

Determinación de la reactividad de pacientes chagásicos frente a Usados colombianos de Trypanosoma cruzi

Clara Enciso, Marleny Montilla, María M. Santacruz, Adriana Rodríguez, Marcela Mercado, Fernando Rosas, Víctor Velasco, Concepción Puerta · Bogotá, D.C.

Objetivo: comparar la reactividad antilisados de cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* entre pacientes chagásicos asintomáticos y sintomáticos.

Métodos: se seleccionaron tres cepas colombianas del parásito procedentes de diversas áreas geográficas, huésped y ciclo de transmisión, las cuales se analizaron mediante PAGE-SDS. Los pacientes se clasificaron en tres grupos. Grupo I: donantes de sangre, positivos para la infección por *T. cruzi*, que no presentaban manifestaciones clínicas de la enfermedad; Grupo II: pacientes con cardiomiopatía chagásica y Grupo III: donantes de sangre, negativos para la infección por *H. cruzi*. Las muestras de sueros se analizaron mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) utilizando como antígeno una mezcla de los tres lisados del parásito. Los resultados se evaluaron según la prueba t-student.

Resultados: el análisis de PAGE-SDS de los lisados demostró que las cepas presentaban diferentes perfiles de fracciones proteicas, de manera que se decidió utilizar una mezcla de los mismos para ampliar el repertorio de proteínas a ser reconocidas por los sueros.

Por otra parte, se evidenció que 100% de los pacientes del grupo II reconocían el antígeno, así como también 86% del grupo I, mientras que 18% de los pacientes del grupo II reaccionaron contra los lisados. Adicionalmente, se observó cómo los índices de reactividad fueron significativamente más altos en los pacientes sintomáticos que en los asintomáticos.

Conclusiones: los resultados indican que los pacientes colombianos difieren en su reactividad promedio anti-*H. cruzi*, dependiendo del estadio de la enfermedad en que se encuentren, siendo más alta la reactividad en los sintomáticos que en los asi-ntomáticos. (*Acta Med Colomb* 2002; 27: 108-114)

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, respuesta inmune humoral, ELISA.

Introducción

Los protozoos, parásitos pertenecientes a la familia *Tripanosomatidae* son responsables de un grupo de enfermedades que afectan al hombre y a varias especies animales salvajes y domésticas. Dentro de esta familia se encuentra el *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (1). Esta enfermedad involucra tres fases distintas: la primera o aguda que ocasiona la muerte en aproximadamente 10% de los casos, en su mayoría niños, la segunda o indeterminada o crónica asintomática, la cual compromete cerca de 40% de los casos serológicamente positivos, y la tercera o crónica, la cual se caracteriza por la existencia de cardiomegalia o megasíndromes intestinales (1,2).

En Colombia, esta enfermedad se caracteriza por tener una presentación variable con un amplio espectro clínico que abarca pacientes infectados asintomáticos que no desarrollan la enfermedad, o que desarrollan una sintomatología leve compatible con miocarditis chagásica y pacientes que pre-

sta. Clara Enciso: Estudiante de Bacteriología, Universidad Javeriana; Dra. Marleny Montilla, Msc: Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud; Dra. María M. Santacruz: Instituto Nacional de Salud; Adriana Rodríguez, Msc.: Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad Javeriana; Dra. Marcela Mercado: Unidad de Epidemiología, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Universidad Javeriana; Drs. Fernando Rosas y Víctor Velasco, Msc.: Departamento de Electrofisiología, Clínica Shaio; Dra. Concepción J. Puerta, Ph.D.: Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.

sentan falla cardíaca y muerte súbita secundaria a una cardiomiopatía dilatada (3).

Infelizmente, la mayoría de las infecciones por *T. cruzi* son detectadas en la fase crónica de la enfermedad, en la cual el tratamiento directo contra el parásito es muy controvertido.

Por su parte, los pacientes infectados asintomáticos revisiten un gran problema no sólo en el banco de sangre, sino clínicamente ya que se desconoce el momento en el cual el paciente inicia la fase crónica y por lo tanto debe empezar a ser revisado y tratado médicamente. Por lo tanto, se requieren sistemas indicadores de la transición de un estadio a otro de la enfermedad.

