

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

USO DE ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE
TRIPOMASTIGOTES (TESA) DE *Trypanosoma cruzi* EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

ANA LIDIA CABRERA AGUIRRE

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, septiembre 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

USO DE ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE
TRIPOMASTIGOTES (TESA) DE *Trypanosoma cruzi* EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Informe de Tesis

Presentado por

ANA LIDIA CABRERA AGUIRRE

Previo a optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, septiembre 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

JUNTA DIRECTIVA

DECANO	M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
SECRETARIA	Licda. Jannette Sandoval Madriz de Cardona
VOCAL I	Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo
VOCAL II	Licda. Liliana Vides de Urizar
VOCAL III	Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez
VOCAL IV	Br. Roberto José Garnica Marroquín
VOCAL V	Br. Rodrigo José Vargas Rosales

*“He aquí la prueba para verificar
si tu misión en la tierra ha concluido:
si estás vivo es porque aún
te falta terminarla”*

*Richard Bach
- De Ilusiones -*

ACTO QUE DEDICO

Le dedico este acto de graduación a Dios por ser quien impulsa mis días, quien me dio la convicción de que existe algo más grande por lo cual luchar... incluso más grande que la vida misma. Quien pensó para mí un sinfín de posibilidades, dándome una vida completa, llena de muchos sabores... facetas que me han convertido en la mujer que soy hoy.

A Dios, quien escogió a Lidia y Tono como mis papas, para que con su sacrificio y entrega guiaran mi vida hacia un futuro lleno de oportunidades... mientras crecía al lado de mis hermanos, Juan, Silvia y Walter, luchando por ser mejor gracias a su ejemplo. A ese Dios que nos rodeo de tíos y primos quienes le han dado a nuestras vidas un matiz muy especial y envió a nuestra familia cuatro estrellitas que han llenado nuestros corazones con su ternura y amor: Ivette, Ángela, José y Alejandra, a quien pronto conoceremos...

Por haberme permitido conocer también el tesoro de la amistad, en muchas formas distintas, de mucha gente diferente... especialmente de María Eugenia, Ana Mary, Rebeca, Isabel, María, Anabeatriz, Sandrita, Mabel, Alma, Lilia y Gaby. A través de quienes me permitió conocer la generosidad de su mano, el valor del apoyo, la necesidad de raíces y la libertad del corazón.

Porque en el subir de la montaña puso en mi camino a David, mi compañero en el andar, quien le pone alas a mis sueños...

En definitiva, a Dios por quien he conocido tantos rostros distintos (con miedo de dejar a alguien sin mención), a quien agradezco por las tantas personas a través de las que se ha manifestado para mí regalándome esperanza, amistad y apoyo: los que están y los que me acompañan desde el cielo, especialmente abuelito Juan, abuelito Tavo y abuelita Rosita.

DIOS MIO: este acto es para ti.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y a la Escuela de Química Biológica, por abrir sus puertas para la formación de la juventud guatemalteca y brindarme, a través de sus profesores, los conocimientos y herramientas para retribuir a mi Guatemala el privilegio de ser de esa escasa parte de la población con acceso a la Universidad.

Al departamento de Citohistología, por el apoyo y la guía recibidas para la realización de este trabajo de tesis.

A mis asesoras: Licda. María Paula De León y Licda. Vivian Matta, por sus consejos, dirección y principalmente por su amistad.

A mis revisores: Licda. Amanda Gálvez y Lic. Martin Gil, por su tiempo y contribuciones durante la revisión de esta tesis.

A la Licda. María Eugenia Paredes, Dra. Eufrosina Umezawa, Licda. Evelyn Piedrasanta, Teresita Véliz y Licda. Blanca Samayoa, por su asistencia técnica, teórica y práctica.

Al Departamento de Microbiología, por su apoyo y amistad.

A María Eugenia, por su apoyo y ayuda, pero principalmente por inyectarme la fe que por momentos parecía faltarme.

A todos los que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo de tesis.

ÍNDICE

	Página No.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Generalidades de la enfermedad de Chagas	5
1. Datos históricos	6
2. Distribución geográfica	6
3. Vías de transmisión	7
B. Agente causal	8
1. Ciclo evolutivo	9
2. Características antigénicas	9
C. Patología	12
D. Respuesta inmune	13
1. Respuesta celular	13
2. Respuesta humoral	14
E. Tratamiento	14
F. Prevención	15
G. Diagnóstico	15
1. Etapa aguda	15
2. Etapa latente y crónica	17
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. OBJETIVOS	27
VI. HIPÓTESIS	28

VII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
A. Universo de trabajo	29
B. Muestra	29
C. Recursos	29
1. Recursos humanos	29
2. Recursos institucionales	30
3. Recursos materiales	30
D. Procedimientos (Fase I)	33
1. Cultivo de línea celular Hep-2	33
2. Obtención de tripomastigotes	33
3. Producción y recolección de TESA	33
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
5. Transferencia electroforética	34
E. Procedimientos (Fase II)	35
1. Selección del panel de sueros para la validación de TESA-blot	35
2. Procedimiento técnico para TESA-blot	35
F. Diseño Estadístico	36
1. Tipo de estudio	36
2. Diseño de muestreo	36
3. Análisis de resultados	36
VIII. RESULTADOS	37
A. Fase I	37
1. Obtención de tripomastigotes	37
2. Producción y recolección de TESA	38
3. Inmunoelectroforesis	38
B. Fase II	40
1. Comparación de bandas en aislamientos H-7 y H-64	40
2. Evaluación del funcionamiento de lotes de TESA-blot H-64	40
3. Validación	41

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
A. Fase I	49
1. Obtención de tripomastigotes	49
2. Inmunoelectroforesis de TESA	50
B. Fase II	50
1. Comparación de bandas en aislamientos H-7 y H-64	50
2. Evaluación de funcionamiento de lotes de TESA-blot H-64	51
3. Validación	51
X. CONCLUSIONES	56
XI. RECOMENDACIONES	57
XII. REFERENCIAS	58
XIII. ANEXOS	62

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una tripanosomiasis del continente americano que constituye la cuarta enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial. Es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 16 a 18 millones de personas padecen esta enfermedad y que alrededor de 90 millones de individuos que viven en áreas endémicas se encuentran en riesgo de contraer la infección.

En la etapa inicial de la enfermedad se encuentran parasitemias significativas por lo que el diagnóstico se basa en la búsqueda del parásito. En esta etapa el sistema inmune responde precozmente a la infección produciendo anticuerpos IgM, indetectables en la fase crónica, y hacia la segunda y tercera semana de infección anticuerpos IgG, detectables durante todo el curso de la enfermedad. En las etapas latente y crónica las parasitemias son transitorias, por lo que el diagnóstico depende del hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. La OMS recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias para identificar a un paciente como chagásico.

El estadio presente en la sangre y tejidos del hospedero es el tripomastigote, el cual libera diversos antígenos (mediante excreción-secreción) al espacio extracelular constituyendo la fracción conocida como TESA, que consiste en proteínas de 150-160kDa y varios componentes antigénicos de fase aguda (SAPA) de 130-200kDa, contra los que se producen anticuerpos específicos detectables en pacientes con infección aguda y crónica. Este es el principio de una prueba desarrollada en Brasil denominada TESA-blot, la cual, a través de un inmunoblot utiliza el TESA liberado al sobrenadante de los cultivos de células infectadas con *T. cruzi*.

En varios estudios se ha reportado la existencia de un alto polimorfismo genético y antigénico entre las distintas cepas de *T. cruzi*, y se ha demostrado que el taxón se subdivide en dos líneas mayores: I y II. En México el agente principal de enfermedad de Chagas es *T. cruzi* I, mientras que en países de Sur América es *T. cruzi* II el principal responsable de infección humana. Estos hallazgos confirman la necesidad de desarrollar una técnica que emplee antígenos de aislamientos nativos responsables de la enfermedad en cada país, utilizando para su producción antígenos obtenidos a partir del estadio tripomastigote del parásito.

En la presente investigación se cultivaron 7 aislamientos guatemaltecos obtenidos por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala en la línea celular Hep-2. Se obtuvo el índice de infección necesario para la recolección de TESA en dos de ellos y se concentró el contenido proteico de ambos obteniéndose un mejor rendimiento antigénico con TESA H-64. Se comparó el número y peso molecular de las bandas obtenidas con TESA-blot H-64 y TESA-blot H-7, presentando ambos una banda evidente y constante con peso molecular aproximado de 150 a 160 kDa. Se separaron los antígenos obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa; de esta forma se produjo 8 lotes de TESA-blot H-64 y se evaluó el funcionamiento de los mismos al desarrollarlos como inmunoblot.

La prueba se validó utilizando un panel de sueros evaluados anteriormente mediante el uso de tres pruebas diagnósticas: inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y aglutinación con partículas de gelatina (GPAT). Este panel consistió en 50 sueros positivos, 51 negativos y 14 con serología discordante; así también se validó con TESA-blot Brasil el que fue producido con la cepa Y y donado por la Dra. Eufrosina Umezawa del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. Se obtuvo una sensibilidad relativa de 98.2% (IC 95% 89.4 – 99.9) y una especificidad relativa de 100.0% (IC 95% 98.0-100.0), además de 99.1% de concordancia con el panel de sueros utilizado. La prueba TESA-blot H-64 presentó una correlación del 98.2% con GPAT y de 99.1% con TESA-blot Brasil, siendo estas correlaciones óptimas.

