAPA en el 71,4% de las muestras de bebés infectados (5/7) y en el 53,3% de las muestras de bebés negativos (8/15). Cabe mencionar que se ha reportado que no todos los individuos con infección aguda presentan niveles detectables de Ac IgG anti-SAPA. Tal es el caso de Brenière y col. (1997), quienes han descrito que observaron Ac anti-SAPA en el 80,8% de los pacientes evaluados en el estadio inicial de la infección (Brenière et al., 1997). Además, estudios anteriores que evaluaron pequeños grupos de casos agudos informaron porcentajes de reactividad que oscilaron entre el 60 y el 93% (Affranchino et al., 1989; Levin et al., 1991). A su vez, se ha descrito que los Ac anti-SAPA maternos desaparecen a partir de los 60 días desde el nacimiento, volviéndose indetectables luego de los 3 meses (Russomando et al., 2010). Esto indicaría que antes de los 60 días se encuentran presentes, en el bebé, anticuerpos anti-SAPA de la madre, lo que concuerda con nuestros resultados ya que la mayoría de las muestras de bebés no infectados con altos niveles de Ac IgG anti-SAPA fueron tomadas en un tiempo menor a 1 mes desde el nacimiento. Estos anticuerpos podrían por tanto atribuirse a la presencia de Ac transferidos de la madre al bebé. Además, los casos de niños no infectados que presentaron niveles indetectables de dichos Ac corresponden a muestras de más de 60 días. Por el contrario, los resultados obtenidos en muestras de niños infectados tomadas luego de 60 días desde el nacimiento mostraron niveles detectables de Ac IgG anti-SAPA.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, se evaluó, ahora en forma experimental, si las diferencias de reactividad obtenidas en los sueros de los binomios MM BB respecto a la información reportada en bibliografía podría asociarse a la secuencia corta de SAPA empleada en este trabajo. La mayoría de los trabajos emplean fragmentos SAPA de 12 y 13 repeticiones antigénicas (Balouz et al., 2015; Buscaglia et al., 1998; Mallimaci et al., 2010). Para tal fin, se evaluaron muestras

de los binomios MM BB mediante ensayos de ELISA indirecto para la detección de Ac IgG anti-SAPA utilizando como Ag de sensibilización SAPAx4 o SAPAx13. Dado que ambos Ag clasificaron de igual manera a los sueros evaluados y que, empleando SAPAx13, las madres también dieron niveles de IgG anti-SAPA mayores que los de sus bebés, se continuó trabajando con el Ag SAPAx4. Por lo cual, teniendo en cuenta que SAPAx4 y SAPAx13 presentan la misma variante de repeticiones, podemos sugerir que la diferencia de reactividad obtenida no se debe a la cantidad de repeticiones, si no, al hecho de utilizar solo una de las 4 variantes antigénicas que se utilizaron en trabajos previos llevados a cabo con la secuencia de Affranchino y col (1989).

Como se mencionó previamente, un alto nivel de Ac IgG anti-SAPA en muestras de bebés no es un indicador suficiente de infección vertical por *T. cruzi*, debido a la incapacidad para distinguir entre los Ac propios del bebé y los Ac maternos (Mallimaci et al., 2010). Sobre esta base, en este trabajo se ha propuesto evaluar dos estrategias diagnósticas diferentes basadas en la detección de Ac IgG específicos para el Ag SAPA que permitan determinar la infección vertical lo más tempranamente posible. Teniendo en cuenta que las estrategias de ELISA propuestas se basan en la detección de Ac específicos para el Ag SAPA en muestras binomiales mamá-bebé, solo se pudo trabajar con un panel reducido que incluyó muestras con niveles detectables de estos Ac para el binomio.

La primera estrategia propuesta para el diagnóstico de Chagas vertical, que hemos denominado ELISA SAPA/TS, consistió en ensayos de ELISA empleando como Ag SAPA y TS para determinar Ac IgG anti-SAPA y anti-TS en muestras binomiales madre-hijo. Bajo la hipótesis de que la proporción de Ac IgG maternos transferidos al niño en un determinado binomio es igual para todos los Ac de tipo IgG independientemente de la especificidad, se propuso determinar la relación ($I_{SAPA/TS}$) entre las proporciones transferidas de Ac IgG anti-SAPA y anti-TS para cada binomio. Los Ac IgG específicos para el Ag de fase crónica TS deberían ser producidos únicamente por la madre y se utilizan para estimar la tasa de transferencia de Ac maternos hacia el bebé, de manera de estandarizar la transferencia de los Ac IgG anti-SAPA de interés para cada binomio MM BB. Se espera que esta relación resulte mayor en los binomios MM BB+ con respecto a los binomios MM BB- debido a la producción propia de Ac IgG anti-SAPA por parte del niño en respuesta a la infección por *T. cruzi*.

La estrategia ELISA SAPA/TS permitió clasificar correctamente 4 de los 5 binomios MM BB+ y 10 de los 11 binomios MM BB-, resultando en una sensibilidad del 80% y una especificidad de 90,9%.

Como se indicó en la introducción, ensayos de evaluación de Ac neutralizantes de la TS indican que los mismos solo están presentes en una etapa avanzada de la infección. En este trabajo se determinó la presencia de Ac anti-TS totales, sin discriminar entre Ac neutralizantes y no neutralizantes. Se observó que los mismos están presentes en todas las muestras de fase crónica evaluadas, aunque en niveles bajos en relación con otros Ac específicos presentes en las personas con Chagas crónico. Al evaluar las muestras binomiales se obtuvieron bajos títulos de Ac IgG anti-TS, por lo que en muchos

casos la tasa de transferencia de estos Ac de la MM hacia el BB resulto casi nula. A su vez no hemos encontrado correlación entre los Acs IgG anti-TS de las MM y los BB lo cual podría deberse a la variabilidad obtenida en los resultados debido a los altos coeficientes de variación que presentan las DO en los rangos de señales bajas. Debido a estos resultados, este antígeno podría no ser el adecuado para estimar la tasa de transferencia de anticuerpos de MM a BB en todos los casos. Por eso, en próximos trabajos se sugiere evaluar Ac con otra especificidad que permitan obtener mayores señales de DO para el análisis de la transferencia de Ac de MM al BB. Estos anticuerpos podían ser hacia antígenos vacunales para los cuales se conoce que existe transferencia efectiva de anticuerpos en altos títulos.

En forma distinta que para los Ac anti-TS, los niveles de Acs IgG anti-SAPA de los BB se correlacionan con los niveles de Acs IgG de las MM y puede observarse un pasaje de Ac activo (inmunización pasiva) con un porcentaje de transferencia del 47%. Este porcentaje de transferencia es diferente a otros reportados para Ag vacunales (Palmeira et al., 2012), pero hay que tener en cuenta que los datos bibliográficos corresponden a la transferencia de madres hacia lactantes para el caso de vacunas, cuando en este caso estamos evaluando la transferencia de Acs maternos frente a una infección por *T. cruzi*.

Sugerimos entonces que, si bien la estrategia propuesta es promisoría, futuros trabajos se deberían realizar con nuevos Ags que permitan obtener mayor correlación entre los niveles de Ac IgG específicos de la MM y los del BB como son los vacunales. Hay que destacar que, si bien para el desarrollo de este trabajo hemos postulado que la proporción relativa de Ac IgG maternos, tanto anti-TS como anti-SAPA, transferidos al niño en un determinado binomio debería de ser un valor constante mientras el BB no produzca Ac propios, este postulado no se cumplió en la mayoría de los casos evaluados. Analizando la bibliografía se ha observado esta misma situación en relación con anticuerpos desarrollados contra diferentes Ag vacunales, los cuales no se transfieren de manera homogénea de MM a BB. Por ejemplo, se ha encontrado que las tasas de transferencia de IgG anti-toxoide tetánico, LPS O111 de *E. coli* enteropatógena y polisacárido Hib son de 162%, 90,0% y 88,5%, respectivamente (Palmeira et al., 2012).

Para próximos estudios, se sugiere que el porcentaje de transferencia de los Ac específicos utilizados como marcador de transferencia debería ser similar al porcentaje que se obtiene para los Ac anti-SAPA cuando los BB no están infectados. Se sugiere la posibilidad de utilizar un Ag de vacunas que se apliquen a las madres ya que se ha reportado, para diferentes Ag vacunales, que los niveles de Ac IgG fetales están correlacionados con los niveles de Ac IgG maternos (Palmeira et al., 2012; Suzuki, 1988).

Los *test* de avidéz de Ac IgG se han descrito como una herramienta para diferenciar entre una infección adquirida recientemente si la IgG es de baja avidéz y una infección distante en el tiempo si la

IgG es de alta avidez. Este criterio se ha evaluado y aplicado en la detección de infecciones primarias recientes por *Toxoplasma gondii* (Hedman et al., 1989; Teimouri et al., 2020). Sobre esta base se propuso una segunda estrategia para el diagnóstico de Chagas vertical, denominada ELISA Avidez IgG anti-SAPA. Este método consistió en un ELISA de avidez para determinar la relación entre el IA de los Ac IgG anti-SAPA de las muestras binomiales ($IA_{relación}$). Bajo la hipótesis de que las madres con infección crónica presentan Ac IgG anti-SAPA de alta avidez, mientras que los bebés con infección aguda desarrollan Ac IgG anti-SAPA de baja avidez, se esperaba observar un comportamiento diagnóstico que permita discriminar entre el $IA_{relación}$ de los binomios MM BB+ y el de los binomios MM BB-.

La estrategia ELISA Avidez IgG anti-SAPA permitió clasificar correctamente 3 de los 5 binomios MM BB+ y todos los binomios MM BB-, resultando en un 60% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Otra estrategia que se evaluó fue analizar los resultados obtenidos del IA% solo para las muestras de los bebés, sin relacionarlas con las muestras de las madres. La evaluación de las muestras únicamente de los bebés resultaría en una mayor practicidad ya que permite independizarse de la muestra binomial, requiere menor tiempo y menores costos operacionales. Con este enfoque se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la performance diagnóstica que utilizando el binomio. Por lo tanto, el análisis del IA% de las muestras de bebés sería un criterio útil para diferenciar entre BB+ y BB-. Según los resultados obtenidos, los bebés que presenten IA% menor a 39.5% podrían considerarse infectados, mientras que los que presenten mayor IA podrían considerarse no infectados. En la bibliografía se ha sugerido al *test* de avidez de Ac IgG como una herramienta efectiva para discriminar entre muestras de personas con la enfermedad de Toxoplasmosis en etapa aguda de la etapa crónica, con 100% de sensibilidad y 92,7% de especificidad (Candolfi et al., 2007). En ese caso, la determinación se realiza en poblaciones de Ac de alta avidez o de baja avidez según el estadio de la infección. Sin embargo, el ELISA de avidez IgG anti-SAPA mostró una sensibilidad notablemente menor a los ELISA de avidez reportados para otras infecciones. Este resultado podría deberse a que se pretende determinar las diferencias de avidez en una población heterogénea compuesta por Ac IgG de la madre y del bebé, lo cual complejiza la capacidad de discriminación de la prueba de avidez.

Como conclusión se puede decir que ambas estrategias, ELISA avidez SAPA y ELISA SAPA/TS, evaluadas con un pequeño número de muestras de binomios mamá-bebé, fueron pruebas de concepto presentando una performance diagnóstica con un 60% y 80% de sensibilidad respectivamente. A su vez, el ELISA avidez SAPA evaluado frente a muestras de solo bebés presentó el mismo rendimiento diagnóstico que el cociente de los índices de avidez del BB versus MM. Este resultado indica que no sería necesario usar el binomio para el ELISA de avidez, lo que disminuye la complejidad del diagnóstico. Si bien es necesario aumentar el tamaño muestral y teniendo en cuenta que la técnica

de ELISA a veces resultó en un menor rendimiento diagnóstico comparado a lo reportado para la enfermedad de Toxoplasmosis, estos resultados sugieren que ambas técnicas representan una estrategia prometedora para la detección de la ECV en neonatos. Cabe destacar que, si bien las estrategias de ELISA propuestas mostraron potencialidad para el diagnóstico, tienen ciertas limitaciones, como la necesidad de disponer de las muestras de mamá y de bebé y que solo pueden ser aplicadas cuando los niveles de Ac anti-SAPA son detectables. Estos métodos podrían complementar la determinación de IgM específica que, entre los métodos desarrollados en esta Tesis, ha permitido el mejor desempeño. En caso de obtener resultados coincidentes entre la determinación de IgM y alguna de las versiones del ELISA SAPA, la determinación podría ser confirmatoria. Dicho algoritmo debería validarse con un mayor número de casos.

**4. Capítulo 4:
Desarrollo de un ensayo de IFL para la detección de IgM
específica frente a los antígenos de *T. cruzi***



4.1 Introducción

En el desarrollo de plataformas diagnósticas, los ELISA son ampliamente utilizados por la performance diagnóstica que presentan a la hora de evaluar rendimientos diagnósticos de sensibilidad y especificidad. Pero a su vez, los mismos presentan restricciones metodológicas para reducir los tiempos de reacción y los pasos de realización, los cuales son aspectos críticos cuando se buscan desarrollar pruebas en el punto de atención al paciente (*Point-of-care testing*, POCT).

4.1.1 Dispositivos de diagnóstico POCT

Los dispositivos de diagnóstico POCT, no solamente están pensados para el caso de poblaciones aisladas, sino también para emergencias, salas de cirugía, puntos de atención y cuidado personal (Chin et al., 2006; Walt, 2005; Yager et al., 2006). De particular interés para esta Tesis son las plataformas microfluídicas basadas en papel y otros derivados de la celulosa, que es un campo de investigación emergente desde el año 2008 aproximadamente (Berli, 2016; Martínez et al., 2008). Estos soportes son muy estudiados debido a varias ventajas que ofrecen: son de gran disponibilidad y bajo costo, son autónomos pues permiten el transporte de fluidos mediante capilaridad, son compatibles con los sistemas biológicos y permiten la adsorción/desorción de proteínas para reacciones enzimáticas y/o Ag-Ac.

En 2006, la OMS promulgó directivas (WHO, 2006) para desarrollar tecnologías de diagnóstico dirigidas al control y tratamiento en sectores de bajos recursos, que son a su vez las poblaciones mayormente afectadas por las patologías infecciosas. En resumen, el documento instruye que el *test* de diagnóstico ideal debe ser asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipo y entregable a los usuarios finales (ASSURED, por sus requisitos en inglés). En efecto el papel cumple con todos estos requisitos, y agrega otros como las facilidades de manipulación y de desecho. Dentro de la gran variedad de dispositivos de microfluídica basados en papel, los IFL tienen una importante demanda para la detección de diversos indicadores bioquímicos en el campo de la salud humana y animal (R. C. Wong, 2009).