Dado que algunos estudios evidencian la existencia de antígenos del parásito, expresados diferencialmente y/o reconocidos en cada una de las fases de la enfermedad (4-9); en el presente trabajo se pretendió comparar mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) la reactividad frente a lisados del parásito entre pacientes chagásicos asintomáticos y sintomáticos, con el fin de explorar el uso de esta técnica como sistema para diferenciar ambos grupos de pacientes. Adicionalmente, dado que la mayoría de los bancos de sangre del país utilizan como antígenos cepas extranjeras en las pruebas de tamizaje, se decidió evaluar la respuesta anti-*T. cruzi* mediante el uso de cepas colombianas como antígeno.

Material y métodos

Pacientes

Se trabajó con el suero de 59 individuos agrupados de la siguiente manera:

(I) **Grupo I:** 14 donantes asintomáticos de la Cruz Roja Colombiana, positivos para la infección por *T. cruzi* según las pruebas de CHAGATEK (ELISA Organon) e IFI (Laboratorio Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), U. Andes), (II) **Grupo II:** 18 pacientes de la Clínica Shaio Bogotá (Colombia) con sintomatología compatible de miocarditis chagásica y positivos a la infección por *T. cruzi* por las pruebas de EIA (ELISA Abbot) e IFI (CIMPAT) y (III) **Grupo III:** 27 donantes saludables de la Cruz Roja Colombiana, catalogados como negativos en dicha institución para la infección por *T. cruzi*, debido a que presentaron uno de los siguientes perfiles: (a) prueba CHAGATEK negativa, o (b) prueba CHAGATEK positiva e IFI negativa.

Adicionalmente, se recolectaron 20 muestras de sangre provenientes de personas sanas de alrededor de 20 años de edad, las cuales no habían vivido en zonas endémicas para la enfermedad de Chagas. A partir de dichas muestras se obtuvo el punto de corte de la prueba de ELISA. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.

Parásitos

Se trabajó con tres cepas de *T. cruzi* aisladas de *Rhodnius prolixus*, *Didelphis marsupialis* y humanos, representando

los ciclos de transmisión doméstico y silvestre, procedentes de distintas regiones geográficas del país (Tabla 1).

Los parásitos se cultivaron en medio REI modificado, suplementado con 2% SFB (suero fetal bovino) a 24°C y gentamicina 100 mg/ml (10).

Lisados de *T. cruzi*

Los parásitos se recolectaron por centrifugación a 900 g a 4°C y se lavaron con PBS. Posteriormente, se contaron en la cámara de Neubauer y se resuspendieron en solución de lisis (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, bisulfito de sodio 380 ng/mL, NP40 1%, SDS 1%, PMSF 1mM, aprotinina 0.5 mg/mL) a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL (11). Una vez resuspendidos, los parásitos se sometieron a diez ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido y baño serológico a 37°C, respectivamente. Pasado este proceso, se centrifugaron a 7.000 g, a 4°C y se extrajo la fracción proteica de cada lisado y se hicieron alícuotas que se almacenaron a -70°C. Finalmente, la concentración de proteínas se midió según el método de Bradford (12).

PAGE- SDS

La fracción proteica de los lisados se separó electroforéticamente en un gel de poliacrilamida - sodio dodecil sulfato (PAGE-SDS) al 10%, utilizando una concentración de 200 mg de lisado/pozo de corrido. Las bandas resultantes se visualizaron mediante la tinción azul de Coomassie (13).

Los pesos moleculares se determinaron mediante comparación de la movilidad electroforética de las fracciones con las de un patrón de calibración que incluye proteínas con un rango de peso molecular de 212.000 a 53.000 daltons (Pharmacia-Biotech).

Prueba de ELISA

La presencia de reactividad anti-*T. cruzi* se determinó en el suero de los grupos de estudio mediante ELISA, siguiendo la técnica descrita por Arciniegas y col. 2000 (14) con algunas modificaciones: placas de 96 pozos de poliestireno (Nuclon TM surface, Nalge Nunc, International) se cubrieron con 100 ml del antígeno (mezcla de las tres cepas del parásito por partes iguales) en buffer bicarbonato de sodio 0.05 M pH 9.6, a una concentración final de 10 mg/pozo. Los microplatos luego de ser incubados a 37°C durante tres horas y a 4°C durante toda la noche, se lavaron con TBS-T (TBS-Tween 20 0.1%, v/v). A continuación, los sitios de unión del pozo no saturados se bloquearon con TBS-T y leche descremada al 5% (w/v) durante una hora a 37°C.

Después de lavar los microplatos tres veces con TBS-T se adicionaron las muestras de suero diluidas 1/10 en solución de bloqueo. Cada una de las muestras se analizaron por triplicado.