Se evaluó la ocurrencia de reacciones cruzadas de TESA-blot H-64 con 10 sueros positivos para *Leishmania*, obteniéndose 10% de reacciones positivas. Este dato debe confirmarse utilizando una mayor cantidad de sueros y se debe descartar la posibilidad de infecciones mixtas por *Leishmania* y *T. cruzi*.

Con este estudio se demuestra que TESA-blot H-64 puede ser una alternativa en el diagnóstico confirmatorio de casos en los que se sospecha de infección con *T. cruzi*, así como para el diagnóstico de rutina junto a otra prueba como GPAT. Sin embargo, es necesario confirmar los casos en los que se sospeche Leishmaniasis o que sean provenientes de área endémica para la misma.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más importantes en América Latina, habiéndose documentado casos desde el sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia en Argentina. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 16 a 18 millones de personas padecen la enfermedad y que alrededor de 90 millones están en riesgo de contraer dicha infección (1,2).

Se trata de una infección parasitaria causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, que se transmite por medio de vectores, por vía transfusional, congénita y a través del trasplante de órganos. Los vectores, principales responsables de la transmisión, habitan principalmente en regiones rurales; en Guatemala se les encuentra con mayor frecuencia en el este del país (3,4).

La enfermedad se caracteriza por presentar una fase aguda corta con alta parasitemia y una subsecuente fase crónica persistente (5,6). La quimioterapia existente no es satisfactoria ni confiable. La respuesta inmunológica del paciente responde precozmente en el transcurso de la enfermedad con la producción de IgM, mientras que la IgG se produce hacia la segunda y tercera semana de la infección (3).

La forma de diagnóstico de la enfermedad depende principalmente de la fase en la que la misma se encuentre. Durante la fase aguda se encuentran parasitemias importantes, por lo que se busca directamente al parásito por medio de técnicas como el xenodiagnóstico. Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba disminuye hasta casi el 50 por ciento para la detección de casos crónicos. En la etapa crónica las parasitemias son transitorias y el diagnóstico se basa en el hallazgo de anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* y en la clínica de la enfermedad (3).

La mayor parte de técnicas serológicas existentes para realizar el diagnóstico son elaboradas a base de antígenos crudos o purificados de epimastigotes (fase no infectiva del parásito), con los cuales se obtiene un alto porcentaje de reacciones cruzadas principalmente con *Leishmania* (7,8). El uso de antígenos producidos en la fase tripomastigote (fase infectiva del parásito) ha demostrado eliminar dichas interferencias y proporcionar pruebas altamente sensibles y específicas capaces de diagnosticar infecciones agudas, crónicas y congénitas (9).

Por otro lado, *T. cruzi* muestra un considerable polimorfismo genético y antigénico. Varios estudios han demostrado que las cepas existentes y responsables de infección severa en Sur América no son las mismas que las presentes en México y en Centro América. Es por ello que es necesario el desarrollo de pruebas de diagnóstico que utilicen cepas nativas y representativas de la cepa principal causante de infección en cada país (10).

En Brasil se ha demostrado que el uso de los antígenos secretados-excretados por los tripomastigotes al espacio extracelular (TESA), permite realizar el diagnóstico por inmunoblot o ELISA con el mínimo de reacciones cruzadas. Sus estudios reportan que TESA-blot es 100% sensible y específico para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (11).

El objetivo principal de la presente investigación fue utilizar la prueba TESA-blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas con antígenos provenientes de parásitos aislados en Guatemala. Para tal propósito, se evaluaron siete aislamientos de *T. cruzi* realizados en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala de los que se eligió a uno de ellos, el aislamiento H-64. Una vez se obtuvo el TESA-blot se validó utilizando un panel de sueros provenientes de la seroteca del Departamento de Citohistología de la Facultad, los cuales habían sido evaluados con el uso de tres metodologías: aglutinación con partículas de gelatina (GPAT), inmunofluorescencia indirecta IgG (IFI-IgG) y ensayo inmunoenzimático (ELISA-IgG); siguiendo el criterio de OMS (4,8).

Con los datos obtenidos se calculó la sensibilidad y especificidad relativas a la prueba y la concordancia *Kappa* de la misma respecto al panel de sueros utilizado en la validación.

La presente investigación constituye un avance biotecnológico para el país ya que a partir de antígenos de un aislamiento nativo se produjo una prueba serológica altamente sensible y específica, que será de gran utilidad para el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria hemática e hística causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La existencia de la infección depende de la presencia del agente etiológico, de un vector y del hospedero adecuado, representado por el hombre y varios mamíferos domésticos y silvestres (3). Otro miembro de la misma familia y responsable de otra seria enfermedad humana es el protozoo flagelado agente causal de la Leishmaniasis, el cual comparte varios determinantes antigénicos con *T. cruzi* (12).

La enfermedad de Chagas es la cuarta enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial, después de la malaria, la esquistosomiasis y la parasitosis intestinal. Es la enfermedad parasitaria más importante en América Latina en cuanto a la pérdida de capacidades normales en el paciente (1).

Un reporte reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas con esta enfermedad y que alrededor de 90 millones de individuos que viven en áreas endémicas se encuentran en riesgo de contraer la infección (2). Además, existen más de 72,000 casos en México y Centro América (13). El 84% de las formas agudas afectan a los niños antes de los 10 años de edad y el 36% involucra a menores de 1 año de vida. El 75% de los casos son formas benignas, el 20% son formas de mediana gravedad y sólo el 5% se presentan como formas graves (3). En 1996 la OMS reportó que 45,000 personas mueren de la enfermedad cada año (3,12).

La enfermedad de Chagas se desarrolla como una infección de por vida en humanos, quienes sirven como reservorios del parásito. Esta infección se caracteriza por presentar una corta fase aguda con alta parasitemia, que no es diagnosticada en muchos casos, y una subsecuente fase crónica que es persistente (5,6). Debido al riesgo de infección congénita y/o transmisión horizontal por transfusión de sangre infectada, esta enfermedad se ha convertido en un gran problema en regiones no endémicas, sobre todo por el incremento en la migración de personas desde Centro y Sur América hacia países desarrollados (6). Se ha descrito también la forma indeterminada de la enfermedad, la cuál es asintomática en todo el transcurso de la

misma, estimándose que se presenta en 2/3 de los aproximados 18 millones de personas que padecen la enfermedad crónica, la mayoría habitantes de América Latina (14,15).

1. Datos históricos

En 1909 Carlos Ribeiro Justiniano Chagas publicó en Brasil un artículo conocido como “Nueva Tripanosomiasis Humana” en el cual describía una nueva enfermedad, su agente causal, la existencia de un vector invertebrado y la transmisión experimental a mamíferos. En años posteriores describió las formas crónicas de la enfermedad, incluyendo la cardíaca, gastrointestinal y las manifestaciones neurológicas; describiendo en 1911 la infección congénita. La posibilidad de transmisión a través de transfusión sanguínea fue descrita por Mazza en 1936 (14,15).

En 1913 se describió el uso de la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico, en 1914 el xenodiagnóstico y hasta 1970 se documentó el desarrollo de otras pruebas serológicas, como las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI) (15,16).

En Guatemala la investigación sobre la enfermedad de Chagas se inicia en 1932, cuando el Profesor Dr. Edward Reichenow, del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Hamburgo, estudia las fincas cafetaleras de Santa Rosa y Escuintla. Describió un insecto reduvido que por sus características supuso se trataba de *Triatoma dimidiata*, en quienes encontró un 40% de infección con *T. cruzi*. Sus estudios culminaron en el diagnóstico de los dos primeros casos de infección humana en el país, sin embargo, sus conclusiones no dieron la importancia merecida a la enfermedad, por lo que la investigación acerca de esta patología en nuestro país se retardó durante casi 15 años. Fue hasta 1947 que el Dr. Jorge Fernández estudió en el Hospital General San Juan de Dios el primer caso de cardiopatía chagásica con comprobación histológica, con lo que se reinició el estudio de dicha enfermedad (17).

2. Distribución geográfica

La enfermedad de Chagas es una tripanosomiasis del continente americano, habiéndose reportado casos humanos desde el sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia en Argentina (Anexo 1) (18). La transmisión en humanos depende de varios factores,

incluyendo la densidad de reservorios selváticos y domésticos, la densidad y rango de infección de los insectos triatominos y las condiciones de vida y vivienda de las personas (19). La población con mayor riesgo es aquella que vive bajo los 1600 msnm, en zona no tropical y en viviendas aptas para la proliferación del vector (20).

Estudios realizados en Guatemala en 1959 enfatizan que la distribución de los vectores se limita a los departamentos situados al este del país, sin embargo, no existían estudios que abarcaran la totalidad del territorio nacional (20). En 1999 Tabaru y colaboradores confirmaron que los vectores son encontrados con mayor frecuencia en el este del país, en departamentos como Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Zacapa, oeste del Quiché y norte de Alta Verapaz. La evaluación de los vectores en diferentes zonas muestran que se encuentran infectados con *T. cruzi* 38.9% en Zacapa, 37.5% en Guatemala, 25.1% en Santa Rosa, 22.7% en Chiquimula, 8.2% en Jutiapa y 2.3% en Alta Verapaz. Este estudio estima que aproximadamente 330,000 personas viven en el tipo de casas con riesgo en toda la república de Guatemala (Anexo 2) (20).

Los vectores de la enfermedad habitan en viviendas de regiones rurales con características especiales de construcción y uso de materiales como palma, bajareque y barro, construcciones relacionadas a condiciones de pobreza (19,20). De acuerdo al censo realizado en 1994 el 65% de la población guatemalteca vive en área rural, de ellos el 60% vive en casas construidas con paredes de barro las que presentan las características adecuadas para la supervivencia de los vectores (20).