4.1.2 Inmunoensayos de flujo lateral (IFL)

Los *test* de IFL son un tipo de pruebas de diagnóstico rápido (TDR) o pruebas POCT. Estos *test* presentan numerosas características que los vuelven particularmente útiles para su aplicación en el punto de atención del paciente o de manera ambulatoria: no requieren equipos ni infraestructura, pueden realizarse por personal no entrenado de manera simple y rápida (determinaciones en un único paso), tienen dimensiones portables y formato económico, son amigable con el medioambiente (basados en papel), son estables bajo diferentes condiciones ambientales por lo que son fáciles de conservar, entre otras (O'Farrell, 2013; Sajid, 2015).

El principio de un ensayo IFL consiste en la migración por capilaridad, a través de distintos materiales porosos de una muestra líquida conteniendo el analito de interés. En cada uno de los materiales hay moléculas que pueden interactuar con el analito. Una tira de prueba de IFL consiste en cuatro membranas superpuestas que se montan sobre un soporte plástico: *pad* de muestra, *pad* de conjugado, membrana de reacción y *pad* de absorción (Figura 48).

El funcionamiento del IFL comienza con la adición de la muestra en el *pad* de muestra, la cual migra por capilaridad a lo largo de la matriz de ensayo. Luego atraviesa el *pad* de conjugado, donde se encuentra el sistema de marcación compuesto generalmente por nanopartículas de oro coloidal (GNPs) conjugadas a una biomolécula que reconoce al analito de interés. A medida que atraviesa el *pad* de reacción, el analito marcado es retenido sobre la línea de *test* (LT) donde se encuentra inmovilizada una biomolécula específica para la detección del mismo. Por otro lado, en la línea control (LC) se inmoviliza una biomolécula capaz de reconocer al sistema de marcación que retiene el exceso de conjugado, actuando como un control interno del ensayo. De esta manera, el revelado de la LT y la LC, indica un resultado positivo del *test* mientras que el revelado de únicamente la LC corresponde a un resultado negativo de la prueba. El *pad* absorbente cumple la función de absorber el exceso de muestra y reactivos, manteniendo el flujo de la muestra a través de la matriz de ensayo (Koczula & Gallotta, 2016; G. Zhang et al., 2009).

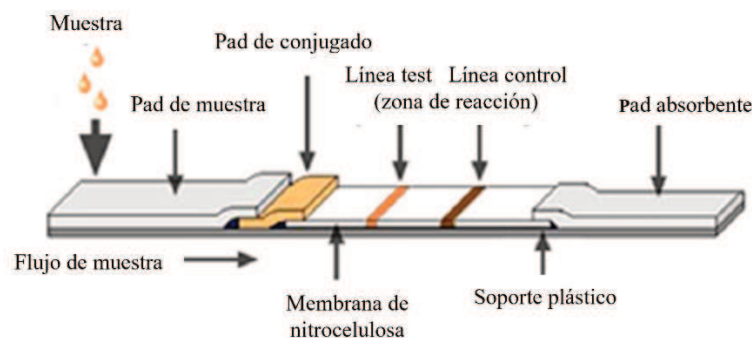


Figura 48: Diseño típico de una tira de IFL. Figura adaptada de Koczula y Gallotta (2016).

4.1.3 IFL para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Actualmente, existen varios TDRs comerciales para la detección de infecciones crónicas por *T. cruzi*. Algunos han sido evaluados y comparados en distintos trabajos, mostrando ser altamente sensibles y específicos (Lozano et al., 2019; Sánchez-Camargo et al., 2014). Sin embargo, no existen TDRs para la detección de la fase aguda de la infección. La disponibilidad de una plataforma de IFL para el diagnóstico de transmisión vertical de *T. cruzi* representaría una valiosa herramienta, con resultados inmediatos y de fácil adaptabilidad para uso en establecimientos de atención primaria de

salud y hospitales públicos, lo que incrementaría la detección de los casos positivos y la administración temprana del tratamiento, etapa en que su efectividad está asegurada.

4.1.4 *Anticuerpos IgM presentes en muestra de cordón umbilical y bebé*

La presencia de Ac de tipo IgM en la sangre del cordón umbilical o neonatal, suele ser un fuerte indicio de infección vertical ya que mientras que los Ac IgG de la madre se transfieren al bebé, no lo hacen los Ac IgM. Por lo tanto, las poblaciones de IgM en la sangre del cordón umbilical son propios del bebé (Xia & Gildersleeve, 2019).

A su vez, cabe destacar que existe diferencia entre la composición de las muestras provenientes de sangre del cordón umbilical y la del bebé. Por eso es importante discernir con qué muestra se realiza el diagnóstico de IgM específica. En el caso de sangre de cordón, es posible obtener contaminación de sangre materna en las muestras provenientes de cordón umbilical, ya que la variabilidad de la toma de muestra es dependiente del operador. Es imprescindible realizar la toma de muestra de arterias umbilicales para asegurarse que el flujo de sangre sea el correspondiente al bebé, y no de las venas umbilicales, pertenecientes a la mama.

Estudios previos han informado un nivel normal de Ac IgM en suero de cordón al momento del parto de aproximadamente entre 11-16 mg/dL (Miller et al., 1969; Stiehm & Fudenberg, 1966; Vick et al., 1995). A su vez, la concentración sérica promedio de IgM en recién nacidos reportada ha sido alrededor de 10-19,5 mg/dL (Aksu et al., 2006; Alkan Ozdemir et al., 2016). Estos niveles de IgM fetal corresponden aproximadamente al 10% de los niveles presentes en adultos y recién entre el primer y segundo año de edad alcanzan los niveles del adulto (Alkan Ozdemir et al., 2016). Debe considerarse que al no producirse el transporte materno-fetal de Ac de tipo IgM, las concentraciones elevadas (>20 mg/dL) de IgM en el feto o el recién nacido pueden sugerir una infección intrauterina o estimulación inmunológica (Blankenship et al., 1969). Si bien los niveles totales de IgM en cordón o sangre son similares, no hay información sobre la correlación de niveles de anticuerpos específicos entre esos dos compartimientos. Por lo tanto, la utilidad de la detección de IgM específica en estos distintos fluidos debe considerarse por separado.

En cuanto a la infección congénita por *T. cruzi* si bien ha sido descripta la presencia de Ac de tipo IgM en muestras provenientes de suero de bebé o cordón umbilical (Castro-Sesquen et al., 2020; Noazin et al., 2018; Umezawa et al., 1996), estas pruebas no han realizado la detección de este tipo de Ac mediante IFL como se mencionaba anteriormente.

4.2 Objetivos del capítulo 4

En base a lo expuesto, en el presente capítulo se describe la síntesis de partículas de oro para ser utilizadas en la conjugación de antígeno y/o anticuerpo. Con las mismas se diseñaron y evaluaron dos estrategias de inmunoensayos de flujo lateral para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas vertical mediante la detección de Ac de tipo IgM.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Panel de suero IFL:

Para la evaluación de Ac anti-IgM específicos de *T. cruzi* mediante IFL, se obtuvieron muestras de suero de neonatos y niños pequeños que asistieron a sus visitas de control regulares al Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" (Buenos Aires, Argentina) y muestras de suero perteneciente a cordón umbilical de bebés provenientes del Laboratorio de Patología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta (Salta, Argentina).

Las muestras se clasificaron de la siguiente manera:

- BB+: conformado por sueros de hijos de madres Ch+ que presentaron MH+ o MH- con PCR positivas, clasificando a los sueros como Ch+; muestras obtenidas dentro de los primeros 15 días después del nacimiento.
- Cordón BB+: conformado por sueros provenientes de muestras de sangre de cordón umbilical de bebés, hijos de madres Ch+. Estas muestras fueron previamente clasificadas mediante PCR como positivas (n=8) para el diagnóstico de Chagas vertical.
- Cordón BB-: conformado por sueros de muestras proveniente de sangre de cordón umbilical de bebés, hijos de madres Ch+. Estas muestras fueron previamente clasificadas mediante PCR como negativas (n=4) para el diagnóstico de Chagas vertical.
- Controles negativos (CN): conformado por sueros proveniente de cordón umbilical de bebés, hijos de madres Ch-, clasificadas como negativas (n=4).

En la Figura 49 se describe la cantidad de muestras que conformaron cada grupo.

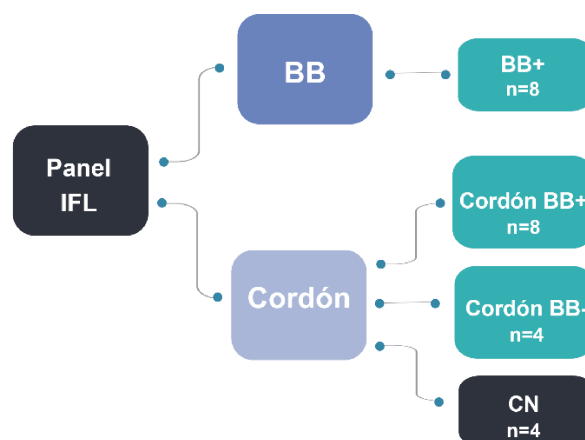


Figura 49: Panel de sueros utilizados para IFL. Conformado por sueros pertenecientes a muestras de bebé y cordón umbilical. Clasificados como BB+ para Ch+ (n=8), cordón BB+ para Ch+ (n=8), cordón BB- para Ch- (n=4) y CN para Ch- (n=4).

Se destaca que los restos de muestras de sangre empleadas en este trabajo se obtuvieron en el marco de los controles clínicos y bioquímicos habituales durante el seguimiento de los niños, conservados con codificación y protección adecuada de los datos personales.

El protocolo de estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la FBCB-UNL (CE2020-58).

4.3.1.1 Pools de muestras positivas y negativas:

Para optimizar el *test* de LFA se utilizaron pools de sueros, los cuales se conformaron, a partir de las muestras descriptas anteriormente, de la siguiente manera:

- Pool Ch+: conformado por muestras perteneciente a los grupos BB+ y cordón BB+.
- Pool Ch-: conformado por muestras pertenecientes al grupo CN.

4.3.2 Síntesis de partículas de oro coloidal (GNPs)

Se sintetizaron GNPs siguiendo un protocolo de reducción de una sal de oro (ácido cloroaurico, HAuCl_4) con citrato trisódico reportado en la bibliografía (G. Hermanson, 2013). En primer lugar, se calentó agua miliQ en placa calefactora con agitación magnética hasta ebullición homogénea, seguido del agregado de una solución de oro 50 mg/mL ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) y de una solución de citrato de sodio 50 mg/mL ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, Anedra), manteniendo una proporción de 400 μL de oro y 652 μL de citrato para un volumen final de 50 mL con agua miliQ. Luego del viraje de color de la solución a azul y posteriormente a rojo-fucsia, lo cual indica la formación de las GNPs, se continuó calentando por 30 minutos.

El tamaño y la morfología de las partículas y la homogeneidad de la solución obtenida se evaluaron mediante Espectroscopía UV/Vis, Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). Las determinaciones por TEM y DLS se realizaron mediante un servicio de terceros de INTEC-CONICET-UNL.

3.5.2. Preparación del Ac anti-IgM humana conjugado a GNPs (*anti-IgM_{hu}/GNPs*)

La conjugación del Ac anti-IgM humana hecho en cabra ($\text{anti-IgM}_{\text{hu}}$, Abcam) se llevó a cabo siguiendo un protocolo de adsorción pasiva previamente descrito (G. Zhang et al., 2009).

Para tal fin, previamente el Ac anti-IgM_{hu} (1 mg/ml) se dializó contra *buffer* PBS1X (pH 7,4). Luego, la relación óptima de Ac y GNPs a utilizar en la conjugación se determinó por titulación. Se prepararon diluciones seriadas del Ac anti-IgM_{hu} en *buffer* borato 20 mM (pH 8, 9 y 10) y fosfato 20 mM (pH 5, 6, 7), en los pocillos de una microplaca de fondo en U (12,5 μL de cada dilución) y se incubaron con 125 μL de la solución de GNPs, durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, se

adicionó 10 μ L de una solución de NaCl 10% en cada pocillo. La cantidad óptima de los reactivos para la conjugación se determinó como la mayor dilución de Ac a la cual las GNPs permanecen estables (color rosa) y no son inestabilizadas (color celeste) tras el agregado de NaCl.

Luego, se preparó un lote de 50 ml de conjugado, de acuerdo con el *buffer*, pH y dilución de Ac elegido de la titulación. La solución de GNPs se mezcló con la solución de Ac anti-IgM_{hu} preparada en *buffer* borato (pH 9) y se incubó por 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. Luego, se procedió con el bloqueo de los sitios residuales de las GNPs a fines de reducir las interacciones inespecíficas y mantener la estabilidad de la solución coloidal, mediante la incubación por 30 min con una solución de BSA en una concentración final del 1%. El exceso de proteínas fue removido por centrifugación a 4000 xg durante 30 min y, finalmente, el conjugado anti-IgM_{hu}/GNPs fue resuspendido en *buffer* de conjugado, llevándose a concentración final de 5% Sacarosa, 0,6 M de NaCl, 0,2% Tween 20 y 0,1 % azida y conservándose posteriormente a 4°C.

La conjugación fue monitoreada por Espectroscopía UV/Vis, midiendo los espectros de absorción al inicio y al final de la reacción. Se incluyeron como controles los espectros de la solución de las GNPs y de la solución del Ac anti-IgM_{hu}.

4.3.3 Preparación del Ag CP4 conjugado a GNPs (CP4/GNPs) y del Ac IgG de conejo conjugado a GNPs (IgG_{con}/GNPs)

Se empleó por un lado el Ag CP4 previamente dializado contra *buffer* PBS 1X (pH 7,4) llevado a una concentración de 0,75 mg/ml. Por otro lado, se precisó de un Ac de conejo (IgG_{con}, Ac anti-IgG bovino hecho en conejo, Sigma, C=7,5 mg/ml), dializado previamente contra *buffer* PBS 1X (pH 7,4). Luego, se tituló por separado siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Se seleccionó el *buffer*, pH y la dilución de CP4 y del Ac IgG_{con} a la cual resultaron más estables los conjugados obtenidos y se preparó un lote de 50 ml de cada conjugado y se conservaron a 4°C.

4.3.4 Ensamblado de la matriz de ensayo de IFL

Las membranas que conforman los *pads* requeridos para el armado de la IFLs fueron adquiridas comercialmente (GE, Healthcare, Life Sciences). A continuación, se mencionan las descripciones de los *pads* conformados por las membranas utilizadas:

- *Pad* de reacción: se utiliza membrana de nitrocelulosa (NC) Whatman FF120HP, es una membrana para usar con la mayoría de los tipos de muestra, de material polyester con una porosidad: 66-84%. Tiene un espesor de 200 μ m y el flujo capilar recorre 4 cm entre 90 y 150 segundos. El tamaño de este *pad* es de 2,5 cm de alto x 0,5 cm de ancho.
- *Pad* de muestra: de papel de filtro CF3 Whatman (papel de celulosa). Tamaño 1,0 cm x 0,5 cm.
- *Pad* absorbente: de papel de filtro CF3 Whatman (papel de celulosa). Tamaño de 2,2 cm x 0,5 cm.