Posteriormente las placas se incubaron durante una hora a 37°C y se lavaron cuatro veces con TBS-T. 100 ml del conjugado anti Ig G humana acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/30.000 en solución de bloqueo, se adicio-

naron a cada pozo, seguido de la incubación de las placas a 37°C por una hora. Después de lavar tres veces con TBS-T, se adicionaron 100 ml del sustrato (p-nitrofenilfosfato, Sigma). Pasados 30 min, se frenó la reacción con NaOH 1N, determinándose la densidad óptica a 405 nm, en un lector de ELISA automático (Labsystems multiskan MCC/340). En cada microplato se montó un control positivo alto, un control positivo bajo (cerca al punto de corte) y un control negativo. Adicionalmente, los niveles de "background" de la absorbancia con TBS-T se sustrajeron de cada una de las muestras de suero. Las diluciones óptimas de las muestras de suero y conjugado, así como la concentración del antígeno/pozo, se establecieron mediante estandarización de la prueba, de manera que las mismas permitieran la máxima diferenciación entre sueros positivos y negativos. El punto de corte de la prueba se estableció como la media del valor de los sueros controles normales (20 sueros de personas sanas no infectadas), más o menos dos desviaciones estándar. La positividad o negatividad de las muestras frente al antígeno se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de reactividad} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo bajo}}$$

Si la absorbancia de la muestra era mayor de 1.1, ésta se consideraba positiva, y si era menor de 0.90, negativa. Las muestras ubicadas entre 0.90 y 1.1 se situaron en la zona gris de la prueba, considerándose por lo tanto, dudosas.

La diferenciación de la respuesta entre los tres grupos de estudio se estableció mediante la prueba t student para la diferencia de medias con un error de α de 0.05.

Resultados

Análisis de los lisados del parásito

En primer lugar, la concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Tal como se esperaba, la concentración total de proteínas fue similar en los tres lisados (Tabla 1). Por su parte, el análisis de PAGE-SDS reveló la presencia de alrededor de 20 fracciones proteicas bien definidas situadas en un rango de 26 a 138 Kd, en cada uno de los lisados (Figura 1). No obstante, llama la atención cómo los tres lisados difieren en el perfil de fracciones proteicas que contienen. Es así como si bien existen fracciones compartidas por los tres lisados (fracciones designadas como 1, 3, 8, 11,12 y 13 en la Figura 1), existen otras

presentes sólo en dos (2, 4, 6, 9, 10, 16, 17 y 19) o incluso sólo en uno de los lisados (5, 7, 14, 15, 18 y 20).

Determinación de la reactividad de pacientes chagásicos frente a una mezcla de lisados de tres cepas colombianas de *T. cruzi*

Una vez determinadas las condiciones del ensayo, se procedió a realizar el ELISA analizando por triplicado cada una de las muestras de estudio. La positividad de cada una se determinó según el índice de reactividad con el fin de eliminar las variaciones de la absorbancia entre placas.

Reactividad de los donantes positivos

Dado que la reactividad se consideró positiva por encima de un índice de 1.1, en primer lugar se determinó si el índice promedio de este grupo era mayor de 1.1. Para ello, se realizó una prueba t-student para la media con un α de 0.05, encontrándose que el índice promedio era mayor de 1.1 con una $p = 2.4 \times 10^{-6}$. Posteriormente, se determinó la distribución de los índices de reactividad en este grupo.

Tal como se muestra en la Figura 2, la mayoría de los sueros se ubicaron por encima del índice promedio de reactividad de 6.57 (DS = 2.75). Mientras que tan sólo un suero se ubicó en la zona gris en el límite superior, y otro, fue francamente negativo. Estos resultados indican por una