3. Vías de transmisión

Se ha vinculado la enfermedad de Chagas a varias vías de transmisión, siendo la vectorial la más importante. En Guatemala se pueden encontrar como principales vectores de la enfermedad a *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Familia Reduviidae, Orden Hemiptera), conocidos como “chinche picuda” y distribuidos ampliamente en América Latina, desde México a Argentina (3,12,18,20,21).

Existen otras vías de transmisión, de menor frecuencia, como son la transfusión de sangre, la congénita y a través del trasplante de órganos. La transmisión transfusional se considera el segundo mecanismo de infección en zonas endémicas y el principal

mecanismo en zonas libres de vector; ésto es debido al incremento en la migración poblacional, sobre todo desde zonas endémicas hacia zonas no endémicas. El riesgo de transmisión del parásito por transfusión de sangre radica en las características biológicas de éste, ya que sobrevive en sangre total mantenida a 4°C por períodos prolongados, así como en los derivados de sangre, concentrados de glóbulos rojos y crioprecipitados; siendo viables hasta 250 días en muestras con citrato a temperatura ambiente y en sangre refrigerada hasta 18 días (4). En un estudio realizado en 1996, en Bancos de Sangre en toda la República de Guatemala, se encontró que el porcentaje de positividad a *T. cruzi* en donadores que acudieron a bancos de sangre fue de 1.4% de un total de 34,070 muestras procesadas en 1994 y 0.97% de un total de 17,775 muestras procesadas en 1995 (20).

Los casos transmitidos vía congénita, son en su mayoría asintomáticos y disminuyen severamente la posibilidad de supervivencia del recién nacido (22). Esta forma de transmisión puede ocurrir durante cualquier etapa de la infección materna y el parásito puede infectar al feto con o sin compromiso placentario (4).

Se ha sugerido la transmisión debida a la ingestión de carne mal cocinada de animales infectados (23).

B. Agente causal

T. cruzi pertenece al Orden Kinetoplastida y a la familia *Trypanosomatidae*; se caracteriza por presentar un núcleo central, un flagelo y una mitocondria única en la que está situado el kinetoplasto, organela especializada que contiene ácidos nucleicos. Su identificación es simple debido a sus particulares características morfológicas y biológicas, sin embargo, su morfología puede confundirse con *T. rangeli*, flagelado no patógeno transmitido por el mismo vector en algunas áreas de Centro y Sur América (24).

T. cruzi presenta tres estadios durante su ciclo de vida y morfogénesis. El estadio presente en la sangre y tejidos del hospedero es el tripomastigote, que posee su kinetoplasto en el extremo anterior al flagelo y el núcleo central, el flagelo emerge cerca del kinetoplasto. El estadio presente en el insecto vector es el epimastigote, el cual posee su kinetoplasto y flagelo posterior al núcleo. Además presenta un estadio intracelular en tejidos conocido como amastigote, el cual muestra un flagelo inconspicuo (Anexo 3) (24).

1. Ciclo evolutivo

Los insectos triatóminos, por sus características hematófagas, pican al hospedero para alimentarse. Justo después, la chinche expulsa deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* que penetran por las excoriaciones de la piel producidas por el rascado luego del escozor causado por esta picadura (3).

Ingresa al hospedero a través de una puerta de entrada cutánea o mucosa de donde los tripanosomas se diseminan por vía hemática o linfática alcanzando distintas vísceras, preferentemente corazón, sistema nervioso, músculo, sistema retículo-endotelial y aparato digestivo (3).

El protozoo se divide por división binaria multiplicándose y pasando por la forma de amastigote intracelular. En cada localización, se producen fenómenos complejos de destrucción y reacción inflamatoria que prolongan la enfermedad. Después de alrededor de diez duplicaciones, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes circulantes los que, previa ruptura de la célula hospedera, son liberados a la circulación. Los parásitos circulantes invaden otras células del organismo, vuelven a multiplicarse en ellas y a diferenciarse en tripomastigotes, repitiéndose el ciclo. Si bien el número de parásitos circulantes está limitado por la respuesta inmune del hospedero, ésta es incapaz de erradicarlos. El ciclo se cierra cuando otra chinche se alimenta del mamífero infectado. Los parásitos se multiplican en el estómago del vector y son los responsables de la persistencia de la infección en el insecto, así los epimastigotes continúan su progresión por el tubo digestivo hacia la ampolla rectal y allí se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. El insecto al alimentarse de otro mamífero sano eliminará en las heces los tripanosomas infectantes, que al ingresar reiniciarán el ciclo evolutivo natural de la enfermedad (3,6).

Existe gran cantidad de chinches y mamíferos silvestres que perpetúan en la naturaleza la existencia del tripanosoma infectante (Anexo 4) (3).

2. Características antigénicas

Las poblaciones de *T. cruzi* están compuestas por una gran cantidad de cepas que circulan en ciclos selváticos y domésticos que involucran humanos, vectores y reservorios animales. Su aislamiento demuestra un amplio rango de cepas con distintas características. Esta variación intraespecífica ha sido muy investigada mediante caracterización biológica

(morfología de las formas sanguíneas, curvas de parasitemia, virulencia, patogenicidad y susceptibilidad a drogas), parámetros moleculares, farmacológicos, inmunológicos y bioquímicos (24,25).

Las distintas poblaciones han sido estudiadas por análisis de los componentes de superficie de membrana y distribución de bandas en electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) así como con anticuerpos monoclonales, detectando reacciones cruzadas entre los antígenos (24).

Varios autores han sugerido asociaciones entre cepas de *T. cruzi* con patrones de infección, características epidemiológicas y manifestaciones clínicas de la enfermedad (25).

En 1999 Andrade y colaboradores, en un estudio realizado en Brasil, propusieron que las distintas clonas de *T. cruzi* muestran un tropismo diferencial hacia ciertos tejidos. Además, demostraron que presentan diferencias significativas en su composición superficial, como carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas diferencias explican los distintos patrones de asociación de las distintas subpoblaciones de *T. cruzi* con sus vectores y hospederos específicos (25).

T. cruzi muestra un considerable polimorfismo genético. Extensos estudios realizados utilizando la técnica de electroforesis enzimática multilocus (varios loci o genes), por medio de la cual pueden obtenerse patrones de migración específicos para enzimas que permiten distinguir entre cepas, han demostrado que las poblaciones naturales de *T. cruzi* tienen una estructura clonal que ha llevado a la subdivisión del taxón en dos líneas mayores I y II. Cada línea es genéticamente heterogénea y aunque no se han podido diferenciar subdivisiones en *T. cruzi* I, existen 5 subgrupos para *T. cruzi* II en base a análisis de ADN por la técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (10).

Según datos epidemiológicos y ecológicos recolectados en Sur América existe una fuerte asociación de *T. cruzi* II con la enfermedad humana severa y el ciclo doméstico de transmisión, mientras que *T. cruzi* I es preferentemente detectado en ciclos selváticos e infección humana autolimitante en la región del Amazonas (6,25). Un estudio realizado en Argentina por Noia y colaboradores, demostró que todas las infecciones causadas por *T. cruzi* involucran al menos una cepa perteneciente a *T. cruzi* II, no encontrándose infecciones exclusivas por *T. cruzi* I en los pacientes chagásicos estudiados; aunque se observaron algunas co-infecciones I/II. Estos datos hacen necesario reevaluar las cepas

apropiadas para el desarrollo de modelos en el estudio de la patogénesis y el tratamiento de la enfermedad (6).

Bosseno y colaboradores en un estudio realizado en México demostraron que los aislamientos mexicanos pertenecen únicamente a *T. cruzi* I. Esta clasificación debe ser considerada como base para los estudios de diversidad genética y de propiedades biológicas de *T. cruzi*, para establecer si la diversidad clonal tiene un impacto en el comportamiento biológico de los aislados. En México, por lo tanto, se puede considerar que el agente principal de enfermedad de Chagas es *T. cruzi* I, resultados que contrastan con la situación de países de Sur América en donde los parásitos pertenecientes a *T. cruzi* II son los principales responsables de infección humana (10).

Los aislamientos de *T. cruzi* se componen de poblaciones heterogéneas, el cultivo *in vitro* y la inoculación en animales pueden seleccionar ciertas sub-poblaciones de la mezcla. Un largo mantenimiento de *T. cruzi* en animales de laboratorio lleva a alteraciones en las características biológicas de la cepa original, aumentando o disminuyendo considerablemente su virulencia. Su cultivo *in vitro* por largos períodos disminuye la virulencia e infectividad de la cepa en animales de laboratorio. Otros estudios han demostrado que después de pasajes sucesivos en cultivos *in vitro* se detecta una reducción en la metaciclogeñesis disminuyendo la virulencia; un largo mantenimiento de las cepas con estas técnicas es determinante de alteraciones fenotípicas como reducción de la infectividad, virulencia y cambios en los perfiles electroforéticos de enzimas, además de modificaciones genotípicas (26).

Durante todo el proceso de cambio o morfogénesis de epimastigote a tripomastigote metacíclico, a amastigote y a tripomastigote, suceden cambios dinámicos en las estructuras de superficie del parásito y por lo tanto en su genotipo antigénico (27).

Los tripanosomas son incapaces de sintetizar ácido siálico por lo que usan la enzima transialidasa, la que está involucrada en el secuestro del ácido siálico de los sialoglicoconjugados presentes en sangre y otros tejidos del hospedero vertebrado infectado. El ácido siálico es transferido a galactosas terminales presentes en mucinas (proteínas o-glicosiladas) que cubren la superficie del parásito. Se sugiere que éstas y otras moléculas están involucradas en la invasión de las células del hospedero y en la protección contra la lisis por complemento (7,14,28).