- *Pad* de conjugado: membrana de fibra de vidrio Standard 17 Whatman. Tamaño de 1,2 x 0,5 cm.

El acondicionamiento de cada una de las membranas y el ensamblado de la matriz de ensayo se realizó de acuerdo a un proceso por lotes, siguiendo los protocolos ampliamente descritos (Koczula & Gallotta, 2016; G. Zhang et al., 2009).

Los *pads* de muestra fueron impregnados con solución *buffer* de acondicionamiento correspondiente (ver Anexo) y secados en estufa de aire forzado a 50°C durante 30 min o hasta secado completo. Luego los *pads* de conjugado se impregnaron con:

- 10 µL del conjugado anti-IgMhu/GNPs.
- 20 µL del conjugado CP4/GNPs y conjugado IgGcon/GNPs en proporción 2:1.

Posteriormente se secaron en estufa de la misma manera que se mencionó anteriormente.

El ensamblado de la tira reactiva (representada en la Figura 50) se realizó en una tarjeta laminada con revestimientos desprendibles (Millipore) sobre la cual se pegaron los *pads* en las posiciones correspondientes, considerando 2 mm de superposición entre *pads* contiguos. En la membrana de nitrocelulosa se sembraron las proteínas que constituyen las zonas de reacción. Debido a que se empleó una micropipeta para dispensar 1 µL de cada solución, a partir de este momento nos referimos a zona de reacción en lugar de línea, designada como zona de control (ZC) y de *test* (ZT).

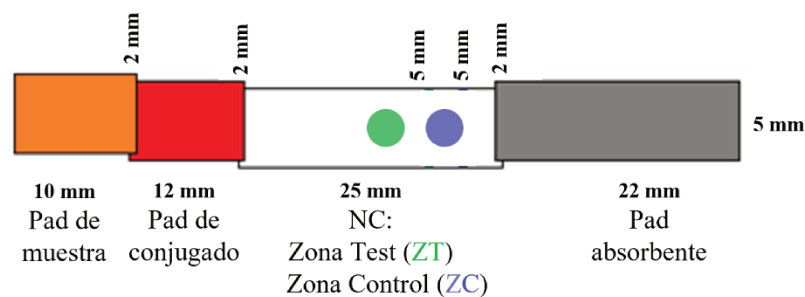


Figura 50: Diagrama esquemático de la tira reactiva para el ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral. Pads que la componen con sus respectivas medidas.

Para el diagnóstico de la infección vertical donde el analito a determinar en ambos *test* es el Ac IgM humana anti-*T. cruzi*, se propusieron dos estrategias de IFL, aquí denominadas IFL1 e IFL 2. En ambos formatos la ZT y la ZC se realizaron a una distancia de 1,5 cm y 2 cm del extremo inferior del *pad* de reacción, respectivamente. Un volumen final de 100 µL de *buffer* de muestra, en el que previamente se incorporó la muestra en una dilución 1 en 12, fueron dispensados sobre el *pad* de muestra. El resultado se consideró positivo denotado por la aparición de color rojo en las regiones de la ZT y la ZC después de 15 minutos y negativo por la aparición de solo la región de la ZC.

4.3.5 IFL: estrategia 1

Para llevar a cabo esta estrategia, la membrana de NC se sensibilizó con el Ac anti-IgG de cabra, hecho en conejo conjugado a FITC (anti-IgG_{ca}, Sigma) diluido en PBS 1X (0,453 µg/µL) para realizar la sensibilización en la ZC. En ZT se inmovilizó el Ag CP4 (0,64 µg/µL) previamente dializado contra *buffer* PBS 1X. Finalmente, las tiras se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

La estrategia 1 implica la marcación de todos los Ac IgM presentes en la muestra empleando el conjugado anti-IgM_{hu}/GNPs. Luego, los Ac IgM específicos para el Ag CP4 son retenidos sobre la ZT y el exceso de conjugado es capturado por los Ac anti-IgG_{ca} en la ZC, capaz de reconocer al anti-IgM_{hu}, actuando como control interno del funcionamiento de la prueba. De esta manera, el revelado de la ZT y la ZC indica un resultado positivo de la prueba, mientras que el revelado únicamente de la ZC indica un resultado negativo (Figura 51).

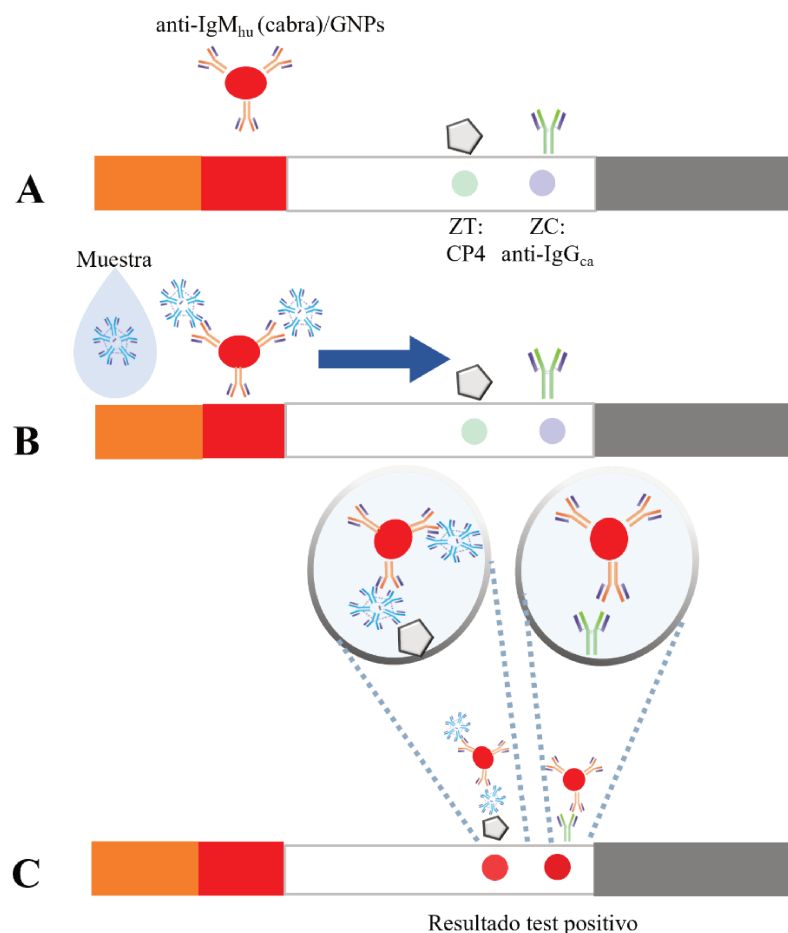


Figura 51: Esquema del diseño de la matriz de ensayo del test IFL. Estrategia 1. A) Se observa el conjugado anti-IgM_{hu} (cabra)/GNPs así como también el Ag utilizado en la ZT y el Ac utilizado en la LC. B) Frente al agregado de la muestra, la misma migra por flujo lateral y los Acs IgM se unen al conjugado anti-IgM_{hu}/GNPs. C) Resultado test positivo: el complejo anti-IgM_{hu}/GNPs-IgM migra hasta interactuar específicamente en la ZT con el Ag CP4, mientras el exceso de conjugado migra hasta interactuar en la ZC con el anti-IgG_{ca}.

El diseño se evaluó frente a las muestras pool Ch+ y pool Ch-.

4.3.6 IFL: estrategia 2

Para llevar a cabo esta estrategia, se inmovilizó en la ZT el Ac anti-IgM humano hecho en conejo (anti-IgM_{hu}, Dako) diluido en *buffer* PBS 1X (2,07 µg/µL). En la ZC, como control del ensayo, se inmovilizó el Ac anti-IgG de conejo (0,10 µg/µL) hecho en ratón (anti-IgG_{con}, Sigma). Finalmente, las tiras se dejaron secar completamente a temperatura ambiente.

La estrategia 2 implica la marcación de todos los Ac anti-CP4 presentes en la muestra empleando el conjugado CP4/GNPs. Luego, los Ac anti-CP4 específicos para IgM son retenidos sobre la ZT. Por su parte, el conjugado IgG_{con}/GNPs es capturado por los Ac anti-IgG_{con} en la ZC, actuando como control interno del funcionamiento de la prueba. De esta manera, el revelado de la ZT y la ZC indica un resultado positivo de la prueba, mientras que el revelado únicamente de la ZC indica un resultado negativo (Figura 52).

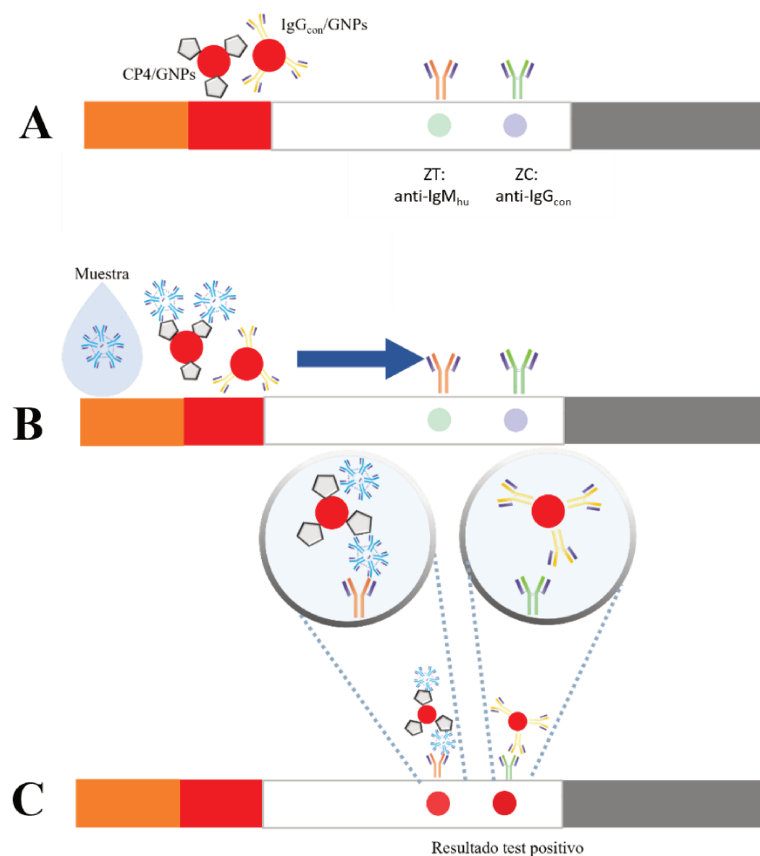


Figura 52: Diagrama esquemático del IFL estrategia 2 A.) Se observa el conjugado CP4/GNPs y el conjugado IgG_{con}/GNPs, así como también los Ac utilizados en las ZT y ZC. B.) Frente al agregado de la muestra, la misma migra por flujo lateral y los Acs específicos se unen al conjugado CP4/GNPs. C.) Resultado test positivo: el complejo CP4/GNPs-Ac específico migra hasta interactuar en la zona ZT con el Ac anti-IgM_{hu}, mientras que el conjugado IgG_{con}/GNPs migra hasta interactuar en la zona ZC con el Ac anti-IgG_{con}.

El diseño se evaluó frente a las muestras pool Ch+ y pool Ch-. Una vez optimizado, se lo evaluó frente al panel de sueros IFL.

4.4 Resultados

4.4.1 Síntesis de las GNPs

En primer lugar, se sintetizaron GNPs mediante un protocolo de reducción de una sal de oro (HAuCl_4) con citrato trisódico. El tamaño y la morfología de las GNPs obtenidas se evaluaron por Espectroscopía UV/Vis, TEM y DLS. Como se observa en la Figura 53, se obtuvo una solución de un color rojo intenso, con un pico de absorbancia correspondiente a $\lambda=522$ nm. Los resultados de las técnicas empleadas indican que se obtuvieron partículas de aproximadamente 24 nm de diámetro.

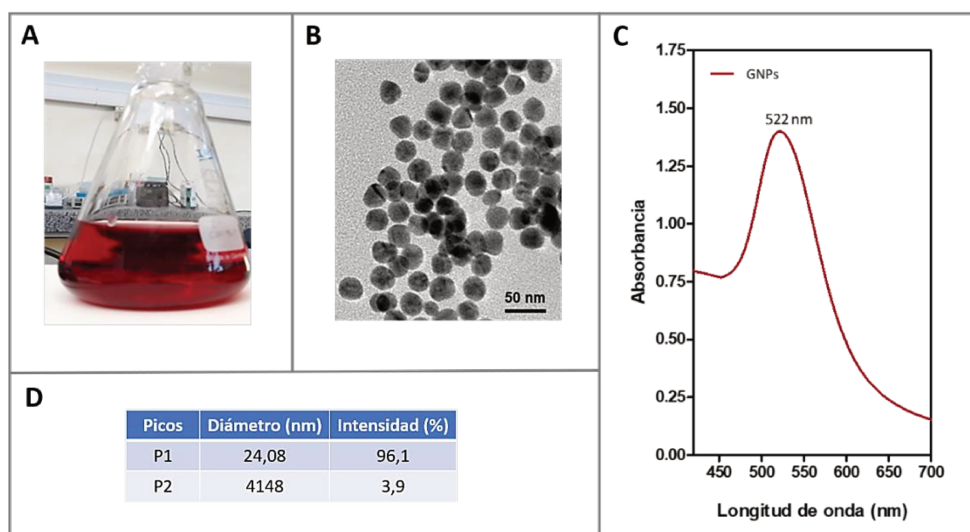


Figura 53: Evaluación de las GNPs obtenidas. A) Fotografía de la solución de GNPs; B) Imagen TEM; C) Espectro UV/Vis; D) Resultados de la determinación por DLS.

4.4.2 Conjugado anti-IgM_{hu}/GNPs

Se obtuvo uno de los sistemas de marcación a utilizar en el *test*, mediante la conjugación del Ac de cabra anti-IgM_{hu} y las GNPs (anti-IgM_{hu}/GNPs) empleando un protocolo de adsorción pasiva. La relación óptima de cantidades de los reactivos a conjugar se determinó mediante la titulación de diluciones seriadas del Ac en *buffer* borato y fosfato 20 mM con la solución de GNPs. Como se observa en la Figura 54 A, la dilución seleccionada del Ac anti-IgM_{hu} (dilución 1/16) corresponde a la mayor dilución de Ac a la cual las GNPs permanecen estables (color rosa) y no son desestabilizadas frente al agregado de NaCl al 10% (color celeste).