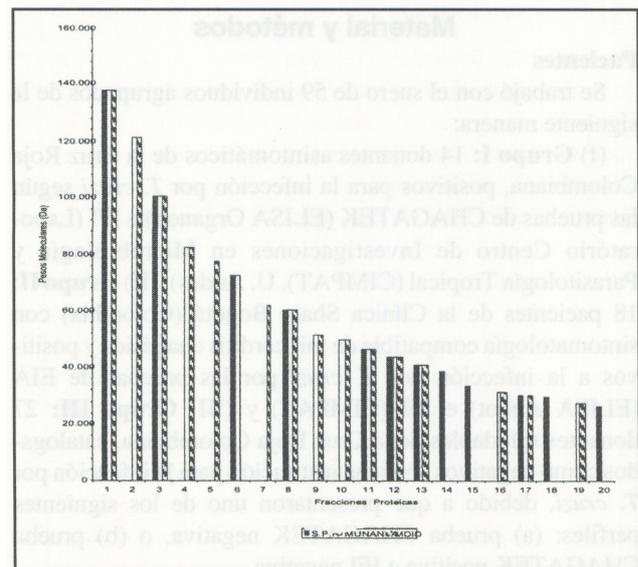


Figura 1. Perfil de las fracciones proteicas de los Usados de las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Tabla 1. Características de las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Cepa	Código	Huésped	Procedencia	Ciclo de transmisión	Concentración de proteínas
Munantá	IRHO/CO/98	<i>R. prolixus</i>	Boyacá	Domiciliaria	12,4 mg/ml
S.P.R	MHOM/CO/87	Humano	Casanare	Domiciliaria	12,6 mg/ml
MDID	MDID/CO/87/Nº3	<i>D. marsupialis</i>	N. Santander	Silvestre	14 mg/ml

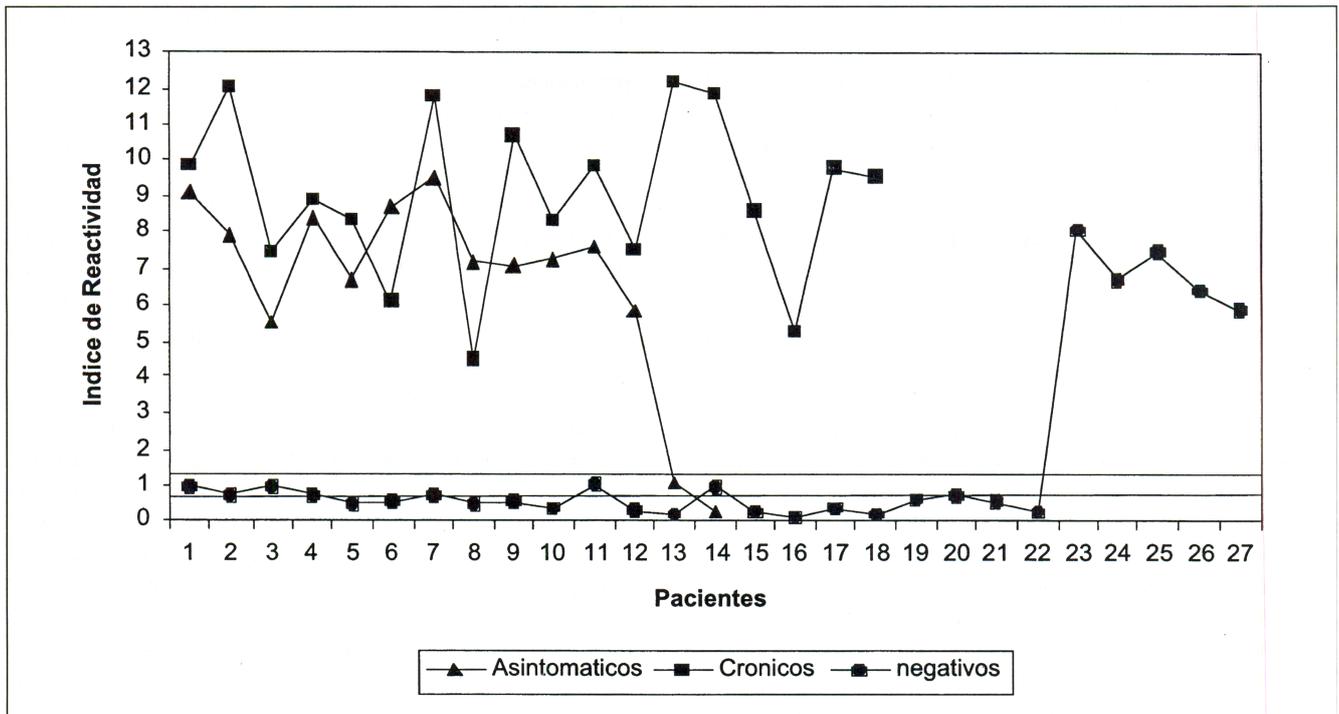


Figura 2. Distribución de los índices de reactividad en pacientes chagásicos crónicos, donantes positivos asintomáticos y donantes negativos. Las líneas indican la zona gris de la prueba de ELISA.

parte como 12 de los 14 pacientes (86%) reconocen ampliamente los determinantes antigénicos de las tres cepas colombianas utilizadas en este estudio; en tanto que un 7% (1/14) los reconoce parcialmente y el otro 7% (1/14) restante tiene una respuesta francamente negativa.