La estructura de esta enzima comprende una región globular N-terminal de 642 aminoácidos que contiene actividad catalítica, seguida por una extensión C-terminal de secuencias repetidas llamada SAPA (antígenos secretados de fase aguda) que no son requeridas para la actividad enzimática. La fracción SAPA (grupo de 3 a 6 moléculas) es altamente antigénica y se encarga de la estabilización de la actividad enzimática de los tripomastigotes una vez liberados a la sangre del hospedero infectado (7).

Estudios de marcadores de superficie del parásito han demostrado la existencia de antígenos específicos de cada cepa, además de las glicoproteínas comunes a todas ellas. El antígeno SAPA se ha descrito como tripomastigote específico y el antígeno Ssp4 está asociado a amastigotes (27).

Los antígenos SAPA reaccionan con IgM e IgG en sueros agudos y crónicos anti-SAPA. Se detectaron en un 90% de sueros agudos y en 10-48.7% de sueros crónicos, según un estudio realizado en Brasil por Da Silveira y colaboradores. También demostraron reacción con suero de sangre de cordón de recién nacidos infectados (29).

Actualmente se encuentran en desarrollo diversas técnicas de diagnóstico, las cuáles pretenden buscar antígenos específicos de fase aguda, enzimas parasitarias o ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (4).

C. Patología

La enfermedad de Chagas inicia con una etapa aguda, aproximadamente una semana después de la infección inicial, que en su mayoría cursa sin signos y síntomas relevantes. Entre los síntomas que el paciente puede padecer al inicio de la infección están la fiebre, el agrandamiento de nódulos linfáticos y algún signo de puerta de entrada (14).

El signo de puerta de entrada es una característica importante que puede orientar el diagnóstico temprano, en caso de acudir a la asistencia médica. El signo de Romana (signo oftalmo-ganglionar) es característico del sitio de picadura del vector; se le denomina chagoma cuando la picadura se refiere a otras partes del cuerpo (3).

Durante la fase aguda es posible identificar parásitos circulantes y la evaluación serológica podría revelar anticuerpos IgM contra *T. cruzi* (14). El paciente infectado por medio de vía transfusional puede presentar un cuadro clínico de sepsis caracterizado por hipertermia,

hepatoesplenomegalia y poliadenopatías, chagomas o bien una miocarditis aguda o encefalitis (4).

La infección muestra un curso clínico variable; la mayoría de pacientes permanecen libres de alteraciones en la fase indeterminada, usualmente posterior a la fase aguda, pero otros pueden desarrollar enfermedad crónica severa, con involucramiento cardíaco o gastrointestinal (30).

En un estudio realizado en Venezuela, por Añez y colaboradores, se encontró un 24.6% de seropositividad en pacientes asintomáticos, que según niveles de anticuerpos IgM e IgG 16.7% fueron catalogados como casos agudos, 22.2% como casos crónicos y 61% como casos inaparentes; ninguno de los casos presentaron parásitos circulantes. Los casos inaparentes son considerados como pacientes portadores sanos, asintomáticos desde el punto de vista clínico, negativos para pruebas parasitológicas y seropositivos para *T. cruzi* con bajos niveles de IgM e IgG. La seroconversión sucede eventualmente a formas severas de la enfermedad (31).

La fase crónica inicia dos meses después de la infección inicial, los parásitos ya no son fácilmente detectables en la circulación, pero la evaluación serológica se vuelve positiva. Esta fase se subdivide en indeterminada, cardíaca y digestiva, en base a su forma clínica. La forma indeterminada corresponde a un 60 – 70% de los pacientes en fase crónica, 2-5% de estos pacientes se convierten a formas cardíacas o digestivas cada año. La forma cardíaca corresponde a un 30-40% de casos crónicos. La forma digestiva se manifiesta usualmente como megaesófago y megacolon. Ocurre en aproximadamente 10% de los casos, dependiendo de la región geográfica en estudio (14). La patogénesis del megaesófago chagásico puede estar relacionada con características del hospedero así como a diferentes cepas de *T. cruzi* (23). Las formas digestivas parecen estar ausentes en ciertos países, como Panamá y Venezuela (30).

D. Respuesta inmune

1. Respuesta celular

La respuesta de las células T CD4⁺ por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) contribuye al control de la infección aguda, aunque los antígenos de *T. cruzi* que estimulan esta respuesta CD4⁺ no han sido identificados. Muchas de las proteínas de la familia de transilidasas son proteínas de superficie que son a la vez excretadas y

secretadas al espacio extracelular, por lo que estas quedan disponibles para estimular o inhibir la respuesta de las células T CD4⁺, ya que existen epítomos variables en las mismas que parecieran tener diversos estímulos (32).

El papel de los macrófagos en la inmunidad es muy baja, ya que ellos pueden destruir al parásito, pero son parasitados por *T. cruzi*. En la fase crónica existe un restablecimiento de la respuesta inmune celular, que en muchos casos es insuficiente para controlar las manifestaciones de la enfermedad (32).

2. Respuesta humoral

La respuesta inmune humoral mediante la producción de anticuerpos contribuye a la fagocitosis y participa en la destrucción de los parásitos. El número de parásitos en sangre disminuye, pero el hospedero, al no ser tratado adecuadamente, queda infectado de por vida (33).

La IgM aparece precozmente en el transcurso de la infección, disminuyendo hasta niveles no detectables en la fase crónica. La IgG se produce hacia la segunda y tercera semana de infección, manteniéndose a niveles detectables durante todo el curso de la enfermedad (3). En caso de infección congénita se espera la presencia de IgM fetal específica y la presencia de IgG específica materna en los primeros seis meses de vida y la propia luego del sexto mes (29).

E. Tratamiento

No se han demostrado casos de resolución (infección autolimitada) de la enfermedad de Chagas y por lo tanto siempre que una persona presenta serología positiva es considerada infectada (16). El tratamiento etiológico busca erradicar el parásito, evitar la aparición o progresión de lesiones viscerales e interferir en la cadena de transmisión (4).

El tratamiento se limita para aquellos pacientes diagnosticados durante la fase aguda, pacientes que han sufrido accidentes laborales, individuos inmunosuprimidos en los que puede ocurrir una reactivación de la infección, infección congénita e infección crónica indeterminada en niños y menores de 14 años, otros casos deben ser evaluados (4,14,34). La posibilidad de

acceder a un tratamiento específico curativo únicamente durante la etapa aguda de la enfermedad hace extremar las precauciones para el diagnóstico temprano (4).

Los fármacos tradicionales son Nifurtimox (nitrofurano) y Benznidazol (5'-nitroimidazol), utilizados en el tratamiento de la infección humana por *T. cruzi*, aunque no pueden ser considerados como los fármacos ideales (4).

F. Prevención

De todas las enfermedades transmitidas por vectores, la enfermedad de Chagas es la más asociada a condiciones de pobreza. No existe vacuna contra la enfermedad, y no existe un método satisfactorio y confiable de tratamiento, por lo que la prevención depende del control de los vectores, del mejoramiento en las viviendas y sus materiales de construcción (1).

En algunas áreas las especies de vectores son parcialmente selváticas, por lo que aún con el uso de insecticidas en los hogares, los vectores persisten fuera de las viviendas y la reinfestación de las casas puede ocurrir (1).

Es muy importante que se garantice un estricto control de la sangre a transfundir, control de donantes y reservorios, además de la detección de la infección en la mujer embarazada y el seguimiento del hijo de una mujer portadora. Se debe garantizar el tratamiento etiológico adecuado en pacientes infectados y la evaluación del mismo (35).

G. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en el uso integrado de tres herramientas importantes, que son: clínica, epidemiología y laboratorio. Los exámenes a realizar en el laboratorio dependerán de la etapa clínica que curse el paciente (3,19).

1. Etapa aguda

En la etapa inicial de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes, las que a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas, por lo que el estudio se basa en la búsqueda de *T. cruzi* (4,23).

- a. **Examen directo:** búsqueda del parásito en sangre periférica, ya sea en frotis teñidos con Giemsa o en fresco para evaluar movilidad (16). Es un método 100% específico, pero de muy baja sensibilidad, dando numerosos falsos negativos (4). La sensibilidad alcanza el 92% cuando el operador emplea 45 minutos de lectura en el microscopio (3).
- b. **Método de Strout:** este método concentra los elementos parasitarios mediante centrifugación. La especificidad es del 100% y la sensibilidad es del 95% (4). Se utiliza el suero sanguíneo obtenido de la retracción espontánea del coágulo de 5ml de sangre sin anticoagulante. Éste es separado mediante centrifugación para obtener un sedimento que es observado entre porta y cubreobjetos para la búsqueda del parásito (3).
- c. **Método de Hoff:** utiliza cloruro de amonio 0.87% P/V para lisar eritrocitos con EDTA facilitando así la observación del parásito (16).
- d. **Microhematocrito:** método recomendado en recién nacidos. Tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% (4). Se llenan 6 capilares heparinizados con sangre periférica, se centrifugan y se quiebran entre la capa de leucocitos y eritrocitos. La fracción de glóbulos blancos se vierte entre porta y cubreobjetos. Esta técnica ha probado tener la misma sensibilidad que el método Strout y el xenodiagnóstico. Por el empleo de poco volumen es ideal en el estudio de Chagas congénito y agudo especialmente en niños (3).
- e. **Xenodiagnóstico:** posee una especificidad del 100% y una sensibilidad cercana al 100% en esta etapa, debida a la amplificación parasitaria producida (4). La sensibilidad baja casi al 50% en el diagnóstico de casos crónicos (16). La prueba consiste en la reproducción en condiciones de laboratorio del ciclo natural del parásito en insectos vectores sanos a los que se alimenta con la sangre del paciente. Éstos se incuban entre 25 y 30°C durante 30 a 60 días. La lectura se realiza por observación del contenido intestinal del vector entre porta y cubreobjetos. Este material se obtiene por compresión del abdomen o por homogenizado total del insecto. Debido a la posible presencia de *Blastocrithidias triatoma*, flagelado similar a *T. cruzi* y saprófito del triatomino, el laboratorista debe tener un buen entrenamiento y capacidad de observación para poder hacer la lectura (3,11).