De acuerdo con las condiciones óptimas seleccionadas, se conjugaron 50 mL de la solución de GNPs con 5 mL del Ac anti-IgM_{hu} diluido previamente en *buffer* borato 20 mM (pH 8). La mezcla se incubó por 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. La conjugación fue monitoreada por

Espectroscopía UV/Vis, midiendo los espectros de absorbancia al inicio (t_0) y al final (t_{30}) de la reacción (Figura 54 B). Se incluyeron como controles los espectros de la solución de GNPs y de la solución de anti-IgM_{hu}. Los resultados al final de la reacción de conjugación (t_{30}) mostraron una disminución de la absorbancia y un desplazamiento de la λ ($\Delta\lambda=11$ nm) correspondiente al pico de absorbancia del conjugado anti-IgM_{hu}/GNPs. Estos cambios son característicos de la conjugación.

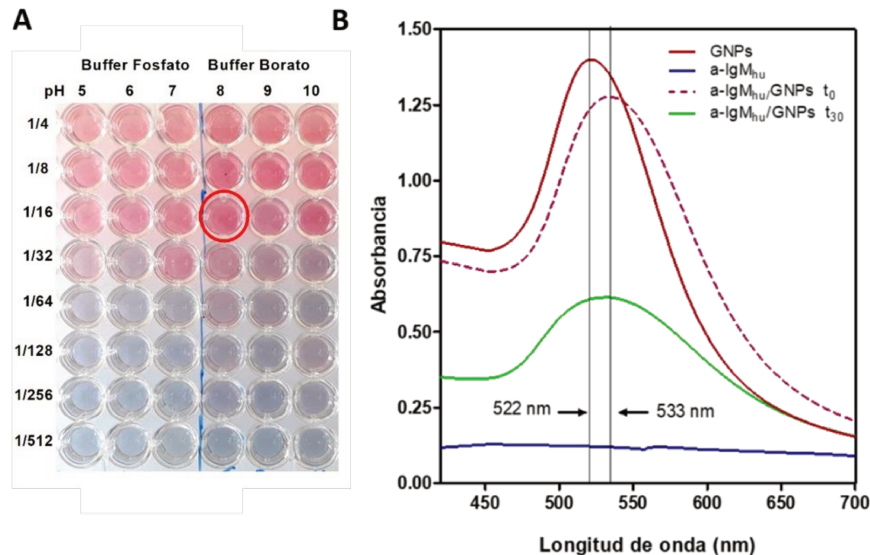


Figura 54: Conjugación de GNPs con el Ac anti-IgM_{hu}. A) Titulación de GNPs con anti-IgM_{hu}. Resultó estable en todos los pHs evaluados. Seleccionamos el Buffer Borato de Sodio 20 mM a pH 8 y Ac Dil 1/16 (Conc 0,0375 mg/ml). B) Espectros de absorbancia para GNPs, anti-IgM_{hu} y anti-IgM_{hu}/GNPs.

4.4.3 Conjugado IgG_{con}/GNPs

Se obtuvo el sistema de marcación a utilizar en el IFL de estrategia 2, mediante la conjugación del Ac IgG_{con} y las GNPs (IgG_{con}/GNPs) empleando un protocolo de adsorción pasiva. La relación óptima de cantidades de los reactivos a conjugar se determinó mediante la titulación de diluciones seriadas del Ac en *buffer* borato (pH 8 y 9) con la solución de GNPs. Como se observa en la Figura 55, la dilución seleccionada del Ac IgG_{con} (0,023 mg/ml) corresponde a la mayor dilución de Ac a la cual las GNPs permanecen estables.

De acuerdo con las condiciones óptimas seleccionadas, se conjugaron 50 mL de la solución de GNPs con 5 mL del Ac IgG_{con} diluido previamente en *buffer* borato 20 mM (pH 9). La mezcla se incubó por 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. La conjugación fue monitoreada por Espectroscopía UV/Vis.



Figura 55: Conjugación del Ac IgG_{con}/GNPs. Titulación de GNPs con el Ac IgG_{con}. Seleccionamos el buffer borato de Sodio 20 mM a pH 9 y Ac en la concentración de 0,023 mg/ml.

4.4.4 Conjugado de CP4/GNPs

Para la IFL de la estrategia 2, se obtuvo otro sistema de marcación mediante la conjugación del Ag CP4 y las GNPs (CP4/GNPs) empleando un protocolo de adsorción pasiva. La relación óptima de cantidades de los reactivos a conjugar se determinó mediante la titulación de diluciones seriadas del Ag en *buffer* borato (pH 8 y 9) con la solución de GNPs. Como se observa en la Figura 56, la dilución seleccionada del Ag CP4 (0,025 mg/ml) corresponde a la mayor dilución de Ag a la cual las GNPs permanecen estables.

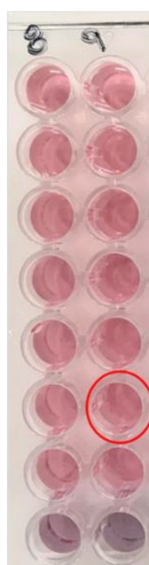


Figura 56: Conjugación de CP4/GNPs. Titulación de GNPs con CP4. Seleccionamos el Buffer borato de sodio 20 mM a pH 9 y CP4 en concentración de 0,025 mg/ml.

De acuerdo con las condiciones óptimas seleccionadas, se conjugaron 50 mL de la solución de GNPs con 5 mL del Ag CP4 diluido previamente en *buffer* borato 20 mM (pH 9). La mezcla se incubó por 30 min en agitación suave y a temperatura ambiente. La conjugación fue monitoreada por Espectroscopía UV/Vis.

4.4.5 IFL estrategia 1

Una vez obtenido el conjugado, se procedió al ensamblado de las tiras reactivas y se realizaron pruebas de optimización para aumentar la señal de reacción específica. Las mismas consistieron en evaluar: reactivos y concentraciones de *buffers* de muestra, concentraciones de conjugado, concentraciones de Ag y Ac a inmovilizar en las ZT, ZC y diluciones de la muestra. Estas condiciones se evaluaron frente a las muestras pool Ch+ y pool Ch-.

Se dispensaron 100 μ L de una solución de suero diluido 1 en 12 en *buffer* de muestra sobre el *pad* de muestra. Luego de 15 min de corrida el resultado de la prueba fue considerado como positivo cuando se revelaron ambas líneas (ZT y ZC), mientras que el revelado de la ZC únicamente indicó un resultado negativo.

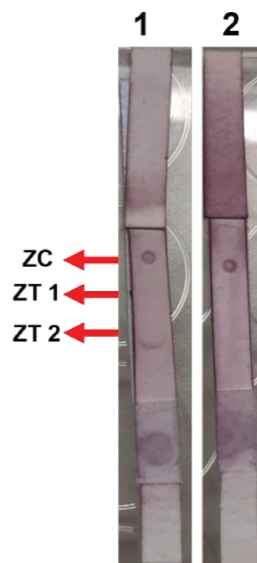


Figura 57: Tiras reactivas para la detección de Ac IgM específicos contra Ags de *T. cruzi* para la estrategia IFL 1. Evaluación del Ag CP4 en $C=0,64$ mg/ml como ZT 1 y en $C=0,32$ mg/ml como ZT 2 frente al pool Ch+ (1) y pool Ch- (2).

Como se puede observar en la Figura 57, no se observa interacción inespecífica para el pool sueros Ch- (tira 2) con el Ag CP4 en la zona LT. En cuanto al pool Ch+ se observa (tira 1) un semi halo de reacción cuando CP4 está más diluida (ZT 2), pero no se observa la reacción específica esperada con la conformación de un spot de color homogéneo.

4.4.6 IFL estrategia 2

Una vez obtenido el conjugado, se procedió al ensamblado de las tiras reactivas y se realizaron pruebas de optimización para aumentar la señal de reacción específica. Las mismas consistieron en evaluar: reactivos y concentraciones de *buffers* de muestra, concentraciones de conjugado, concentraciones de Ag y Ac a inmovilizar en las líneas ZT, ZC y diluciones de la muestra. Estas condiciones se evaluaron frente a las muestras pool Ch+ y pool Ch-.

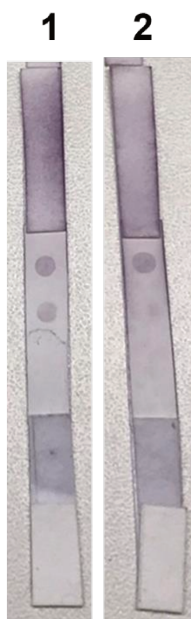


Figura 58: Tiras reactivas para la detección de Ac IgM específicos contra Ags de *T. cruzi* para la estrategia IFL 2. Evaluación frente al pool Ch+ (1) y pool Ch- (2).

Como se puede observar en la Figura 58, hay interacción específica para el pool Ch+ (tira 1) con el Ac anti-IgM humano en la zona ZL y no se observa interacción inespecífica para el pool Ch- (tira 2).

A partir de las pruebas de optimización se determinaron las siguientes condiciones de ensayo para evaluar con los sueros del panel LFA:

- Conjugado: dispensación de los conjugados CP4/GNPs e IgG_{con}/GNPs en proporción 2:1 en el *pad* de conjugado.
- Muestra: diluida 1/12 en *buffer* muestra
- Inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} en C=2,07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la ZT.
- Inmovilización del Ac anti-IgG_{con} en C=0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la ZC.

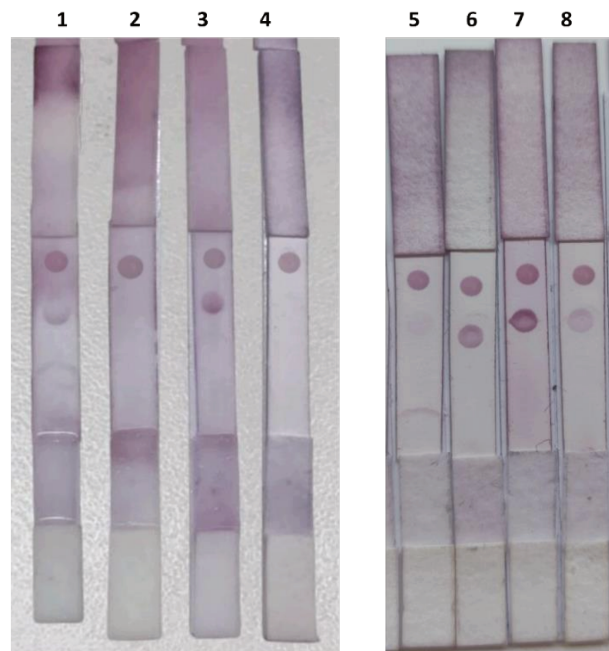


Figura 59: Tiras reactivas para la detección de Ac IgM específicos contra Ags de *T. cruzi* para la estrategia IFL 2. Evaluación frente a muestras del panel IFL compuesto por muestras de cordón BB+ (1 y 3), cordón BB- (2 y 3) y BB+ (5 a 8).

En la Figura 59 se observan algunas de las tiras reactivas evaluadas frente a las muestras del panel IFL descrito en la sección 4.3.2. Las tiras 1 a 4 corresponden a muestras del grupo cordón BB+ y cordón BB-, mientras que las tiras 5 a 8 corresponden a muestras del grupo BB+.

El test IFL 2 permitió clasificar correctamente 11 de 16 muestras positivas y 7 de 8 muestras negativas del panel evaluado (n=24), tomando como prueba de referencia el diagnóstico mediante MH y PCR. Los resultados se detallan en la Tabla 10.

Cabe destacar que del total de muestras evaluadas del grupo BB+ (n=8) todas resultaron correctamente clasificadas como positivas, mientras que para las muestras del grupo cordón BB+ (8) solo 3 resultaron positivas, por lo tanto, se obtuvieron 5 FN.

En cuanto al grupo CN (n=4) todas las muestras de suero provenientes de cordón resultaron negativas. Mientras que para las muestras del grupo cordón BB- (4), 3 muestras resultaron clasificadas correctamente como negativas, dando un resultado FP.

Tabla 10: Clasificación de las muestras con el test IFL. Resultados obtenidos mediante el diagnóstico estándar (MH/PCR) y el obtenido con el test de IFL 2.

		Diagnostico por MH/PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Diagnostico por IFL	Positivo	11	1	12
	Negativo	5	7	12
	Total	16	8	24

4.5 Discusión

En este capítulo, se propuso la adaptación de la captura de Ac IgM anti-CP4 a dos diseños preliminares de IFL para el diagnóstico de infección vertical por *T. cruzi* en sueros de neonatos.

El primer diseño del *test* (IFL estrategia 1) implicó una primera etapa de marcación de todos los Ac IgM_{hu} presentes en la muestra, empleando como molécula de marcación un Ac anti-IgM_{hu} conjugado a GNPs. Subsecuentemente, los Ac IgM_{hu} específicos para *T. cruzi* son capturados sobre la ZT por el Ag CP4 recombinante. En cambio, el segundo diseño (IFL estrategia 2) implicó la marcación de todos los Ac específicos anti-CP4 de *T. cruzi* presentes en la muestra, utilizando como molécula de marcación un conjugado de CP4/GNPs. Posteriormente los Ac IgM anti-CP4 específicos son capturados sobre la ZT por el Ac anti-IgM_{hu}. Se iniciaron los ensayos evaluando las estrategias propuestas frente al pool de sueros positivos y pool de sueros negativos conformados por sueros provenientes de bebé y de cordón. Se evaluaron diferentes condiciones y variables del ensayo para optimizar la señal de reacción específica tanto para la estrategia 1 como para la estrategia 2.

Respecto al *test* IFL 1, se logró obtener una señal de reacción específica frente a la evaluación de pool de sueros Ch+, pero esta señal no fue la esperada, ya que no era homogénea. En lugar de observarse un círculo uniforme de color rojo en la zona de reacción, se observaba un semi halo de reacción. Se evaluaron diferentes condiciones, pero no fue posible optimizar la señal obtenida con este diseño. Una hipótesis de lo ocurrido es que al marcar las GNPs con el Ac anti-IgM humano, se estén pegando este tipo de Ac con una elevada concentración compitiendo con el pegado de los Ac IgM específicos, por lo cual al momento de atravesar la LT, sean pocos los Ac anti-IgM específicos para ser reconocidos por el Ag CP4 inmovilizado.

Motivo por el cual consideramos la opción de plantear otra estrategia, IFL 2, conjugando las GNPs al Ag CP4, para capturar en primera instancia, todos los Ac presentes específicos para este Ag y luego retener los Acs IgM, específicos, con un Ac anti-IgM humano inmovilizado en la LT. Se evaluó esta estrategia del *test* frente a los pools de sueros Ch+ y Ch-. Fue posible obtener señal de reacción específica del Ag CP4 de *T. cruzi* para los Ac IgM presentes con las siguientes condiciones: conjugados CP4/GNPs e IgG_{con}/GNPs en proporción 2:1 en el *pad* de conjugado; inmovilización del Ac anti-IgM_{hu} (C=2,07 µg/µl) en la ZT e inmovilización del Ac anti-IgG_{con} (C=0,10 µg/µl) en la ZC y dispensado, sobre el taco de muestra, del suero diluido 1 en 12 en *buffer* muestra.