Reactividad de los pacientes crónicos sintomáticos

En cuanto a la reactividad del grupo II se encontró cómo todos los pacientes presentaban índices de reactividad mayor a 1.1 ($p = 2.108 \times 10^{11}$), con un promedio de índice de reactividad de 9.046 (DS 2.29) indicando la alta reactividad de estos sueros frente al antígeno, localizándose la respuesta dentro de un rango inferior de 5.3 hasta uno superior de 12.2 de reactividad (Figura 2).

Adicionalmente, es importante destacar cómo el 100% de estos pacientes (18/18) coinciden en su respuesta de carácter positivo con las pruebas de CHAGATEK e IFI, anteriormente empleadas.

Reactividad de los donantes negativos

El análisis de la reactividad de los donantes negativos muestra cómo el promedio del índice de reactividad se localiza en 1.73 (DS 2.56), es decir, es mayor a 1.1, lo cual sugiere que no todos los pacientes son negativos; tal como lo demuestra la distribución del índice de reactividad de estos pacientes (Figura 2), donde el 66.7% (18/27) son francamente negativos, el 14.8% (4/27) se ubican en la zona gris y el 18.5% restante (5/27), son francamente positivos.

Cuando se analiza la respuesta entre los pacientes negativos a una sola prueba (CHAGATEK negativos) y los dudosos (CHAGATEK positivos e IFI negativo) se encuentra que de los nueve pacientes negativos por CHAGATEK sólo uno presentó una alta reactividad frente a los lisados de las tres cepas colombianas. Mientras que de los 18 pacientes que presentaron CHAGATEK positivo e IFI negativo, cuatro individuos presentaron índices altos de reactividad frente a las cepas colombianas y tres se situaron en la zona gris de reactividad.

Comparación de la reactividad frente a lisados de cepas colombianas de *T. cruzi* entre los diferentes grupos de estudio

El siguiente aspecto por analizar según los objetivos planteados fue el análisis de la diferencia de promedios del índice de reactividad entre los grupos con un α de 0.05, mediante la prueba t-student. Cuando se comparó la reactividad frente a los lisados del parásito entre los diferentes grupos se observó cómo en primer lugar existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes infectados (Grupo I y Grupo II) y los no infectados (Grupo III) ($p < 0.05$). Así mismo, cuando se compararon el grupo I con el grupo III se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 2.3 \times 10^{-4}$). Igualmente, al comparar la respuesta de los pacientes crónicos, con la del grupo III, también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 1.65 \times 10^{-12}$). Finalmente, cuando se compararon los grupos I y II se observó cómo

estos grupos se diferencian estadísticamente con una $p=0.0093$. Es decir, esta prueba también discrimina entre pacientes infectados asintomáticos y sintomáticos.

Comparación de las pruebas de CHAGATEK, IFI, y ELISA

Finalmente, la correlación entre el ELISA desarrollado en este trabajo, e IFI y entre la prueba de ELISA y CHAGATEK se determinó a través del índice Kappa de concordancia. Para ello se tuvieron en cuenta los sueros de los pacientes de los grupos I y III. El grupo II se descartó porque no tenía la prueba de CHAGATEK.

En primer lugar, el índice Kappa entre el ELISA y el IFI fue de 0.62, el cual según la clasificación de concordancia es bueno. Por su parte, el índice Kappa fue de 0.243 entre CHAGATEK y el ELISA, catalogado como regular.

Discusión

En este trabajo se desarrolló una prueba de ELISA con la finalidad de comparar la respuesta anti-*T. cruzi* entre pacientes chagásicos colombianos sintomáticos y asintomáticos. Para ello, en primera instancia se analizaron mediante PAGE-SDS los lisados de tres cepas colombianas que variaban en huésped, ciclo de transmisión y región geográfica de origen (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran cómo estas cepas difieren tanto en el número como en la clase de fracciones proteicas que contienen. De manera que al usar un "pool" de estos lisados como antígeno se amplía el número de determinantes antigénicos a ser reconocidas por los sueros.

Por otra parte, la variación en el contenido de proteínas entre las tres cepas estudiadas, se explica por la naturaleza polimórfica del *T. cruzi*, el cual varía biológica, bioquímica y genéticamente entre poblaciones de diferentes regiones geográficas (15). Estudios recientes de Souto y col., 1996 (16); Bastrenta y col., 1999 (17) y Dos Santos y col., 1999 (18), indican cómo las poblaciones de *T. cruzi* se dividen principalmente en dos subpoblaciones: grupo 1, correspondientes al Zimodema ZI y grupo 2, correspondiente al Zimodema Z2. Aun cuando las tres cepas colombianas de *T. cruzi* utilizadas en este estudio pertenecen al grupo 1 o Zimodema ZI, éstas presentan patrones polimórficos para algunas isoenzimas. Concretamente para las peptidasas I y II (PEP I y PEP II), glutamato deshidrogenasa (GdNad), fosfoglucomutasa (PGM) y glucosa fosfato isomerasa (GPI) (19). Es decir, a pesar de pertenecer a un mismo grupo, estas cepas difieren bioquímica y genéticamente.