- f. **Hemocultivo:** consiste en incubar sangre venosa en un medio adecuado como LIT, BHI o NNN para obtener el crecimiento parasitario (4). Para ello se preparan de 10 a 20 tubos por paciente y se incuban de 28 a 30°C con agitación cada 24 horas. La lectura se realiza entre 10 a 60 días, por observación de la superficie del cultivo entre porta y cubreobjetos. Algunos autores sostienen que la sensibilidad y especificidad de éste método son similares a las del xenodiagnóstico (3).
- g. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** la alta sensibilidad y especificidad de PCR para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, la cual varía entre 96 a 100%, la convierte en una excelente técnica para el seguimiento quimioterapéutico en pacientes con enfermedad aguda. La sensibilidad de la técnica supera la de técnicas convencionales directas (36). Esta técnica y otras como la inmunohistoquímica han demostrado la presencia de parásitos en órganos infectados y su ausencia en tejidos sanos (30).

2. Etapa latente y crónica:

En las etapas latente y crónica las parasitemias son transitorias, por lo que la detección del parásito es muy difícil a pesar de contar con técnicas muy específicas. El diagnóstico se confirma por la demostración de los anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en el suero mediante técnicas como ELISA, inmunofluorescencia (IFI) o hemaglutinación (HAI) (4,14,35). La serología demora un tiempo en positivizarse según la agudeza del proceso; IFI se hace positiva en 30 días (4).

Ninguno de los métodos es cien por ciento confiable para el tamizaje de donadores en el banco de sangre. Para lo cual se debe seleccionar el valor más bajo posible de punto de corte para así asegurar una alta sensibilidad en la prueba; sin embargo, este hecho incrementa la ocurrencia de falsos positivos (11).

La OMS recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias para identificar a un paciente como chagásico, técnicas que estén basadas en diferentes metodologías o diferentes preparaciones antigénicas (4,8), con lo que se logra definir un 98% de los sueros de pacientes (29). En caso de disparidad se usa una tercera reacción para definir el estado de infectado (3). De las técnicas convencionales las mas usadas son

HAI, IFI y ELISA debido a su simplicidad, bajo costo y buen desempeño en base a su sensibilidad y especificidad (Tabla 1) (10).

Tabla 1. Esquema recomendado para el diagnóstico y control de pacientes ¹

CONDICIÓN	FRECUENCIA	METODOLOGÍA
CHAGAS CONGÉNITA		
Recién nacido 1era. Determinación	Al momento del nacimiento, cada 7 días por 30 días.	Parasitológico: Strout Serológicos: IFI IgM, ELISA IgM
Lactante (6 meses o más) 2da. Determinación	A los 6, 12, 24 y 48 meses.	Serológicos cuantitativos: ELISA, IFI, HAI, etc.
Niño de 1 año 3era. Determinación	12 meses posteriores al tratamiento	Serológicos cuantitativos: ELISA, IFI, HAI, etc.
CHAGAS TRANSFUSIONAL		
Post-transfusional	Pre- y post-transfusión	Parasitológico: Strout Serológicos: ELISA, IFI, HAI, etc.
CHAGAS POR TRANSPLANTE DE ÓRGANOS		
Transplante (donador)	Pre-transplante	Serológicos: ELISA, IFI, HAI, etc.
Transplante (receptor)	Pre-transplante y post- transplante	Parasitológico: Strout Serológicos: ELISA, IFI, HAI, etc.

CONDICIÓN	FRECUENCIA	METODOLOGÍA
CHAGAS POR TRANSPLANTE DE ÓRGANOS		
Transplante (médula ósea)	10 días pre-transplante, 7 días pre-transplante y en el momento del post-transplante	Parasitológico: Strout Serológicos: ELISA, IFI, HAI, etc.
CHAGAS POR OTRAS VÍAS		
Accidente laboral	En el momento y posterior	Parasitológico: Strout Serológicos: ELISA, IFI, HAI, etc.

¹ Tomado de: Tópico I: Enfermedad de Chagas con Parasitemia Evidente. Rev. Arg. Card. 2002;70:15-39.

Los problemas que presentan la mayoría de ensayos serológicos son:

- Obtención de resultados inconclusos con sueros reactivos en zona gris.
- Frecuentes falsos positivos que ocurren especialmente en pacientes con leishmaniasis.
- Incapacidad de dar un diagnóstico de casos agudos o congénitos.
- No permiten el monitoreo serológico de la eficacia de la quimioterapia.

Por estos problemas es necesario mejorar la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad de las técnicas empleadas, para minimizar el número de pruebas requeridas para establecer el diagnóstico (37). Por ello, se han producido antígenos recombinantes de distinto peso molecular, o empleado subfracciones de diferentes estadios del parásito (4). El criterio empleado para conocer el valor diagnóstico de una prueba, es evaluar su capacidad para distinguir una población infectada de otra no infectada. Como no existe una prueba de referencia la evaluación debe hacerse sobre la base de paneles de sueros de referencia, sueros de pacientes con infección comprobada por métodos parasitológicos y de personas no infectadas. Con estos paneles se determina la

sensibilidad y la especificidad de una prueba dada y en condiciones de calibración seleccionadas se fija el título de corte para dicha prueba (3).

La mayoría de métodos utilizados en el diagnóstico indirecto de la enfermedad se basan en la detección de anticuerpos en contra de proteínas totales de *T. cruzi* (antígenos obtenidos de la lisis de epimastigotes o tripomastigotes), fracciones subcelulares y más recientemente proteínas recombinantes (7,8).

Estas pruebas son sensibles, pero frecuentemente fallan en la discriminación entre antígenos específicos de *T. cruzi* y antígenos específicos de *Leishmania*, lo que con frecuencia lleva a resultados falsos positivos. Además, las condiciones de cultivo de parásitos y purificación de antígenos son difíciles de estandarizar, por lo que llevan a resultados variables entre lotes (21,38).

Estas reacciones cruzadas se pueden dar en pacientes con leishmaniasis, *T. rangeli*, sífilis o fiebre reumática (8), lo que puede evitarse con el uso de proteínas recombinantes, mucinas purificadas o métodos Western-blot. La mayoría de estas proteínas purificadas no han sido incluidas en kits por razones técnicas y económicas (29). Normalmente no se identifican parásitos durante esta fase, sin embargo, es posible mediante el uso de la técnica de amplificación por PCR (14,29).

Técnicas moleculares, como clones de genes, expresión y síntesis *in vitro* de los péptidos correspondientes permiten la identificación y evaluación de una serie de antígenos que pueden ser útiles en el diagnóstico y desarrollo de una vacuna. Estudios recientes emplean mezclas de péptidos sintéticos y/o antígenos recombinantes incrementando la sensibilidad de la prueba (Tabla 2) (37,38).

Además, la alta variabilidad observada entre cepas y aislamientos de *T. cruzi* hacen difícil el uso de estas proteínas únicas para el diagnóstico, por lo que el diagnóstico de rutina se enfrenta a numerosos problemas debido a reacciones cruzadas entre proteínas antigénicas disminuyendo dramáticamente la especificidad de las mismas (12,16).

Tabla 2. Proteínas recombinantes o péptidos sintéticos con uso clínico y epidemiológico potencial ¹

ANTÍGENO	PROTEÍNA		LOCALIZACIÓN	USO DIAGNÓSTICO
	NATIVA	KDa		
CRA	225			
Ag 30	180-225		Antígeno citoplasmático	Infecciones crónicas
JL8	>170			
TCR27	150-200			
FRA	> 300		Proteína asociada al citoesqueleto	Infecciones crónicas
Ag1	205			
JL7	> 170			
H49	> 300			
B13	116-140		Proteína de superficie del tripomastigote	Infecciones crónicas
Ag2	85			
TCR39	82			
PEP-2				
Ag36	85		Proteína asociada a microtúbulo	Infecciones crónicas y agudas
JL9	110			
MAP				
SAPA	105-205			Infecciones agudas y congénitas
TCNA				
TS			Transialidasas (Familia TS)	Infecciones agudas y crónicas
Ag13	85			
TcD	260			
B12	200-230			
TcE	35		Proteína ribosomal	Infecciones crónicas

ANTÍGENO	PROTEÍNA		USO DIAGNÓSTICO
	NATIVA	LOCALIZACIÓN	
	KDa		
JL5	38	Proteína P ribosomal	Formas cardiacas
A13	230		Infecciones agudas y crónicas
FCaBP	24		
1F8	24		Monitoreo de cura de
Tc-24	24	Proteína flagelar de unión al	infecciones crónicas
Tc-28	28	calcio	
Tc-40	38-100		Infecciones crónicas
cy-hsp70	70		
mt-hsp70	70	Proteínas de shock térmico	Monitoreo de cura de
grp-hsp78	78		infecciones crónicas
FL-160		Proteína de superficie asociada	Monitoreo de cura de
CEA	160	al flagelo (parecida a familia TS)	infecciones crónicas
CRP			
SA85-1.1	85	Proteína de superficie del	Infecciones crónicas
		Tripomastigote (parecida a	
		familia TS)	
Ubiquitina			Infecciones crónicas

¹ Tomado de: Da Silveira J, Umezawa E, Ostermayer A. Chagas Disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 2001;17:286-291.