La performance diagnóstica del IFL 2 se evaluó tomando como prueba de referencia el diagnóstico por la técnica de MH y el diagnóstico molecular. Si bien no fue posible analizar parámetros diagnósticos debido al bajo número de muestras evaluadas, se puede sugerir que el *test* demostró un buen comportamiento diagnóstico ya que fue posible clasificar correctamente el 75% de las muestras analizadas.

Según lo reportado en bibliografía, las concentraciones de Ac IgM en muestra de suero de cordón y en muestra de suero de bebé tienen concentraciones similares cuando el bebé no está cursando ninguna infección. Sin embargo, ante una infección, se ha demostrado que los niveles de Ac IgM puede aumentar significativamente.

Por lo cual, cabe destacar que todas las muestras evaluadas del grupo BB+ resultaron correctamente clasificadas como positivas, mientras que las muestras del grupo cordón BB+ solo 3 resultaron positivas, por lo tanto, se obtuvieron 5 resultados FN. Esto podría deberse a que la concentración de Ac de tipo IgM específicos frente al Ag CP4 de *T. cruzi* que están presente en él bebé tienen una concentración considerablemente mayor que los Ac IgM específicos presentes en el cordón umbilical. Estas muestras además de diferenciarse en la composición tienen la característica de ser tomadas en diferentes tiempos, ya que las muestras de bebé fueron tomadas hasta 15 días posterior al nacimiento.

Como ha sido reportado (Alkan Ozdemir et al., 2016), los niveles de IgM fetal están presentes en bajas concentraciones y luego se incrementan en correlación con el aumento de edad gestacional. Particularmente para las muestras evaluadas frente al *test* IFL 2 desarrollado, podríamos sugerir que quizás las muestras de bebés, que tienen más días de vida, que las muestras tomadas del cordón, tengan más niveles de Ac IgM específicos de *T. cruzi*. Además, es posible que la infección del feto se haya dado en distintos tiempos gestacionales o incluso durante el canal de parto, lo cual, sería una variable que afectaría al momento de medir los Ac presentes en las muestras dependiendo del origen del cual provengan. Debido a estos resultados se debe considerar reportar en forma clara el desempeño del *test* en función de ser realizado con sangre periférica o de cordón.

Por otra parte, se obtuvo un resultado FP, correspondiente a una muestra del grupo cordón BB-, sin seguimiento serológico. Dicha muestra también fue procesada, previamente, mediante IFL frente al Ag SAPA desarrollado por el LTI (Olaguibe et al., 2022) obteniéndose un resultado positivo. Este caso podría tratarse de un niño infectado por *T. cruzi* que resultó FN en el diagnóstico por PCR dado que como se describió previamente, dicho niño no pudo ser seguido en el tiempo.

En cuanto a los FN, es importante señalar que solo se obtuvieron para la evaluación de las muestras de suero de cordón umbilical. Es necesario seguir realizando comparaciones entre la utilización de muestras sanguínea o de cordón para determinar si esta limitación podría deberse a la necesidad de una mayor sensibilidad de la técnica para la detección en este último tipo de muestra. Si bien el *test* mostró un muy buen desempeño diagnóstico, consideramos que para poder hacer un análisis de parámetros diagnósticos de la plataforma IFL diseñada, se requiere de un mayor número de muestras, a su vez que se resalta la necesidad de optimizar la señal para poder detectar los casos positivos de muestras de suero de cordón.

En consecuencia, a futuro resulta necesario trabajar en optimizar la señal del resultado, lo que permitiría incrementar la sensibilidad del *test* a fines de detectar si existe la presencia de Ac IgM presentes en muestras de suero de cordón umbilical. Además, sería relevante poder evaluar un panel con muestras que preferentemente hayan completado el algoritmo diagnóstico, de manera de analizar un mayor número de muestras con resultados discordantes entre el diagnóstico molecular y serológico.

El desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan la detección de Chagas vertical en neonatos de forma temprana aseguraría la efectividad del tratamiento, contribuyendo a disminuir progresivamente la prevalencia de la transmisión vertical de *T. cruzi*. Dada la facilidad de la técnica del IFL 2 aquí propuesta y a los resultados preliminares obtenidos, parecería ser una estrategia prometedora para su implementación en el diagnóstico de la enfermedad.

5. Conclusiones

Como conclusiones generales de este trabajo de Tesis podemos mencionar que se lograron desarrollar diversas plataformas diagnosticas que permitieron el diagnóstico de la enfermedad de Chagas vertical. Estas plataformas consistieron en:

- Un ELISA de captura de Ac IgM anti-CP4, el cual presento la mejor performance diagnostica de los ensayos desarrollados. A su vez dicho ensayo, se logró acoplar con éxito la lectura del ensayo mediante telefonía celular, permitiendo establecer una muy buena prueba POCT.
- Las técnicas de ELISA SAPA/TS y ELISA Avidéz para la detección de Ac específicos de tipo IgG que presentaron un buen desempeño diagnóstico, aunque no permiten definir todos los casos. Por eso se sugiere que dichas técnicas podrían utilizarse para complementar la determinación de IgM específica y deberían evaluarse en ese contexto
- Un prototipo de IFL que permitió la detección de Ac IgM anti-CP4 con resultados prometedores para ser utilizada como prueba POC.

Estos resultados permiten establecer las siguientes perspectivas a futuro:

- Validar el ensayo de ELISA de captura de IgM frente a un amplio número de muestras y además, con muestras que provengan de diferentes regiones geográficas de Latinoamérica.
- Determinar si el uso conjunto de ELISA de IgM y ELISA SAPA de avidéz o SAPA/TS permite mejorar el diagnóstico.
- Evaluar el IFL frente a mayor número de muestras para poder evaluar el rendimiento diagnóstico. Optimizar la estrategia para poder detectar las muestras provenientes de sueros de cordón.
- Acoplar la lectura del IFL a telefonía celular.

6. Bibliografía

- Abel, L. C. J., Iwai, L. K., Viviani, W., Bilate, A. M., Faé, K. C., Ferreira, R. C., Goldberg, A. C., Juliano, L., Juliano, M. A., Ianni, B., Mady, C., Gruber, A., Hammer, J., Sinigaglia, F., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2005). T cell epitope characterization in tandemly repetitive Trypanosoma cruzi B13 protein. *Microbes and Infection*, 7(11–12), 1184–1195. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.03.033>
- Affranchino, JoséL., Ibañez, C. F., Luquetti, A. O., Rassi, A., Reyes, M. B., Macina, R. A., Åslund, L., Pettersson, U., & Frasch, A. C. C. (1989). Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34(3), 221–228. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90050-9)
- Aguirre, S., Silber, A. M., Brito, M. E. F., Ribone, M. E., Lagier, C. M., & Marcipar, I. S. (2006). Design, Construction, and Evaluation of a Specific Chimeric Antigen To Diagnose Chagasic Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3768–3774. <https://doi.org/10.1128/JCM.01043-06>
- Aksu, G., Genel, F., Koturoğlu, G., Kurugöl, Z., & Kütükçüler, N. (2006). Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: A study using nephelometric technique. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 48(1), 19–24.
- Aldershvile, J., Roggendorf, M., Kryger, P., Tage-Jensen, U., Deinhardt, F., Frösner, G. G., Hardt, F., Nielsen, J. O., & The Copenhagen Hepatitis Acuta Programme. (2008). Anti-HBc of IgM-class, HBeAg and anti-HBe in acute and chronic hepatitis B. *Liver*, 1(4), 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1981.tb00045.x>
- Alkan Ozdemir, S., Ozer, E. A., Kose, S., Ilhan, O., Ozturk, C., & Sutcuoglu, S. (2016). Reference values of serum IgG and IgM levels in preterm and term newborns. *The*

- Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 29(6), 972–976.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1027680>
- Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A. G., & Gascon, J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: Up to date and novel methodologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(7), 699–710. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1338566>
- Alonso-Vega, C., Billot, C., & Torrico, F. (2013). Achievements and Challenges upon the Implementation of a Program for National Control of Congenital Chagas in Bolivia: Results 2004–2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002304>
- Altcheh, J., Moscatelli, G., Mastrantonio, G., Moroni, S., Giglio, N., Marson, M. E., Ballering, G., Bisio, M., Koren, G., & García-Bournissen, F. (2014). Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2907.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002907>
- Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., Garcia-Bournissen, F., & Freilij, H. (2011). Adverse Events After the Use of Benznidazole in Infants and Children With Chagas Disease. *PEDIATRICS*, 127(1), e212–e218. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1172>
- Alvarez, P., Leguizamón, M. S., Buscaglia, C. A., Pitcovsky, T. A., & Campetella, O. (2001). Multiple Overlapping Epitopes in the Repetitive Unit of the Shed Acute-Phase Antigen from *Trypanosoma cruzi* Enhance Its Immunogenic Properties. *Infection and Immunity*, 69(12), 7946–7949. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7946-7949.2001>
- Antas, P. R., Azevedo, E. N., Luz, M. R., Medrano-Mercado, N., Chaves, A. C., Vidigal, P. G., Volpini, A. C., Romanha, A. J., & Araújo-Jorge, T. C. (2000). A reliable and

- specific enzyme-linked immunosorbent assay for the capture of IgM from human chagasic sera using fixed epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 86(10), 813–820. <https://doi.org/10.1007/p100008507>
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., & Sathishkumar, R. (2016). Advances in molecular cloning. *Molecular Biology*, 50(1), 1–6. <https://doi.org/10.1134/S0026893316010131>
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*, 410(2), 310–312. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.015>
- Balouz, V., Cámara, M. de L. M., Cánepa, G. E., Carmona, S. J., Volcovich, R., Gonzalez, N., Altchek, J., Agüero, F., & Buscaglia, C. A. (2015). Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 22(3), 304–312. <https://doi.org/10.1128/CVI.00684-14>
- Barbosa, A. I., Gehlot, P., Sidapra, K., Edwards, A. D., & Reis, N. M. (2015). Portable smartphone quantitation of prostate specific antigen (PSA) in a fluoropolymer microfluidic device. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.006>
- Barros, G. B., Lemos, E. M., e Silva-dos-Santos, P. P., Dietze, R., Zandonade, E., Mineo, J. R., de Oliveira Silva, D. A., Pajuaba, A. C. M., de Souza Gomes, M., do Amaral, L. R., Coelho-dos-Reis, J. G., Martins-Filho, O. A., & Serufo, J. C. (2017). Proposed panel of diagnostic tools for accurate temporal classification of symptomatic *T. gondii* infection. *Journal of Immunological Methods*, 451, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.08.010>

- Bayer, E. A., & Wilchek, M. (1980). The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods of Biochemical Analysis*, 26, 1–45.
<https://doi.org/10.1002/9780470110461.ch1>
- Benchetrit, A., Margarita, B., Chaben, M. F., & Griselda, B. (2021). *Informe Técnico: Implementación de PCR en Tiempo Real en el Diagnóstico de Infección Vertical por Trypanosoma cruzi*. 20.
- Berg, B., Cortazar, B., Tseng, D., Ozkan, H., Feng, S., Wei, Q., Chan, R. Y.-L., Burbano, J., Farooqui, Q., Lewinski, M., Di Carlo, D., Garner, O. B., & Ozcan, A. (2015). Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *ACS Nano*, 9(8), 7857–7866.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03203>
- Berli, C. L. A. (2016). Dispositivos de microfluídica basados en papel: Orígenes, presente y perspectivas. *FABICIB*, 20, 133–146. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v20i0.6098>
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and congenital Chagas disease. *Advances in Parasitology*, 75, 19–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R. H., LaFuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Abastoflor, M. del C., Aparicio, H., Brady, M. F., Ferruffino, L., Angulo, N., Marcus, S., Sterling, C., & Maguire, J. H. (2009). Congenital *Trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1667–1674.
<https://doi.org/10.1086/648070>

- Berth, M., Grangeot-Keros, L., Heskia, F., Dugua, J.-M., & Vauloup-Fellous, C. (2014). Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(9), 1579–1584. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2109-8>
- Besteiro, S. A. (2010). *Aplicación del test de avidéz en el diagnostico de la infección por citomegalovirus*. 3.
- Bhattacharyya, T., Brooks, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., & Miles, M. A. (2010). Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 921–928. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.002>
- Bizai, M. L., Romina, P., Antonela, S., Olivera, L. V., Arias, E. E., Josefina, D. C., Silvia, M., Walter, S., Diana, F., & Cristina, D. (2020). Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104128. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104128>
- Blanco, S. B., Segura, E. L., Cura, E. N., Chuit, R., Tulián, L., Flores, I., Garbarino, G., Villalonga, J. F., & Gürtler, R. E. (2000). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: An operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 5(4), 293–301.
- Blankenship, W. J., Cassady, G., Schaefer, J., Straumfjord, J. V., & Alford, C. A. (1969). Serum gamma-M globulin responses in acute neonatal infections and their diagnostic significance. *The Journal of Pediatrics*, 75(6), 1271–1281. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(69\)80383-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(69)80383-5)

- Brasil, P. E. A. A., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., Sangenis, L. H. C., & Braga, J. U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, *10*, 337. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>
- Brenière, S. F., Yaksic, N., Telleria, J., Bosseno, M.-F., Noireau, F., Wincker, P., & Sanchez, D. (1997). Immune Response to Trypanosoma cruzi Shed Acute Phase Antigen in Children from an Endemic Area for Chagas' Disease in Bolivia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *92*, 503–507.
- Britto, C. C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104 Suppl 1*, 122–135. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900018>
- Bruch, R. C., & White, H. B. (1982). Compositional and structural heterogeneity of avidin glycopeptides. *Biochemistry*, *21*(21), 5334–5341. <https://doi.org/10.1021/bi00264a033>
- Bueren-Calabuig, J. A., Pierdominici-Sottile, G., & Roitberg, A. E. (2014). Unraveling the differences of the hydrolytic activity of Trypanosoma cruzi trans-sialidase and Trypanosoma rangeli sialidase: A quantum mechanics-molecular mechanics modeling study. *The Journal of Physical Chemistry. B*, *118*(22), 5807–5816. <https://doi.org/10.1021/jp412294r>
- Buscaglia, C. A., Campetella, O., Leguizamón, M. S., & Frasch, A. C. (1998). The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *The Journal of Infectious Diseases*, *177*(2), 431–436. <https://doi.org/10.1086/514199>
- Bustos, P. L., Milduberger, N., Volta, B. J., Perrone, A. E., Laucella, S. A., & Bua, J. (2019). Trypanosoma cruzi Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected

- Newborns. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01250>
- Campetella, O. E., Uttaro, A. D., Parodi, A. J., & Frasc, A. C. (1994). A recombinant *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64(2), 337–340.
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00036-0)
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M. S., Pujato, N., Ribone, M. E., Lagier, C. M., & Marcipar, I. S. (2009). Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 16(6), 899–905.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00005-09>
- Candolfi, E., Pastor, R., Huber, R., Filisetti, D., & Villard, O. (2007). IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 83–88.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.010>
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A. O., Schijman, A. G., Segovia, M., Wagner, N., & Albajar Vinas, P. (2019). Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(10), e0007694. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007694>
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., & Vinas, P. A. (2011). Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), e1250. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>