El análisis de la reactividad anti-*T. cruzi*, al interior de cada grupo muestra en primer lugar cómo la mayoría de los donantes positivos son reconocidos por esta prueba. La falta de reactividad de los dos sueros que arrojaron resultados negativos, pero que habían sido catalogados anteriormente por dos pruebas de principio serológico diferente como positivos, sugiere que el reconocimiento inmune está dado tanto por la presencia de determinantes antigénicos en

los lisados de parásitos [los cuales difieren dependiendo de la cepa y del procedimiento de lisis empleados (20)] como por las características genéticas propias del individuo que le permiten responder a los mismos.

Por su parte, el grupo de pacientes crónicos sintomáticos fueron reconocidos en su totalidad, tanto por el ELISA desarrollado en este trabajo, como por las pruebas CHAGATEK e IFI. Estos resultados concuerdan con lo informado por Salles y col., 1996 (21), quienes encontraron que las pruebas serológicas de principios diferentes muestran concordancia en poblaciones con elevados niveles de anticuerpos contra *T. cruzi*.

En cuanto a los donantes negativos, llama la atención la elevada reactividad de cinco de ellos, la cual en un principio podría deberse a una errónea asignación de estos pacientes al grupo III. La Organización Mundial de la Salud estipula que un individuo que presenta dos pruebas serológicas con resultados diferentes, se considera positivo para la infección por *T. cruzi*, si dicho paciente es positivo ante una tercera prueba, como sucede en este caso (22). No obstante, no se puede descartar el hecho de que el uso de la fase epimastigota como antígeno, favorece la aparición de falsos positivos y reacciones cruzadas con otras infecciones, principalmente con leishmaniasis visceral (23).

Por su parte, la comparación de la reactividad entre los tres grupos de estudio, indica cómo el índice promedio de reactividad de los pacientes colombianos varía según el estadio de la enfermedad en que se encuentre el paciente. Resultado que concuerda con la existencia de variabilidad en la respuesta inmune entre las diferentes fases de la enfermedad de Chagas, en pacientes de otros países latinoamericanos (4-9, 24-28).

De otra parte, hay que destacar también cómo el índice promedio de reactividad anti-*T. cruzi* aumenta conforme se progresa al estadio crónico de la enfermedad. Este hecho también se ha observado al analizar la reactividad anticelulogénica tipo IV en pacientes chagásicos (14) y antihistonas en el modelo de leishmaniasis canina visceral (29). En contraste, la respuesta blastogénica de células mononucleares de sangre periférica de pacientes chagásicos frente a lisados de tripomastigotes de *T. cruzi* se encuentra significativamente disminuida en pacientes sintomáticos en comparación con los pacientes asintomáticos (26). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la prueba de ELISA frente a antígenos totales del parásito se puede explorar para el monitoreo de la transición de pacientes asintomáticos a sintomáticos. No obstante, habría que afinar y determinar los rangos de reactividad, quizás mediante el uso de las fases amastigotas y/o tripomastigotas del parásito como antígenos.

Finalmente, la comparación de las tres pruebas serológicas utilizadas en este estudio demuestran cómo de acuerdo con lo reportado por Salles y col., 1996 (21), las pruebas serológicas para Chagas en general presentan poca concordancia entre sí, cuando se aplican a poblaciones con bajos

niveles de anticuerpos contra *T. cruzi*; como es el caso de los donantes de este estudio, procedentes en su mayoría de la ciudad de Bogotá, área no endémica para la enfermedad de Chagas. Adicionalmente, vemos como a pesar de tener el CHAGATEK y el ELISA, el mismo principio serológico, estas técnicas difieren ampliamente presentando un índice Kappa de regular correlación (0.243). Esta discrepancia puede ser debida a algunos de los siguientes hechos o a una combinación de los mismos:

(1) La procedencia geográfica de las cepas. Mientras CHAGATEK utiliza cepas argentinas, en nuestro caso se utilizaron cepas colombianas caracterizadas por el desarrollo de afecciones cardíacas y menor virulencia. En contraste, las cepas del cono sur se caracterizan por desarrollar megasíndromes intestinales y presentar mayor virulencia. Además, mientras en Colombia la mayoría de las cepas estudiadas pertenecen al Zimodema ZI (19) en Argentina, se ha detectado la ocurrencia de 12 Zimodemas diferentes, ninguno de los cuales corresponde a los tres Zimodemas ZI, ZII y ZIII, clásicamente descritos por Miles y col., 1980 (30, 31).