Convencionalmente se ha utilizado la hemaglutinación indirecta (HAI) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) combinadas para así compensar la relativa baja sensibilidad de HAI con la alta sensibilidad de IFI y la baja especificidad de IFI con la alta especificidad de HAI. La aglutinación directa (AD) se usa después del tratamiento del

suero con 2-mercaptoetanol lo que aumenta su especificidad. La fijación del complemento (FC) ha caído en desuso por la difícil preparación y la falta de antígenos confiables (16).

- a. **Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** su sensibilidad es del 100% y su especificidad es cercana a 100%. Se consideran títulos significativos las diluciones superiores a 1:32.
- b. **Hemaglutinación indirecta (HAI):** se consideran títulos significativos las diluciones superiores a 1:16.
- c. **ELISA:** en un estudio realizado en Estados Unidos para la detección veterinaria de anticuerpos, la técnica ELISA mostró un 96% de sensibilidad y una especificidad del 97.5% con sueros control. Aunque estos valores dependen de los preparados antigénicos con los que la prueba es elaborada, en este caso la prueba consistía en extractos antigénicos purificados de *T. cruzi* (39).

Se han obtenido resultados contradictorios con diferentes métodos y laboratorios, probablemente debido al uso de diferentes fracciones antigénicas y procedimientos, causando variaciones importantes en sensibilidad y especificidad (11).

Algunos de los problemas comúnmente encontrados en las pruebas serológicas pueden resolverse con el empleo de moléculas de superficie de las formas infectivas de tripomastigotes. Estos antígenos reaccionan con el suero de pacientes en fase aguda y pacientes infectados por vía congénita. Contienen antígenos que son blanco para anticuerpos líticos que solo se encuentran en pacientes con infección activa por lo que también pueden ser útiles en el monitoreo de la cura después del tratamiento (9).

Los anticuerpos IgG e IgM reaccionan en su mayoría con moléculas de superficie del tripomastigote infectivo, sin embargo, la mayor parte de epítomos compartidos por las formas epi y tripomastigote pertenecen a los antígenos internos (9). Resultados preliminares de un estudio realizado en Brasil por Umezawa y colaboradores muestran que el suero de fase aguda reacciona predominantemente con componentes de superficie de tripomastigotes, mientras que el suero de fase crónica reacciona principalmente con componentes internos (23).

- d. **Uso de los antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes (TESA):** varios de los antígenos de superficie del tripomastigote son además excretados-secretados al espacio extracelular, constituyendo la fracción conocida como TESA (9). En Brasil, Umezawa y colaboradores, desarrollaron una prueba inmunodiagnóstica para la

enfermedad de Chagas con el TESA liberado en el sobrenadante de los cultivos de células infectadas con *T. cruzi*, separados por electroforesis en SDS-poliacrilamida y transferidos a filtros de nitrocelulosa, desarrollada como inmunoblot y llamada TESA-blot (2). Producción que no requiere pasos de purificación (Anexo 5) (38).

Los componentes principales de TESA son proteínas de 150-160kDa y varios componentes antigénicos de fase aguda (SAPA) de 130-200kDa. Estudios preliminares muestran que la proteína antigénica de 160kDa puede corresponder a una proteína reguladora del complemento (CRP), además se ha demostrado previamente que la reactividad con la proteína de superficie de 160kDa del tripomastigote puede discriminar entre un paciente curado y un paciente no curado (2). TESA además presenta antígenos de las formas amastigote (37).

La caracterización parcial de TESA muestra que varios epitopos presentes en esta fracción están ausentes en el Extracto Alcalino de Epimastigotes (EAE) utilizado en la prueba de ELISA (38).

Se ha reportado un polimorfismo genético entre las familias de transialidasas de *T. cruzi*. Un estudio realizado en Brasil por Umezawa y colaboradores, demostró mediante TESA-blot que SAPA (130-200kDa) presenta una gran heterogeneidad entre cepas de *T. cruzi*. Por otro lado, 100% de los sueros en fase crónica reconocen la banda de 150-160kDa, por lo que se considera que esta proteína no es polimórfica y es independiente de la región geográfica estudiada (28,39).

Se encontró que los anticuerpos IgG de los pacientes en fase crónica reaccionan con las proteínas de 150-160kDa y no con el suero de pacientes con leishmaniasis; mientras que los anticuerpos IgG/IgM de pacientes en fase aguda reaccionan con los componentes SAPA/transialidasa, consistiendo en proteínas de 130 a 200kDa obteniéndose distintos patrones en escalera (2,5,9).

TESA-blot mostró 100% de sensibilidad y especificidad, y se refiere que dicha técnica permite la discriminación entre las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Esta prueba se recomienda como confirmatoria, en casos que muestran resultados inconclusos con la serología tradicional (2,9). Sin embargo, no es una prueba útil para el ensayo de un gran número de sueros (38). En un estudio, también realizado en Brasil por Vissoci y colaboradores, se muestra que una prueba Western-

blot elaborada con antígenos provenientes de epimastigotes muestra una sensibilidad del 86.8% y una especificidad del 100% (11).

TESA-blot no es útil para el monitoreo terapéutico ya que no permite la determinación de títulos de anticuerpos. El empleo de TESA nativo en una prueba como ELISA, según Umezawa y colaboradores, muestra una alta sensibilidad en pacientes agudos y crónicos aunque muestra un bajo porcentaje de reacciones cruzadas no presentes en TESA-blot (39), representando un 96.4% de especificidad en contraste con el 76.3% de ELISA-EAE. ELISA utilizando TESA permite la determinación de títulos de anticuerpos lo que permitiría el adecuado monitoreo terapéutico (Anexo 6) (38).

IV. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades parasitarias más importantes en América Latina. En Guatemala más de 330,000 personas viven en condiciones de alto riesgo de adquirir la infección.

Las pruebas de diagnóstico en uso en Guatemala están elaboradas en su mayoría con cepas extranjeras de *T. cruzi* y utilizan la fase no infectiva del parásito. Sin embargo, muchos estudios reportan un alto polimorfismo genético y antigénico en *T. cruzi*, además de una variabilidad antigénica entre las distintas fases de desarrollo de una misma cepa, antígenos cambiantes durante el proceso de morfogénesis.

Por esta razón es necesario el desarrollo de una técnica con antígenos provenientes de los aislamientos de *T. cruzi* circulantes en cada país endémico para Chagas y la reevaluación de las técnicas producidas con antígenos extranjeros, ya que los resultados obtenidos con éstas podrían ser erróneos al enfrentarlas con anticuerpos producidos contra cepas nativas. Es por ello que en la presente investigación se eligió un aislamiento guatemalteco obtenido por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para producir una prueba diagnóstica con el mismo principio de TESA-blot elaborado en Brasil por Umezawa y colaboradores.

Dicha prueba se validó utilizando un panel de sueros provenientes de la seroteca del mismo Departamento con la que se calculó la sensibilidad y especificidad relativa y la concordancia *Kappa* con respecto a dicho panel de sueros. La prueba obtenida es una herramienta muy valiosa en el diagnóstico confirmatorio de la enfermedad en aquellos casos en los que se presenta una serología discordante o para su uso combinado con otras en el diagnóstico de rutina.

V. OBJETIVOS

A. Objetivos generales

1. Aplicar la prueba TESA-blot en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de *Trypanosoma cruzi* de aislamientos realizados en Guatemala.

B. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los antígenos TESA y los patrones observados en los aislamientos guatemaltecos obtenidos en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
2. Validar la prueba TESA-blot producida por medio del uso de sueros positivos, negativos e indeterminados para la infección por *T. cruzi*, y positivos para infección por *Leishmania*.
3. Implementar el uso de la prueba producida con antígenos guatemaltecos para la confirmación de casos indeterminados con otras pruebas serológicas.

VI. HIPÓTESIS

1. Los aislamientos guatemaltecos de *Trypanosoma cruzi* obtenidos por el Departamento de Citohistología presentan un patrón de bandas similar de TESA.
2. La concordancia entre TESA-blot elaborado con antígenos de un aislamiento guatemalteco de *T. cruzi* y los sueros de referencia es menor al 75%.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Sueros de pacientes positivos, negativos y con serología discordante para la infección por *Trypanosoma cruzi*, diagnosticados por medio de tres pruebas serológicas diferentes: inmunofluorescencia indirecta, ELISA y aglutinación con partículas de gelatina, obtenidos por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, durante el período de 2000 al 2003.

B. Muestra

La muestra la constituyeron 50 sueros positivos para la infección con *T. cruzi* (3/3 pruebas serológicas de diagnóstico positivas), 51 sueros negativos para la infección con *T. cruzi* (0/3 pruebas serológicas de diagnóstico positivas), 14 sueros con serología discordante (1-2/3 pruebas serológicas de diagnóstico positivas) y 10 sueros positivos para Leishmaniasis, obtenidos por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, durante el período de 2000 al 2003.