- Carlier, Y., & Truyens, C. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*, *151*, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Carral, L., Kaufer, F., Pardini, L., Durlach, R., Moré, G., Venturini, M. C., & Freuler, C. (2018). [Congenital toxoplasmosis: Serology, PCR, parasite isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii*]. *Revista Chilena De Infectologia: Organo Oficial De La Sociedad Chilena De Infectologia*, *35*(1), 36–40. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000100036>
- Carrilho, E., Phillips, S. T., Vella, S. J., Martinez, A. W., & Whitesides, G. M. (2009). Paper Microzone Plates. *Analytical Chemistry*, *81*(15), 5990–5998. <https://doi.org/10.1021/ac900847g>
- Carvalho, M. R., Krieger, M. A., Almeida, E., Oelemann, W., Shikanai-Yassuda, M. A., Ferreira, A. W., Pereira, J. B., Sáez-Alquézar, A., Dorlhiac-Llacer, P. E., & Chamone, D. F. (1993). Chagas' disease diagnosis: Evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*, *33*(10), 830–834.
- Castro, E. (2009). Chagas' disease: Lessons from routine donation testing. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, *19*(1), 16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2009.00915.x>
- Castro-Sesquen, Y. E., Gilman, R. H., Galdos-Cardenas, G., Ferrufino, L., Sánchez, G., Valencia Ayala, E., Liotta, L., Bern, C., & Luchini, A. (2014). Use of a Novel Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) for Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003211>
- Castro-Sesquen, Y. E., Tinajeros, F., Bern, C., Galdos-Cardenas, G., Malaga, E. S., Valencia Ayala, E., Hjerrild, K., Clipman, S. J., Lescano, A. G., Bayangos, T., Castillo, W., Mendiña, M. C., Talaat, K. R., & Gilman, R. H. (2020). The Immunoglobulin M-Shed

- Acute Phase Antigen (SAPA)-test for the Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in the Time of the Elimination Goal of Mother-to-Child Transmission. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(2), e477–e484. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa986>
- Castro-Sesquen, Y. E., Tinajeros, F., Bern, C., Galdos-Cardenas, G., Malaga, E. S., Valencia Ayala, E., Hjerrild, K., Clipman, S. J., Lescano, A. G., Bayangos, T., Castillo, W., Mendiña, M. C., Talaat, K. R., Gilman, R. H., & Chagas Working Group in Bolivia and Peru. (2021). The Immunoglobulin M-Shed Acute Phase Antigen (SAPA)-test for the Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in the Time of the Elimination Goal of Mother-to-Child Transmission. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(2), e477–e484. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa986>
- Chin, C. D., Linder, V., & Sia, S. K. (2006). Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab on a Chip*, 7(1), 41–57. <https://doi.org/10.1039/B611455E>
- Chuit, R., & Segura, E. L. (2012). *El control de la Enfermedad de Chagas en Argentina. Sus resultados.*
- Cimino, R. O., Rumi, M. M., Ragone, P., Lauthier, J., D', A. A., AMATO, Quiroga, I. R. L., Gil, J. F., Cajal, S. P., Acosta, N., Juárez, M., Krolewiecki, A., Orellana, V., Zacca, R., Marcipar, I., Diosque, P., & Nasser, J. R. (2011). Immuno-enzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: A tool for epidemiological studies. *Parasitology*, 138(8), 995–1002. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000540>

- Ciobanu, A. M., Dumitru, A. E., Gica, N., Botezatu, R., Peltecu, G., & Panaitescu, A. M. (2020). Benefits and Risks of IgG Transplacental Transfer. *Diagnostics*, *10*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10080583>
- Colli, W. (1993). Trans-sialidase: A unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *7*(13), 1257–1264. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.13.8405811>
- da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., & Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, *17*(6), 286–291. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01897-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01897-9)
- Danesi, E., Codebó, M. O., & Sosa-Estani, S. (2019). *TRANSMISIÓN CONGÉNITA DE TRYPANOSOMA CRUZI. ARGENTINA 2002-2014*. 9.
- de Castro Zacche-Tonini, A., Fonseca, G. S. F., de Jesus, L. N. N. P., Barros, G. B., Coelho-dos-Reis, J. G. A., Béla, S. R., Machado, A. S., Carneiro, A. C. A. V., Andrade, G. M. Q., Vasconcelos-Santos, D. V., Januário, J. N., Teixeira-Carvalho, A., Vitor, R. W. A., Ferro, E. A. V., Mineo, J. R., Martins-Filho, O. A., & Lemos, E. M. (2017). Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. *Journal of Immunological Methods*, *451*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.08.005>
- De Paschale, M., Cagnin, D., Cerulli, T., Manco, M. T., Agrappi, C., Mirri, P., Gatti, A., Rescaldani, C., & Clerici, P. (2010). Search for Anti-EA(D) Antibodies in Subjects with an ‘Isolated VCA IgG’ Pattern. *International Journal of Microbiology*, *2010*, 695104. <https://doi.org/10.1155/2010/695104>
- De Rissio, A. M., Riarte, A. R., García, M. M., Esteva, M. I., Quaglino, M., & Ruiz, A. M. (2010). Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. Efficacy of Its Monitoring in an

- Urban Reference Health Center in a Non-Endemic Area of Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 838–845.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0383>
- Deans, T. L. (2015). Parallel Networks: Synthetic Biology and Artificial Intelligence. *ACM Journal on Emerging Technologies in Computing Systems*, 11(3), 21:1-21:22.
<https://doi.org/10.1145/2667229>
- Della-Penna, D., Christoffersen, R. E., & Bennett, A. B. (1986). Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots. *Analytical Biochemistry*, 152(2), 329–332. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90417-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90417-3)
- Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C., & Frasch, A. C. C. (2002). A Trypanosoma cruzi Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease Is Due to a Single Parasite Lineage. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.20011433>
- Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*, 37(5), 625–636.
- Diez, C. N., Manattini, S., Zanuttini, J. C., Bottasso, O., & Marcipar, I. (2008). The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(4), 624–627.
- Ding, X., Mauk, M. G., Yin, K., Kadimisetty, K., & Liu, C. (2019). Interfacing Pathogen Detection with Smartphones for Point-of-Care Applications. *Analytical Chemistry*, 91(1), 655–672. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04973>
- Durlach, R. A., Kaufer, F., Carral, L., & Hirt, J. (2003). Toxoplasmic lymphadenitis—Clinical and serologic profile. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(7), 625–631.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00575.x>

- Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
- Erickson, D., O'Dell, D., Jiang, L., Oncescu, V., Gumus, A., Lee, S., Mancuso, M., & Mehta, S. (2014). Smartphone technology can be transformative to the deployment of lab-on-chip diagnostics. *Lab on a Chip*, 14(17), 3159–3164. <https://doi.org/10.1039/c4lc00142g>
- Fabbro, D. L., Danesi, E., Olivera, V., Codebó, M. O., Denner, S., Heredia, C., Streiger, M., & Sosa-Estani, S. (2014). Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), e3312. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>
- Fernández, M. D. P., Cecere, M. C., Lanati, L. A., Lauricella, M. A., Schijman, A. G., Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2014). Geographic variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units from *Triatoma infestans* at different spatial scales. *Acta Tropica*, 140, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.014>
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1
- Freilij, H., & Altcheh, J. (1995). Congenital Chagas' disease: Diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21(3), 551–555. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.3.551>
- Freire-de-Lima, L., Fonseca, L. M., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. O. (2015). The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three

- decades of studies. *Glycobiology*, 25(11), 1142–1149.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Bost, M., Goullier-Fleuret, A., & Ambroise-Thomas, P. (1996). [Congenital toxoplasmosis: Contribution of postnatal biological follow-up]. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 25(38), 1868–1872.
- García, V. S., Peverengo, L., Peretti, L. E., González, V. D. G., Gugliotta, L. M., Dalla Fontana, M. L., Marcipar, I. S., & Lagier, C. M. (2018). An improved approach to estimate the avidity index of immunoglobulins: Evaluation of the method using IgG anti-*Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunological Methods*, 457, 78–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.008>
- Gerlich, W. H., Uy, A., Lambrecht, F., & Thomssen, R. (1986). Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic, and past hepatitis B virus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(2), 288–293.
- Goldblatt, D. (2001). Affinity of Antigen–Antibody Interactions. In *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001113>
- Granjon, E., Dichtel-Danjoy, M.-L., Saba, E., Sabino, E., Oliveira, L. C. de, & Zrein, M. (2016). Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), e0004596. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004596>
- Green, N. M. (1975). Avidin. *Advances in Protein Chemistry*, 29, 85–133.
[https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60411-8](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60411-8)
- Green, N. M. (1990). Avidin and streptavidin. *Methods in Enzymology*, 184, 51–67.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84259-j](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84259-j)

- Grosso, N. L., Bua, J., Perrone, A. E., Gonzalez, M. N., Bustos, P. L., Postan, M., & Fichera, L. E. (2010). Trypanosoma cruzi: Biological characterization of a isolate from an endemic area and its susceptibility to conventional drugs. *Experimental Parasitology*, 126(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.010>
- Gruber, A., & Zingales, B. (1993). Trypanosoma cruzi: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Experimental Parasitology*, 76(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1001>
- Hedman, K., Lappalainen, M., Seppäiä, I., & Mäkelä, O. (1989). Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(4), 736–740. <https://doi.org/10.1093/infdis/159.4.736>
- Hermanson, G. (2013). *Bioconjugate Techniques—3rd Edition*. <https://www.elsevier.com/books/bioconjugate-techniques/hermanson/978-0-12-382239-0>
- Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate techniques* (2nd edition). Academic Press.
- Herremans, T., Kortbeek, L., & Notermans, D. W. (2010). A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 29(5), 495–501. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-0900-8>
- Holguín, A., Norman, F., Martín, L., Mateos, M. L., Chacón, J., López-Vélez, R., & Pérez-Molina, J. A. (2013). Dried blood as an alternative to plasma or serum for Trypanosoma cruzi IgG detection in screening programs. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 20(8), 1197–1202. <https://doi.org/10.1128/CVI.00221-13>
- Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D., & Savioli, L. (2007). Control of neglected tropical diseases. *The New England Journal of Medicine*, 357(10), 1018–1027. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>

- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L. D., McNeill, P. D., Sleath, P. R., Lodes, M. J., Skeiky, Y. A. W., Leiby, D. A., Badaro, R., & Reed, S. G. (1999). A Multi-Epitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Radioimmunoprecipitation-Confirmed and Consensus-Positive Sera. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(5), 1226–1234. <https://doi.org/10.1086/314723>
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. A. W., Badaro, R., Krettli, A. U., & Reed, S. G. (2000). Multiepitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in Patients with Treated or Untreated Chagas' Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(1), 325–330. <https://doi.org/10.1086/315165>
- Howard, E. J., Xiong, X., Carlier, Y., Sosa-Estani, S., & Buekens, P. (2014). Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *121*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>
- Hu, J., Cui, X., Gong, Y., Xu, X., Gao, B., Wen, T., Lu, T. J., & Xu, F. (2016). Portable microfluidic and smartphone-based devices for monitoring of cardiovascular diseases at the point of care. *Biotechnology Advances*, *34*(3), 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.008>
- Jain, S., Nehra, M., Kumar, R., Dilbaghi, N., Hu, T., Kumar, S., Kaushik, A., & Li, C.-Z. (2021). Internet of medical things (IoMT)-integrated biosensors for point-of-care testing of infectious diseases. *Biosensors & Bioelectronics*, *179*, 113074. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113074>

- Kabir, M. A., Zilouchian, H., Sher, M., & Asghar, W. (2020). Development of a Flow-Free Automated Colorimetric Detection Assay Integrated with Smartphone for Zika NS1. *Diagnostics*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010042>
- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, *2016*, e2405954. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Kim, D. W., Jeong, K. Y., & Yoon, H. C. (2020). Chapter 7—Smartphone-based medical diagnostics with microfluidic devices. In J.-Y. Yoon (Ed.), *Smartphone Based Medical Diagnostics* (pp. 103–128). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817044-1.00007-7>
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Lago, E. G., Oliveira, A. P., & Bender, A. L. (2014). Presence and duration of anti-Toxoplasma gondii immunoglobulin M in infants with congenital toxoplasmosis. *Jornal De Pediatria*, *90*(4), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.12.006>
- Laksanasopin, T., Guo, T. W., Nayak, S., Sridhara, A. A., Xie, S., Olowookere, O. O., Cadinu, P., Meng, F., Chee, N. H., Kim, J., Chin, C. D., Munyazesa, E., Mugwaneza, P., Rai, A. J., Mugisha, V., Castro, A. R., Steinmiller, D., Linder, V., Justman, J. E., ... Sia, S. K. (2015). A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care. *Science Translational Medicine*, *7*(273), 273re1-273re1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0056>

- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X.-S., Ramsay, A. R., & Peeling, R. W. (2019). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology*, 4(1), 46–54. Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
- Lee, S., Oncescu, V., Mancuso, M., Mehta, S., & Erickson, D. (2014). A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels. *Lab on a Chip*, 14(8), 1437–1442. <https://doi.org/10.1039/c3lc51375k>
- Leguizamón, M. S., Campetella, O., Russomando, G., Almiron, M., Guillen, I., Ganzález Cappa, S. M., & Frasch, A. C. (1994). Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(6), 1570–1574. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1570>
- Leguizamón, M. S., Russomando, G., Luquetti, A., Rassi, A., Almirón, M., González-Cappa, S. M., Frasch, A. C., & Campetella, O. (1997). Long-lasting antibodies detected by a trans-sialidase inhibition assay of sera from parasite-free, serologically cured chagasic patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(5), 1272–1275. <https://doi.org/10.1086/593697>
- Levin, M. J., Franco da Silveira, J., Frasch, A. C. C., Camargo, M. E., Lafon, S., Degraeve, W. M., & Rangel-Aldao, R. (1991). Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: Analysis of a workshop. *FEMS Microbiology Letters*, 89(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90058-I](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90058-I)
- Li, S., Galvan, G., Araujo, F. G., Suzuki, Y., Remington, J. S., & Parmley, S. (2000). Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(5), 781–787.