(2) El número, ciclo de transmisión y huésped de las cepas usadas como antígeno. En nuestro ensayo se usaron tres cepas que difieren en su ciclo, huésped y región geográfica de procedencia. Aun cuando en el CHAGATEK no es posible conocer las características de la cepa empleada tales como: número de cepas, grupos o zimodemas, procedencia y estadio de desarrollo; difícilmente se podría pensar en un mismo número de cepas de iguales características.

(3) Estadio del parásito utilizado como antígeno. En este trabajo se utilizaron formas epimastigotas procedentes de cultivo *in vitro*. Se conoce bien cómo el parásito exhibe antígenos estadio-específicos, muchos de los cuales se han reconocido como participantes en los mecanismos de infección y respuesta del sistema inmune.

(4) La preparación del antígeno. Estudios realizados por Mendes y col., 1997 (20), indican cómo el proceso de obtención de extractos solubles del parásito, así como las condiciones de centrifugación, afectan profundamente el perfil de antígenos y/o epitopes reconocidos por los sueros. Por su parte, la correlación del índice Kappa entre las pruebas de IFI y ELISA fue mayor, debido probablemente al uso de cepas colombianas en ambos tipos de pruebas. Resultados similares fueron obtenidos por Bucio y col., 1999 (32), quienes obtuvieron una mayor reactividad anti-*T. cruzi* en pacientes mexicanos al usar cepas mexicanas que argentinas.

Por otra parte, las discrepancias entre IFI y ELISA pueden estar dadas por las diferencias en el número de cepas, el grupo o zimodema de las mismas, la procedencia geográfica, el ciclo de transmisión, el huésped de origen, en la preparación del antígeno y la técnica empleada.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Cruz Roja Colombiana, en especial a los Drs. José Marín Chagín y al Dr. José Joaquín Cantor por su valiosa colaboración.

Summary

Objective: to compare the reactivity against lysates of Colombian strains from *Trypanosoma cruzi* between symptomatic and asymptomatic chagasic patients.

Methods: three Colombian strains which differ in their geographic origin, host and transmission cycle, were selected as antigen and analyzed by PAGE-SDS. The patients were classified into three groups. Group I: Blood donors positive for *T. cruzi* infection, Group II: Patients with chronic chagasic cardiomyopathy, and group III: Blood donors negative for *T. cruzi* infection. The sera samples of all patients were tested by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the results were evaluated by the t student test.

Results: the PAGE-SDS analysis showed that strains presented different protein fractions. As a result, we made a pool of the lysated strains in order to increase the number of proteins to be recognized by the sera. The ELISA tests revealed that the 100% of the group II patients recognized the *T. cruzi* antigens, as well as the 86% of the group I; whereas the 18% of the group III patients reacted against the antigen. In addition, it was observed that the index of reactivity against the parasite was higher in symptomatic than in asymptomatic patients.

Conclusions: the results indicate that Colombian patients differ in their anti-*T. cruzi* reactivity, depending on the state of the disease: the symptomatic patients have a higher reactivity than asymptomatic ones.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas'disease, humoral-immune response, ELISA, IFI.