C. Recursos

1. Recursos humanos

a. Tesista

- Br. Ana Lidia Cabrera Aguirre

b. Asesoría y capacitación

- Licda. María Paula De León
Depto. de Citohistología/Investigador LAMIR
- Licda. Vivian Matta
Depto. de Citohistología/Programa de Postgrados

2. Recursos institucionales

Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

3. Recursos materiales

c. Equipo

- Campana de flujo laminar
- Pipetor automático
- Microscopio invertido
- Microscopio de luz
- Incubadora a 26°C
- Incubadora a 37°C
- Refrigeradora a 4°C
- Refrigeradora a -10°C
- Refrigeradora a -80°C
- Centrífuga refrigerada
- Contenedor para criopreservado en nitrógeno líquido
- Sonicador de pipetas
- Microcentrífuga
- Cámara de Neubauer
- Contador de células
- Agitador automático de placas
- Gradillas
- Autoclave
- Equipo para electroforesis, MiniProtean®II, BIORAD
- Equipo para transferencia, MiniTrans-Blot®Cell, BIORAD
- Magnetos para agitación
- Agitador magnético
- Bomba generadora de vacío

d. Cristalería

- Botella para cultivo celular 25 cm²
- Tubos con tapón de rosca para centrífuga de 15 y 50 mL
- Pipetas automáticas (0.5-10, 10-100, 40-200 y 200-1000 µL)
- Puntas amarillas y azules
- Frascos de 125 y 500 mL
- Viales para criopreservación de 2 mL
- Beaker de 250, 500 y 1000 mL
- Erlenmeyer de 1000 mL
- Unidades de filtración estériles de 500 mL

e. Reactivos

- Buffer de fosfatos (PBS) libre de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, pH 7.4 estéril
- Medio LIT (Liver infusion tryptose) modificado
- Suero Bovino Fetal (FBS)
- Suero de Ternero Recién Nacido (NCS)
- Medio Eagle's (MEM)
- Solución de tripsina (0.05%)/EDTA (0.02%)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Acrilamida 30% p/v
- N-N' Metileno-bis acrilamida 0.8% p/v
- Trizma-base
- Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% p/v
- HCl 6N
- Persulfato de amonio al 10% p/v (PA)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- 2-mercaptoetanol
- Azul de Coomassie R-250 0.2% p/v
- Ponceau S – 0.5% p/v en ácido acético 0.1% v/v

- Negro de amido 1% p/v en ácido acético al 10% y metanol al 4.5% v/v
- Leche descremada (al 5% en PBS)
- 4-cloro-1-naftol
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Tampón de muestra (concentrado 2X) (160mM Tris HCl pH 6.8, 5% SDS, 50mM 2-βmercaptoetanol, 20% glicerol, 2mM EDTA y 0.02% azul de bromofenol)
- Tampón de corrida para SDS-PAGE (25mM Tris HCl pH 8.6, 190mM glicina y 0.1% p/v SDS)
- Solución decolorante (etanol al 30% y ácido acético al 7%)
- Tampón de transferencia (25mM Tris HCl pH 8.6, 192mM glicina y 20% v/v metanol)
- Gel de separación al 10% (0.3M Tris-HCl pH 8.6, 0.1% SDS, 0.03% persulfato de amonio, 0.1% TEMED y 30% acrilamida)
- Gel de aplicación (acrilamida 30% y bis-acrilamida 1.6% p/v)

f. Insumos varios

- Contenedores para descarte
- Filtros de membrana de 0.22 y 0.45 μm
- Membrana de nitrocelulosa
- Papel filtro Whatman
- Pinzas
- Papel parafilm
- Cinta testigo
- Cinta adhesiva
- Papel aluminio
- Algodón
- Marcador permanente

D. Procedimientos (FASE I)

1. Cultivo de línea celular HEP-2

- a. Se descongeló rápidamente un vial de línea celular criopreservada y se llevó a 37°C. Se lavó con medio de cultivo MEM sin suero centrifugando a 1000 rpm por 5 min.
- b. Se agregó 5 mL de MEM + 10% FBS y se colocó su contenido en frascos de 25 cm² moviendo suavemente para lograr una distribución homogénea de las células sobre el fondo del frasco.
- c. Se incubó a 37°C hasta que los fibroblastos estuvieron pegados en el frasco formando una cubierta en el fondo.
- d. Se cambió de medio de cultivo cada vez que éste cambió a color amarillo.
- e. Se realizó subcultivos cuando hubo crecimiento excesivo de las células.

2. Obtención de tripomastigotes

- a. Se completó el MEM con 112.54 mL de NCS.
- b. Se descartó el medio MEM + 10% FBS del cultivo de fibroblastos.
- c. Se lavó con PBS libre de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.
- d. Se agregó MEM + 10% NCS y se inocularon las cajas con 1 mL del cultivo de epimastigotes en medio LIT.
- e. Se incubó durante 72 horas para permitir la infección.
- f. Se descartó el medio de cultivo cada vez que este cambió a color amarillo hasta que se obtuvo el índice de infección deseado.

3. Producción y recolección de TESA

- a. Se descartó el medio MEM + 10% FBS de un cultivo de fibroblastos sin infectar.
- b. Se lavó con PBS libre de iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.
- c. Se agregó a los frascos 10 mL de MEM + 10% NCS.
- d. Se infectó el cultivo celular con 5 x 10⁶ tripomastigotes/mL y se incubó a 37°C.
- e. A los 4 días de incubación se lavó las células dos veces con PBS y se agregó nuevamente 10 mL de medio MEM + 10% NCS, se incubó por 18 a 20 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

- f. Se centrifugó el sobrenadante a 2800 rpm por 10 minutos a 4°C y se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa (poro 0.2µm).
- g. Se almacenó en alícuotas de 1 mL a -70°C.

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

- a. Se ensambló el sistema de vidrios para la polimerización del gel y electroforesis.
- b. Se preparó el volumen apropiado de gel de poliacrilamida de separación al 10%.
- c. Se agregó TEMED, se homogenizó e inmediatamente se colocó la solución de poliacrilamida entre los platos de vidrio, a una altura aproximada de 5 cm.
- d. Se agregó una capa de agua destilada lentamente sobre el gel en formación, para así obtener una superficie plana.
- e. Se dejó en reposo para permitir la polimerización de la mezcla. Después que se completó la polimerización se descartó el agua destilada.
- f. Se preparó el volumen necesario de gel de aplicación.
- g. Se agregó TEMED, se homogenizó e inmediatamente se colocó la solución de poliacrilamida entre los platos de vidrio, hasta llenar todo el espacio restante.
- h. Inmediatamente se insertó el peine de teflón dentro del gel de aplicación y se colocó el gel en posición vertical a temperatura ambiente.
- i. Se preparó el TESA calentándolo a 95°C por cinco minutos en el buffer de muestras.
- j. Luego que la polimerización se completó, se removió el peine de teflón cuidadosamente dentro del buffer de corrida
- k. Se agregó 200 µl de TESA en el único pozo y 10 µl de marcador de peso molecular en el pozo del extremo.
- l. Se aplicó una corriente constante de 200V por aproximadamente 75 minutos.
- m. Se removieron los platos de vidrio y se preparó el gel para su transferencia.

5. Transferencia electroforética

- a. Se armó el sistema de transferencia apilando sucesivamente sobre una esponja plana: papel filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, papel filtro y por último otra esponja plana.

- b. Se recogió dentro de dos capas de plástico perforado y se introdujo en un tanque con buffer de transferencia y dos electrodos planos. Se aseguró que el gel estuviera del lado del cátodo (-) y la membrana del ánodo (+).
- c. Se aplicó una fuente eléctrica con una corriente de 70V, 300 mA y 300W por cuatro horas, en frío.

E. Procedimientos (FASE II)

1. Selección del panel de sueros para la validación del TESA-blot

- a. Se seleccionó los sueros según las siguientes características: 50 sueros positivos, 51 negativos, 14 considerados como discordantes en alguna prueba y 10 positivos para Leishmaniasis. Los 125 sueros fueron diagnosticados por medio del uso combinado de 3 pruebas serológicas: IFI-IgG ($\geq 1:20$), ELISA-IgG y GPAT ($\geq 1:32$).
- b. Se trabajó los sueros como muestras ciego (fueron identificados por una de las asesoras del proyecto de investigación) en grupos de 22 sueros y se validó las corridas con controles positivos y negativos.

2. Procedimiento técnico para TESA-blot

- a. Se incubó la membrana de nitrocelulosa con una solución bloqueadora (PBS con 5% de leche descremada) por 1 hora, con agitación constante y temperatura ambiente.
- b. Se colocó la membrana sobre un papel transparente y se cortó en tiras de 0.3 cm de ancho. Se colocó en un recipiente para corrida, una tira por canaleta.
- c. Se añadió 1000 μ L de PBS con 5% de leche descremada a cada canaleta. Se agregó 10 μ L de cada suero a probar.
- d. Se incubó por 2 horas a temperatura de 20-24°C con agitación constante.
- e. Después de ese tiempo, se lavó las tiras 4 veces con PBS pH 7.2 0.01M dando un intervalo de 5 minutos entre lavadas.
- f. Se agregó 1000 μ L de conjugado diluido 1:2000 (anti-anticuerpo especie específico marcado con peroxidasa), diluido en PBS.
- g. Se repitió el paso d y e.
- h. Se reveló el complejo adicionando la solución cromógena de 4-cloro-1-naftol y H_2O_2 .

- i. Se detuvo la reacción lavando las tiras con agua destilada en abundancia.
- j. Se interpretó como positivo por la presencia de una banda de peso molecular aproximado entre 150-160 kDa. Varios pacientes de fase crónica también reaccionan con las bandas denominadas SAPA (6 bandas para la cepa Y) de peso molecular que varían desde 120 – 210 kDa.

F. Diseño estadístico

1. Tipo de estudio

Estudio de tamizaje o validez de un método diagnóstico.