- Lorca, M., Veloso, C., Munoz, P., Bahamonde, M. I., & Garcia, A. (1995). Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(6), 512–515.
- Lozano, D., Rojas, L., Méndez, S., Casellas, A., Sanz, S., Ortiz, L., Pinazo, M. J., Abril, M., Gascón, J., Torrico, F., & Alonso-Padilla, J. (2019). Use of rapid diagnostic tests (RDTs) for conclusive diagnosis of chronic Chagas disease – field implementation in the Bolivian Chaco region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(12), e0007877. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007877>
- Mabey, D., Peeling, R. W., Ustianowski, A., & Perkins, M. D. (2004). Diagnostics for the developing world. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 231–240. Scopus. <https://doi.org/10.1038/nrmicro841>
- Majeau, A., Murphy, L., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2021). Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2), 212. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020212>
- Mallimaci, M. C., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Sanchez, Z., Sijvarger, C., Alvarez, I. M., Barrionuevo, L., Lopez, C., & Segura, E. L. (2010). Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), 55–59. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0219>
- Marcipar, I. S., & Lagier, C. M. (2012). *Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins*. <https://doi.org/10.5772/28100>
- Martin, V., Supanitsky, A., Echeverria, P. C., Litwin, S., Tanos, T., De Roodt, A. R., Guarnera, E. A., & Angel, S. O. (2004). Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with

- alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4), 704–710. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.4.704-710.2004>
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., & Whitesides, G. M. (2008). Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Analytical Chemistry*, 80(10), 3699–3707. <https://doi.org/10.1021/ac800112r>
- McKay, F. H., Cheng, C., Wright, A., Shill, J., Stephens, H., & Uccellini, M. (2018). Evaluating mobile phone applications for health behaviour change: A systematic review. *Journal of Telemedicine and Telecare*, 24(1), 22–30. <https://doi.org/10.1177/1357633X16673538>
- Mesri, E. A., Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Dighiero, G., Van Regenmortel, M. H., & Levin, M. J. (1990). Major Trypanosoma cruzi antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1219–1224. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1219-1224.1990>
- Messenger, L. A., Gilman, R. H., Verastegui, M., Galdos-Cardenas, G., Sanchez, G., Valencia, E., Sanchez, L., Malaga, E., Rendell, V. R., Jois, M., Shah, V., Santos, N., Abastoflor, M. D. C., LaFuente, C., Colanzi, R., Bozo, R., Bern, C., & Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru. (2017). Toward Improving Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in an Endemic Setting. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(2), 268–275. <https://doi.org/10.1093/cid/cix277>

- Messenger, L., & Bern, C. (2018). Congenital Chagas disease: Current diagnostics, limitations and future perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(5), 415–421. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000478>
- Miller, M. J., Sunshine, P. J., & Remington, J. S. (1969). Quantitation of cord serum IgM and IgA as a screening procedure to detect congenital infection: Results in 5,006 infants. *The Journal of Pediatrics*, 75(6), 1287–1291. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(69\)80385-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(69)80385-9)
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2005). [Brazilian Consensus on Chagas disease]. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 38 Suppl 3, 7–29.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2018). *ENFERMEDAD DE CHAGAS. GUÍA PARA LA ATENCIÓN AL PACIENTE INFECTADO CON Trypanosoma cruzi. Guia para el equipo de salud.*
- Minosse, C., Lapa, D., Coppola, A., Rapagna, F., D’Offizi, G., Taibi, C., Lionetti, R., Capobianchi, M. R., McPhee, F., & Garbuglia, A. R. (2021). Anti-HEV IgG Avidity Testing: Utility for Diagnosing Acute and Resolved Genotype 3 Infections. *Viruses*, 13(2), 236. <https://doi.org/10.3390/v13020236>
- Moncayo, A., & Ortiz Yanine, M. I. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100(8), 663–677. <https://doi.org/10.1179/136485906X112248>
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., ... BENEFIT Investigators. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas’

- Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295–1306.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574>
- Mudanyali, O., Dimitrov, S., Sikora, U., Padmanabhan, S., Navruz, I., & Ozcan, A. (2012). Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab on a Chip*, 12(15), 2678–2686. <https://doi.org/10.1039/c2lc40235a>
- Murdock, R. C., Shen, L., Griffin, D. K., Kelley-Loughnane, N., Papautsky, I., & Hagen, J. A. (2013). Optimization of a Paper-Based ELISA for a Human Performance Biomarker. *Analytical Chemistry*, 85(23), 11634–11642. <https://doi.org/10.1021/ac403040a>
- Naot, Y., Desmots, G., & Remington, J. S. (1981). IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. *The Journal of Pediatrics*, 98(1), 32–36. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(81\)80528-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(81)80528-8)
- Noazin, S., Ja, L., Es, M., E, V. A., Bj, C., C, R., Ag, L., C, B., W, C., H, M., Mc, M., Mr, V., F, T., Rh, G., & undefined. (2019). Trypomastigote Excretory Secretory Antigen Blot Is Associated With *Trypanosoma cruzi* Load and Detects Congenital *T. cruzi* Infection in Neonates, Using Anti-Shed Acute Phase Antigen Immunoglobulin M. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(4), 609–618. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy562>
- Noazin, S., Lee, J. A., Malaga, E. S., Ayala, E. V., Condori, B. J., Roca, C., Lescano, A. G., Bern, C., Castillo, W., Mayta, H., Menduiña, M. C., Verastegui, M. R., Tinajeros, F., Gilman, R. H., & Chagas Working Group in Bolivia and Peru. (2018). Trypomastigote Excretory Secretory Antigen (TESA) blot is associated in neonates with parasite load and detects congenital *T. cruzi* infection using anti-SAPA IgM. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy562>
- O'Farrell, B. (2013). Chapter 2.4 - Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid

- Assays. In D. Wild (Ed.), *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)* (pp. 89–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00007-5>
- Olaguibe, A., Peverengo, L., Rodeles, L., Diaz, A., Diosque, P., Berli, C., Marcipar, I., & Pujato, N. (2022). *Test rápido de IgM para el diagnóstico de Chagas vertical: Prueba del antígeno SAPA de Trypanosoma cruzi como candidato para la detección*. Trabajo presentado en la XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología.
- Pacini, M. F., Perdomini, A., Bulfoni Balbi, C., Dinatale, B., Herrera, F. E., Pérez, A. R., & Marcipar, I. (2023). The high identity of the Trypanosoma cruzi Group-I of Transsialidases points them as promising vaccine immunogens. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, *Aceptado para la publicación*.
- PAHO. (2017). Framework for Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV, Syphilis, Hepatitis B and Chagas. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34306>
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., & Carneiro-Sampaio, M. (2012). IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical & Developmental Immunology*, *2012*, 985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646>
- Parker, E. R., & Sethi, A. (2011). Chagas disease: Coming to a place near you. *Dermatologic Clinics*, *29*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.det.2010.08.011>
- Parmley, S. F., Sgarlato, G. D., Mark, J., Prince, J. B., & Remington, J. S. (1992). Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of Toxoplasma gondii. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(5), 1127–1133.
- Pastuszczak, M., Kotnis-Gąska, A., Jakubowicz, B., Martyka, I., Bociaga-Jasik, M., & Wojas-Pelc, A. (2018). Utility of antitreponemal IgM testing in the diagnosis of early and repeat syphilis among HIV-infected and non-infected patients. *International Journal of STD & AIDS*, *29*(9), 890–894. <https://doi.org/10.1177/0956462418762849>

- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Peveerengo, L. M., Garcia, V., Rodeles, L. M., Mendicino, D., Vicco, M., Lagier, C., Gonzalez, V., Gugliotta, L., & Marcipar, I. (2018). Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*, 145(12), 1594–1599. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000458>
- Pollevick, G. D., Affranchino, J. L., Frasc, A. C., & Sánchez, D. O. (1991). The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47(2), 247–250. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90185-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90185-9)
- Praast, G., Herzogenrath, J., Bernhardt, S., Christ, H., & Sickinger, E. (2011). Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69(1), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.019>
- Preechaburana, P., Suska, A., & Filippini, D. (2014). Biosensing with cell phones. *Trends in Biotechnology*, 32(7), 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.007>
- Prochetto, E., Bontempi, I., Rodeles, L., Cabrera, G., Vicco, M., Cacik, P., Pacini, M. F., Pérez Gianceselli, M., Pérez, A. R., & Marcipar, I. (2022). Assessment of a combined treatment with a therapeutic vaccine and benznidazole for the *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Acta Tropica*, 229, 106334. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106334>
- Prochetto, E., Roldán, C., Bontempi, I. A., Bertona, D., Peveerengo, L., Vicco, M. H., Rodeles, L. M., Pérez, A. R., Marcipar, I. S., & Cabrera, G. (2017). Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor

- phenotype. *Oncotarget*, 8(35), 58003–58020.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.18217>
- Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2017). Mobile phone-based biosensing: An emerging ‘diagnostic and communication’ technology. *Biosensors & Bioelectronics*, 92, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.062>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rateni, G., Dario, P., & Cavallo, F. (2017). Smartphone-Based Food Diagnostic Technologies: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/s17061453>
- Redlich, A., & Müller, W. A. (1998). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitology Research*, 84(9), 700–706.
- Remington, J. S., Thulliez, P., & Montoya, J. G. (2004). Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 941–945. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.941-945.2004>
- Reyes, M. B., Lorca, M., Muñoz, P., & Frasch, A. C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2846–2850. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2846>
- Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gállego, M., Tebar, S., & Portús, M. (2012). Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 412–416. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0111>
- Rodríguez, P., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Flores, A., Cordova, M., Suarez, E., Torrico, F., & Carlier, Y. (2005). [Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-trypanosoma cruzi in samples of blood from newborns from mothers with positive serology for

- Chagas disease]. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, 62–64.
- Romero, M., Postigo, J., Schneider, D., Chippaux, J.-P., Santalla, J. A., & Brutus, L. (2011). Door-to-door screening as a strategy for the detection of congenital Chagas disease in rural Bolivia. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 16(5), 562–569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02746.x>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Russomando, G., Almirón, M., Candia, N., Franco, L., Sánchez, Z., & de Guillen, I. (2005). [Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay]. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, 49–54.
- Russomando, G., Sánchez, Z., Meza, G., & Guillen, Y. de. (2010). Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(6), 705–707. <https://doi.org/10.1586/erm.10.70>
- Sajid, M. (2015). *Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review*. <https://core.ac.uk/reader/82654366>
- Sánchez-Camargo, C. L., Albajar-Viñas, P., Wilkins, P. P., Nieto, J., Leiby, D. A., Paris, L., Scollo, K., Flórez, C., Guzmán-Bracho, C., Luquetti, A. O., Calvo, N., Tadokoro, K., Saez-Alquezar, A., Palma, P. P., Martin, M., & Flevaud, L. (2014). Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2506–2512. <https://doi.org/10.1128/JCM.00144-14>

- Santos, A. P. D., Carvalho, M. E. de, Meirelles, L. R., & Andrade Junior, H. F. de. (2018). Effect of chaotropes in Chagas disease and leishmaniasis cross-reacting serology assays for epidemiological surveys. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, *51*(5), 665–669. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0391-2017>
- Santos, F. L. N., Celedon, P. A. F., Zanchin, N. I. T., Brasil, T. de A. C., Foti, L., de Souza, W. V., Silva, E. D., Gomes, Y. de M., & Krieger, M. A. (2016). Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of Chronic Chagas Disease. *PLoS ONE*, *11*(8), e0161100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161100>
- Santos, F. L. N., Celedon, P. A. F., Zanchin, N. I. T., Souza, W. V. de, Silva, E. D. da, Foti, L., Krieger, M. A., & Gomes, Y. de M. (2017). Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(3), e0005433. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005433>
- Sartor, P. A., Ceballos, L. A., Orozco, M. M., Cardinal, M. V., Gürtler, R. E., & Leguizamón, M. S. (2013). Trans-sialidase inhibition assay detects *Trypanosoma cruzi* infection in different wild mammal species. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, *13*(8), 581–585. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1125>
- Schaumburg, F., Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2018). Numerical prototyping of lateral flow biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *259*, 1099–1107. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.044>
- Schaumburg, F., Vidoceovich, J. P., Gerlero, G. S., Pujato, N., Macagno, J., Kler, P. A., & Berli, C. L. A. (2022). A free customizable tool for easy integration of microfluidics and smartphones. *Scientific Reports*, *12*, 8969. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13099-z>

- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hajar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., ... Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), e931. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>
- Simón, M., Gil-Gallardo, L. J., Asunción Iborra, M., Carrilero, B., López, M. C., Romay-Barja, M., Murcia, L., Carmen Thomas, M., Benito, A., & Segovia, M. (2019). An observational longitudinal study to evaluate tools and strategies available for the diagnosis of Congenital Chagas Disease in a non-endemic country. *Acta Tropica*, 199, 105127. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105127>
- Song, J., Cha, B., Moon, J., Jang, H., Kim, S., Jang, J., Yong, D., Kwon, H.-J., Lee, I.-C., Lim, E.-K., Jung, J., Park, H. G., & Kang, T. (2022). Smartphone-Based SARS-CoV-2 and Variants Detection System using Colorimetric DNAzyme Reaction Triggered by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) with Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR). *ACS Nano*, 16(7), 11300–11314. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c04840>
- Stagno, S., & Hurtado, R. (1971). [Congenital Chagas' disease. Immunological and diagnostic study by means of immunofluorescence with anti-IgM]. *Boletín Chileno De Parasitología*, 26(1), 20–27.
- Stiehm, E. R., & Fudenberg, H. H. (1966). Serum levels of immune globulins in health and disease: A survey. *Pediatrics*, 37(5), 715–727.
- Suzuki, H. (1988). Comparison of maternal and fetal serum IgG levels at birth. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 40(4), 489–492.