Referencias

1. World Health Organization Expert Committee. Control of Chagas Disease. In: Geneva World Health Organization, Technical Report Series 1991;811:1-95.
2. Tanowitz H, Kirchhoff L, Simon D, Morris S, Weiss, L, Wittner M. Chagas' Disease. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:400-419.
3. Rosas F. Cardiomiopatía de Chagas en Colombia. En: (Vallejo G, JC Carranza, Jaramillo JC, eds.) Memorias del Curso Taller Internacional de Biología, Epidemiología y Control de la Tripanosomiasis Americana y Leishmaniasis. Tolima, Ibagué, Colombia. 2000. LITO- Ediciones pp.11-18.
4. Frash AC, Afranchino JL, Ibañez CF, Reyes MB, Macina R, Luquetti A, Rassi A, Aslund L, Pettersson U. Analysis of cloned *Trypanosoma cruzi* proteins that are antigenic during the acute and chronic phase of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83:345-346.
5. Levin M, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Shuman A, Levi-Yeyati P, Rosenbaum M, Torres H, Segura, E. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41:530-538.
6. Gazzinelli RT, Lerne V, Caneado J, Gazzinelli G, Scharffstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cell and immune sera from patients with Chagas disease. *Infect Immun* 1990;58:1437-1444.
7. Cerban FM, Gea S, Menso E, Vottero-Cima E. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;67:25-30.
8. Guevara AG, Taibi A, Alabian J, Guderian RH, Ouaisi A. Use of a recombinant *Trypanosoma cruzi* protein antigen to monitor cure of Chagas'disease. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1995;89:447-448.
9. Umezawa E, Nascimento M, Kesper N, Coura JR Jr., Borges-Pereira J, Junqueira A, Camargo M. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas'disease. *J Clin Microbiol* 1996;34:2143-2147.
10. Duque S, Peláez D, Corredor A. Cultivo *in vitro* de parásitos de la familia

- Trypanosomatidae*. En: "*Trypanosomatidae*". Manual de procedimientos. Ed. Instituto Nacional de Salud, Bogotá- Colombia. 1993, Cap VI, pp 41.
11. **Santana L, Montilla M, Nicholis S, Puerta C.** Variación antigénica de la cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi* después de pase por ratón. *Biomédica* 1998;**18**:134-140.
 12. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;**72**:248-54.
 13. **Sambrook J, Maniatis T, Fritsh EF.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989, pp 6-19.
 14. **Arciniegas D, Ortegón L, Rodríguez A, Mercado M, Rosas F, Velasco V, Puerta C.** Determinación de la presencia de anticuerpos contra colágeno tipo I y IV en pacientes chagásicos. *Act Med Colomb* 2000;**25**:117-121.
 15. **Dvorak J.** The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J Cell Biology* 1984;**24**:357-371.
 16. **Souto R, Fernandez O, Macedo AM, Campbell D, Zingales B.** DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;**83**:141-152.
 17. **Bastrenta B, Bosseno MF, Barnabe C, Tibayrenc M, Breniere SF.** Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;**94**:323-328.
 18. **Dos Santos W, Buck G.** Polymorphisms at the Topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J Euk Microbiol* 1999;**46**:17-23.
 19. **Rodríguez P, Montilla M, Nicholis S, Zarante I, Puerta C.** Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;**93**:739-740.
 20. **Mendes R, Hoshino S, Moura, S, Mota I, Heredia R, Luquetti A, Leser P.** Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:1829-1834.
 21. **Salles N, Sabino EC, Cliquet M, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendoca M, Dorliach-Llacaer P, Chamone DF, Saez-Alquezar A.** Risk of exposure to Chagas' disease among seroactive brazilian blood donors. *Transfusion* 1996;**36**:969-73.
 22. **Beitran M, Duque S, Guhl F, Herrera CP, López MC, Moreno AL, Nicholis S, Santacruz MM.** Manual de Procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. F.Guhl y Nicholis S. eds. Bogotá: Québécor Imprendes, 2001 :pp 83-86.
 23. **Umezawa E, da Silveira JF.** Serological diagnosis of Chagas 'disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;**94**:285-288.
 24. **Lorca M, Gonzales A, Veloso C, Reyes V, Vergara U.** Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1992;**46**:44-49.
 25. **D' Avila R, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley D.** Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas disease. *J Immunol* 1993;**150**:1611-1618.
 26. **Cetron M, Basilio F, Moraes A, Sousa A, Paes J Kahn SJ, Wener M, Van Voohris W.** Humoral and cellular immune response of adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular response to *T. cruzi* antigens among chagas disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993;**49**:370-382.
 27. **Krautz G, Galvao L, Caneado JR, Guevara-Espinoza A, Ouassi A, Krettl A.** Use of 24- kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2086-2090.
 28. **Brodskyn CI, Barrai A, Bulhoes MA, Souto T, Machado WC, Barral-Neto M.** Cytotoxicity in patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 1996;**105**: 450-455.
 29. **Nieto GC, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I.** Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;**67**:117-130.
 30. **Miles M, Lanham S, De Souza A, Povoá M.** Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1980;**74**:221-237.
 31. **De Lucadoro G, Gardenal C, Perret B, Crisci J, Montamat E.** Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitol Rev* 1993;**107**:405-410.
 32. **Bucio M, Cabrera M, Segura E, Zenteno E, Salazar-Schettino M.** Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Invest* 1999;**28**:257-268.