- Teimouri, A., Mohtasebi, S., Kazemirad, E., & Keshavarz, H. (2020). Role of Toxoplasma gondii IgG Avidity Testing in Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(9), e00505-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00505-20>
- Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Coura, J. R., Levin, M. J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A. O., & da Silveira, J. F. (2003). An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of Trypanosoma cruzi recombinant antigens. *Transfusion*, 43(1), 91–97.
- Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., Kesper, N., Coura, J. R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A. C., & Camargo, M. E. (1996). Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of Trypanosoma cruzi in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9), 2143–2147. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.9.2143-2147.1996>
- Umezawa, E. S., & Silveira, J. F. (1999). Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined Trypanosoma cruzi antigens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 285–288. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700051>
- Van Savage, J., Decker, M. D., Edwards, K. M., Sell, S. H., & Karzon, D. T. (1990). Natural History of Pertussis Antibody in the Infant and Effect on Vaccine Response. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(3), 487–492. <https://doi.org/10.1093/infdis/161.3.487>
- Vashist, S. K., Mudanyali, O., Schneider, E. M., Zengerle, R., & Ozcan, A. (2014). Cellphone-based devices for bioanalytical sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(14), 3263–3277. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7473-1>
- Vick, D. J., Hogge, W. A., Normansell, D. E., Burkett, B. J., & Harbert, G. M. (1995). Determination of normal human fetal immunoglobulin M levels. *Clinical and*

- Diagnostic Laboratory Immunology*, 2(1), 115–117.
<https://doi.org/10.1128/cdli.2.1.115-117.1995>
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2), 157–163.
<https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>
- Volta, B. J., Perrone, A. E., Rivero, R., Scollo, K., Bustos, P. L., & Bua, J. (2018). Some Limitations for Early Diagnosis of Congenital Chagas Infection by PCR. *Pediatrics*, 141(Suppl 5), S451–S455. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-3719>
- Volta, B. J., Russomando, G., Bustos, P. L., Scollo, K., De Rissio, A. M., Sánchez, Z., Cardoni, R. L., & Bua, J. (2015). Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother–child binomial samples. *Acta Tropica*, 147, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.026>
- Walt, D. R. (2005). Miniature Analytical Methods for Medical Diagnostics. *Science*, 308(5719), 217–219. <https://doi.org/10.1126/science.1108161>
- Wang, C., Wu, Z., Liu, B., Zhang, P., Lu, J., Li, J., Zou, P., Li, T., Fu, Y., Chen, R., Zhang, L., Fu, Q., & Li, C. (2021). Track-etched membrane microplate and smartphone immunosensing for SARS-CoV-2 neutralizing antibody. *Biosensors and Bioelectronics*, 192, 113550. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113550>
- Weinstein, R. S., Lopez, A. M., Joseph, B. A., Erps, K. A., Holcomb, M., Barker, G. P., & Krupinski, E. A. (2014). Telemedicine, telehealth, and mobile health applications that work: Opportunities and barriers. *The American Journal of Medicine*, 127(3), 183–187.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.09.032>
- WHO. (2002). *Control of Chagas disease: Second report of the WHO expert committee*.
<http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>

- WHO. (2006). *The world health report 2006: Working together for health*. WHO.
- WHO. (2010). *Report 1. Anti-Trypanosoma cruzi Assays Operational Characteristics*.
http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/anti_t_cruzi_assays.pdf
- WHO. (2015). *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire*.
<http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>
- WHO. (2020). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Chagas Disease (American Trypanosomiasis); World Health Organization. <http://www.who.int/chagas/en/>
- Wilchek, M., Bayer, E. A., & Livnah, O. (2006). Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunology Letters*, 103(1), 27–32.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.10.022>
- Wong, R. C. (2009). Regulatory Issues in the Development and Marketing of Lateral Flow Immunoassays. In R. Wong & H. Tse (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay* (pp. 1–13). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_11
- Wu, D., Zhang, J., Xu, F., Wen, X., Li, P., Zhang, X., Qiao, S., Ge, S., Xia, N., Qian, S., & Qiu, X. (2017). A paper-based microfluidic Dot-ELISA system with smartphone for the detection of influenza A. *Microfluidics and Nanofluidics*, 21(3), 43.
<https://doi.org/10.1007/s10404-017-1879-6>
- Xia, L., & Gildersleeve, J. C. (2019). Anti-glycan IgM repertoires in newborn human cord blood. *PLoS ONE*, 14(7), e0218575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218575>
- Xu, X., Akay, A., Wei, H., Wang, S., Pingguan-Murphy, B., Erlandsson, B. E., Li, X., Lee, W., Hu, J., Wang, L., & Xu, F. (2015). Advances in Smartphone-Based Point-of-Care Diagnostics. *Proceedings of the IEEE*, 103(2), 236–247.
<https://doi.org/10.1109/JPROC.2014.2378776>

- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., & Weigl, B. H. (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, *442*(7101), 412–418. <https://doi.org/10.1038/nature05064>
- You, D. J., Park, T. S., & Yoon, J.-Y. (2013). Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. *Biosensors & Bioelectronics*, *40*(1), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.014>
- Zhang, G., Guo, J., & Wang, X. (2009). Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests. In A. Rasooly & K. E. Herold (Eds.), *Biosensors and Biodetection* (Vol. 504, pp. 169–183). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-569-9_12
- Zhang, Y., Lai, B. S., & Juhas, M. (2019). Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*, *24*(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050941>
- Zhdanov, A., Keefe, J., Franco-Waite, L., Konnaiyan, K. R., & Pyayt, A. (2018). Mobile phone based ELISA (MELISA). *Biosensors and Bioelectronics*, *103*, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.033>
- Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, *184*, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G., & Second Satellite Meeting. (2009). A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(7), 1051–1054.

7. ANEXO: Información complementaria

Soluciones utilizadas para la transformación de bacterias *E. coli*:

Solución	Reactivo	Concentración (mM)
ST1 (pH 7)	MOSP	10
	KCl	10
ST2 (pH 6,5)	MOSP	100
	KCl	10
	CaCl ₂	50

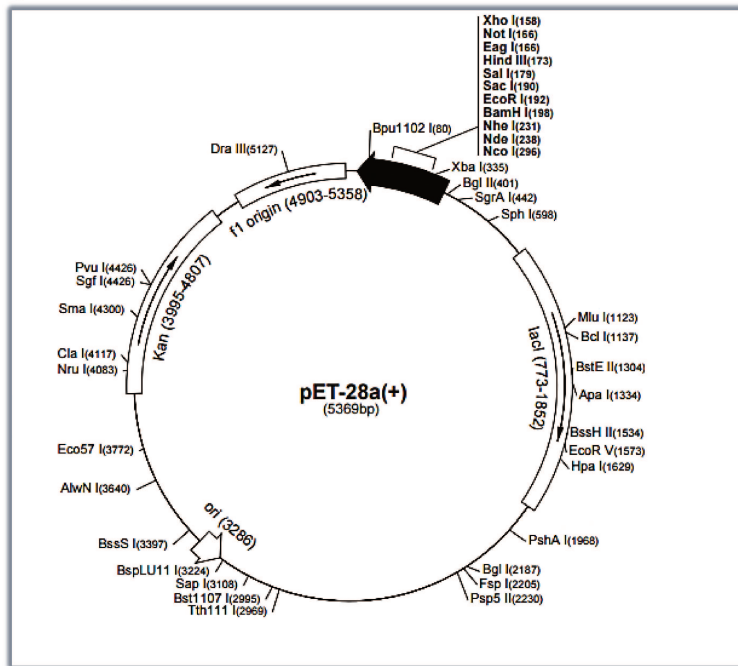
Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias *E. coli*:

Medio de Cultivo	Reactivo	Concentración
LB (pH 7,5)	Peptona	1 % (p/v)
	Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
	NaCl	0,5 % (p/v)
LB-Agar	Medio LB	
	Agar	2 % (p/v)
LB-Glicerol	Medio LB	
	Glicerol	30 %

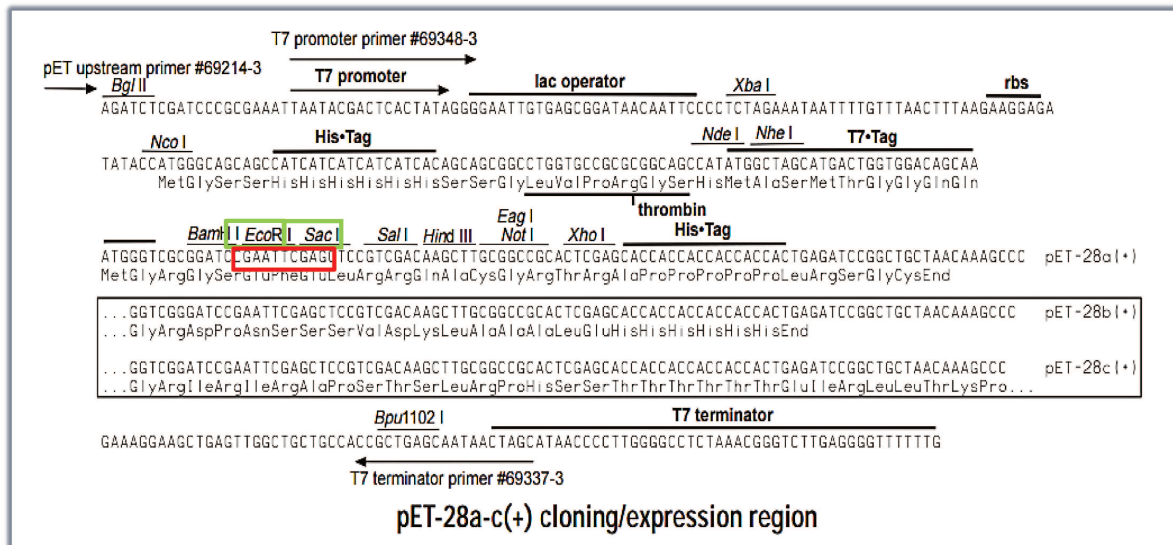
Soluciones utilizadas para los geles de agarosa:

Solución	Reactivo	Concentración
TAE 1X	Tris- pH 8	40 mM
	Ácido acético	20 mM
	EDTA	1 mM
Buffer de muestra	Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)
	Glicerol	Glicerol (v/v)

Esquema del vector pET-28a(+):



Mapa del vector pET -28a(+), en color verde se encuentran marcados los sitios de corte utilizados y en color rojo se encuentra señalada la región en la cual se inserta el fragmento:



Composición de geles y soluciones empleadas en SDS-PAGE:

Solución	Reactivo	Concentración
Gel de apilamiento	Tris-HCl pH 6,8	130 Mm
	SDS	0,05 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4,80 % (p/v)
	TEMED	0,10 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0,05 % (p/v)
Gel de concentración	Tris-HCl pH 8,8	375 mM
	SDS	0,10 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	15 % (p/v)
	Glicerol	10 % (v/v)
	TEMED	10 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0,06 % (v/v)
Buffer de muestra 5X	Tris-HCl pH 6,8	312 mM
	Glicerol	50 % (v/v)
	SDS	10 % (p/v)
	2-mercaptoetanol	12,5 % (v/v)
	Azul de bromofenol	0,5 % (p/v)
Buffer de corrida	Tris-HCl pH 8,3	25 mM
	Glicina	192 mM
	SDS	0,10 % (p/v)
Solución colorante	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,50 % (p/v)
	Etanol	45 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
Solución decolorante I	Etanol	50 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
Solución decolorante II	Etanol	10 % (v/v)
	Ácido acético	7 % (v/v)

Reactivos empleados para el método de cuantificación BCA:

Solución	Reactivo
Reactivo A	0,10 g BCA 2 g Na ₂ CO ₃ .H ₂ O 0,40 g Na OH 0,16 g Tartrato de sodio dihidratado 0,95 g NaHCO ₃ *volumen final de 100 mL
Reactivo B	0,40 g CuSO ₄ * volumen final 10 mL
Reactivo RST	98 volúmenes del Reactivo A + 2 volúmenes del Reactivo B

Reactivos empleados para los Inmunoensayos de Flujo Lateral:

Solución	Reactivo	Concentración
Buffer borato pH 9	Borato	2 mM
Buffer de pad de muestra pH 7,2	PBS NaCl Tween	0,1 M 0,05 % (v/v)
Buffer de conjugado pH 9,0	Borato Sacarosa NaCl Tween Azida	20 mM 5 % (p/v) 0,6 M 0,2 % (v/v) 0,1 %
Buffer de muestra pH 7,2	PBS BSA SDS	0,1 % (p/v) 0,05 % (p/v)

Blastp para el alineamiento de la secuencia SAPAx4 frente a 50 secuencias de *T. cruzi* representativas de distintos UDTs obtenidas en un trabajo previo:

Description	Query Cover	E value
DTU_I_Dm28c_C4863_144.a/626-720	75%	1,00E-31
DTU_I_Dm28c_c1_1717.a/626-723	75%	2,00E-31
DTU_I_Brazil_Cromosoma.11.c/635-732	75%	3,00E-30
DTU_I_Brazil_Cromosoma.27.a/636-733	75%	3,00E-30
AAA03000.1/12-109 chagas antigen partial [Trypanosoma cruzi]	73%	4,00E-30
DTU_V_Bug2148_Contig.465.a/626-723	75%	5,00E-30
DTU_VI_Brener_1047053516879.b/625-722	82%	6,00E-30
DTU_I_Dm28c_c1_1132.a/558-655	82%	6,00E-30
DTU_I_Dm28c_C4863_26.a/625-722	82%	6,00E-30
DTU_V_SC43d_Contig.34.b/625-722	82%	1,00E-29
DTU_I_Brazil_Cromosoma.11.a/635-732	75%	2,00E-29
DTU_V_SC43d_Contig.34.c/558-655	82%	3,00E-29
DTU_I_Dm28c_C4863_136.a/625-722	82%	3,00E-29
DTU_V_SC43d_Contig.34.a/558-655	75%	4,00E-29
DTU_VI_TCC_Contig.34.c/625-722	82%	6,00E-29
DTU_VI_Brener_1047053516005/625-722	82%	6,00E-29
DTU_VI_TCC_Contig.415/558-655	72%	4,00E-28
DTU_VI_Brener_1047053516879.a/625-722	72%	4,00E-28
DTU_V_Bug2148_Contig.16.b/625-722	82%	6,00E-28
DTU_V_Bug2148_Contig.16.a/625-722	82%	6,00E-28
DTU_VI_TCC_Contig.34.b/625-722	75%	5,00E-25
DTU_II_Berenice_Cromosoma.53.a/625-717	80%	1,00E-22
DTU_V_Bug2148_Contig.66.b/626-723	80%	4,00E-22
DTU_II_Y_C.14.a/625-722	80%	6,00E-22
DTU_V_Bug2148_Contig.465.b/626-723	80%	1,00E-21
DTU_V_Bug2148_Contig.66.a/626-723	80%	6,00E-21
DTU_I_Dm28c_c1_1132.b/626-723	82%	6,00E-20
DTU_I_Dm28c_C4863_69.a/626-723	75%	1,00E-19
DTU_I_Dm28c_C4863_69.b/626-708	70%	3,00E-19
DTU_V_Bug2148_Contig.589.a/625-721	73%	2,00E-17
DTU_V_Bug2148_Contig.2.a/625-722	80%	4,00E-16
DTU_I_Dm28c_c1_2013.a/625-722	80%	3,00E-15
DTU_I_JR_cl_4.b/625-703	80%	4,00E-13
DTU_I_JR_cl_4.a/625-703	80%	4,00E-13
DTU_V_Bug2148_Contig.2.b/625-708	80%	1,00E-12
DTU_I_Brazil_Cromosoma.16.a/635-712	80%	3,00E-12
DTU_I_Brazil_Cromosoma.14.a/635-712	80%	3,00E-12
DTU_VI_Brener_1047053517089/625-724	80%	3,00E-12
DTU_VI_TCC_Contig.24.a/625-724	83%	9,00E-11
DTU_VI_Brener_1047053516589/625-724	83%	9,00E-11
DTU_II_Y_C.26.a/625-724	83%	9,00E-11
DTU_VI_TCC_Contig.34.d/625-695	35%	1,00E-10
DTU_II_Berenice_Cromosoma.7.a/625-724	75%	2,00E-08
AAA99444.1/604-642 trans-sialidase [Trypanosoma cruzi]	20%	4,00E-07
EU805799_Brener_TS_Activa/604-642	20%	4,00E-07
EU805798_Brener_TS_Activa/603-641	20%	4,00E-07
EU805797_Brener_TS_Activa/604-642	20%	4,00E-07
DTU_I_Tula_cl2/625-726	27%	0,002