2. Diseño de muestreo

No probabilístico por conveniencia, se validó la prueba con un panel de sueros que se trabajaron como muestras ciegas.

3. Análisis de resultados

Se determinó la sensibilidad y especificidad relativa para la prueba y la concordancia con el set de sueros de referencia a través del coeficiente *Kappa* (39) (Anexo 7 y 8).

VIII. RESULTADOS

A. Fase I

1. Obtención de tripomastigotes

Con el objeto de seleccionar la línea celular más adecuada para la obtención del estadio tripomastigote y TESA, se realizaron diversos experimentos con las siguientes líneas celulares: RD (células de rabdiosarcoma embrionario), L20B (células de ratón) y Hep-2 (células de carcinoma epidermoide humano de laringe) (43). En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para la obtención de la fase tripomastigote del aislamiento guatemalteco H-7 según el tiempo transcurrido, así como los cambios morfológicos observados durante el proceso en cada línea celular. Las líneas celulares RD y L20B presentaron daños celulares considerables y desprendimiento de células luego de 2 semanas de haber sido inoculadas con tripomastigotes. La línea celular Hep-2 necesitó un tiempo más prolongado para la obtención de tripomastigotes, sin embargo, estas células se conservaron en constante reproducción y sin daño aparente a pesar de la infección por *T. cruzi*.

Tabla 3. Selección de línea celular para obtención de tripomastigotes ¹

Incubación a 37°C en atmósfera aerobia, todas las líneas celulares se incubaron durante 72 horas después de la inoculación			
Línea celular	Tiempo		Morfología
	Observación amastigotes	Obtención de índice de infección	Presencia / ausencia de daño celular post-infección
RD	5 días	2 semanas	Presencia
L20B	5 días	2 semanas y media	Presencia
Hep-2	5 días	Aprox. 3 semanas	Ausencia

¹ Experimento realizado con el aislamiento guatemalteco H-7 de *Trypanosoma cruzi*

Se eligió la línea Hep-2 para la obtención de tripomastigotes, se inoculó con los aislamientos guatemaltecos de *Trypanosoma cruzi* (fase epimastigote) obtenidos por el Departamento de Citohistología y que se almacenaban en medio de cultivo LIT modificado. Se trabajó con 7 aislamientos, bajo las mismas condiciones experimentales. En la tabla 4 se presenta el tiempo transcurrido para obtención de tripomastigotes con cada uno de los aislamientos y el índice de infección alcanzado.

Tabla 4. Obtención de tripomastigotes en siete aislamientos guatemaltecos (37°C) ¹

Índice de infección	Número de aislamientos % (n)	Identificación del aislamiento
Alta (> 10 ⁵ tripomastigotes/mL)	28.6 (2/7)	H-7, H-64
Baja (< 10 ⁵ tripomastigotes/mL)	57.1 (4/7)	TM-14, TM-31, TM-47 y H-38
Ausente	14.3 (1/7)	H-4

¹ El tiempo de infección de todos los aislamientos evaluados fue de 72 horas y se incubaron durante 25 días en la línea celular Hep-2

2. Producción y recolección de TESA

Se seleccionó a los aislamientos H-7 y H-64, con índices de infección de 4.8×10^5 y 6.0×10^5 tripomastigotes/mL, respectivamente. Se inoculó 1 mL de cada aislamiento en la línea celular Hep-2 y se incubó durante 4 días con medio MEM suplementado con 10% de suero de ternero recién nacido a 37°C en jarra con candela. Se cambió el medio de cultivo por MEM sin suero recolectándose el sobrenadante 20 horas después de la re-incubación a 37°C en jarra con candela. El sobrenadante (que contiene los antígenos TESA) se almacenó según la técnica descrita (Umezawa, *et al.*).

3. Inmunoelectroforesis

Para la implementación de la técnica de electroforesis SDS-PAGE se evaluó el uso de geles a una concentración de 7 y 10% para la separación de las proteínas contenidas en el medio de cultivo con TESA. Aunque con ambos se obtuvo buena separación y resolución de bandas, el gel al 10% permitió mejor visualización individual de las proteínas, además de

resultar más fácilmente manipulable. Con ambos porcentajes de gel se observó una banda entre 45 y 67 kDa, las proteínas antigénicas buscadas se observaron débilmente entre 116 y 200 kDa en la primer porción del gel de corrida.

Con el TESA del aislamiento H-7 se obtuvo una débil banda entre 45 y 67 kDa. Los resultados con el aislamiento H-64 fueron diferentes ya que se obtuvo una banda de mayor intensidad en este peso molecular y se pudo observar, aunque débilmente, una banda entre 116 y 200 kDa.

Se realizó la transferencia de proteínas de TESA de ambos aislamientos a membranas de nitrocelulosa, obteniéndose únicamente una tenue banda con el TESA del aislamiento H-64 después de su tinción con Rojo de Ponceau; con la misma tinción se observó también una banda intensa entre 45 y 67 kDa. Sin embargo, al momento de desarrollar la prueba como inmunoblot no se visualizaron bandas entre 116 a 200 kDa, después de su enfrentamiento con sueros serológicamente positivos.

Ya que no se obtuvo bandas en el inmunoblot y se detectó bandas débiles con Rojo de Ponceau, se sospechó que el antígeno podía estar presente en muy poca cantidad por lo que se procedió a concentrar mediante liofilización, cada uno en alícuotas de 1.0 mL durante 24 horas a 4 atmósferas de presión. Posteriormente, se reconstituyó 1 vial de cada aislamiento con 100 μ L de PBS, se diluyó 1:2, 1:4 y 1:8 en PBS, se separó electroforéticamente (diluidas 1:2 en buffer de muestras) y se obtuvo únicamente bandas con el TESA del aislamiento H-64 (4 bandas entre 45 y 67 kDa y 1 banda entre 116 y 200 kDa, teñidas con Azul de Coomassie), siendo las mejores las obtenidas directamente del liofilizado + 100 μ L de PBS. Para poder visualizar y comparar las bandas proteínicas del aislamiento H-7 se unió el contenido de 6 viales y se reconstituyó con 100 μ L de PBS, se separó electroforéticamente y se transfirió a membranas de nitrocelulosa.

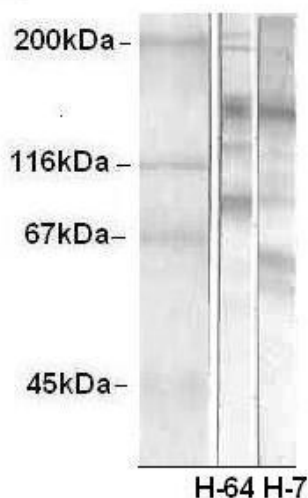
Por los resultados obtenidos se produjo el TESA-blot a partir de los antígenos del aislamiento H-64 y se produjo un lote de TESA-blot H-7 para comparar las bandas producidas con ambos antígenos.

B. Fase II

1. Comparación de bandas en aislamientos H-7 y H-64

Se demostraron los antígenos obtenidos con los TESA-blot de los aislamientos H-7 (TESA-blot H-7) y H-64 (TESA-blot H-64) desarrollando la prueba con una mezcla de sueros positivos. En ambos casos se obtuvo un patrón de bandas entre 116 y 200 kDa, el aislamiento H-7 presentó una banda extra entre 45 y 67 kDa. En la Fig. 1 se compara la presencia de los antígenos mencionados.

Fig. 1. Peso molecular de antígenos TESA H-7 y H-64 ¹



¹ Determinado frente a una mezcla de sueros positivos para la infección por *Trypanosoma cruzi*.

2. Evaluación del funcionamiento de lotes de TESA-blot H-64

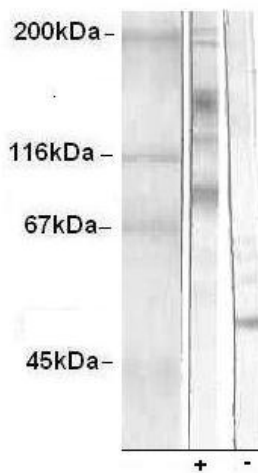
Se produjo 8 lotes de tiras de TESA-blot H-64, con aproximadamente 25 tiras por lote. Previo a la validación de la prueba se evaluó el funcionamiento de las tiras desarrollando la prueba con una mezcla de sueros positivos. En 87.5% (7/8) de los lotes producidos se obtuvo una reacción adecuada observándose el patrón de bandas esperadas.

3. Validación

Se validó con un panel de 115 sueros evaluados mediante el uso integrado de tres pruebas serológicas distintas: IFI, GPAT y ELISA, los que se enfrentaron a TESA-blot H-64 como muestras ciegas para fines de control de calidad en la validación de la misma. De este panel 50 sueros eran positivos (3/3 pruebas positivas), 51 eran negativos (0/3 pruebas positivas) y 14 presentaron serología discordante (1-2/3 pruebas positivas) de los que 8 fueron considerados positivos y 6 negativos.

Se interpretó como positivo todo suero con una o varias bandas entre el rango de 116 a 200 kDa. El 8.9% (5/57) de los sueros negativos reaccionaron con otras proteínas en el rango de 45 a 67 kDa. Estas reacciones se reportaron como negativas (Fig. 2).

Fig. 2. Bandas en TESA-blot H-64 y su interpretación ¹



¹ Determinado frente a una mezcla de sueros positivos para la infección por *Trypanosoma cruzi*.

En 4.3% (5/115) de los sueros utilizados en la validación se obtuvo resultados discordantes, luego de evaluarlos nuevamente (a manera de descartar errores técnicos aleatorios), se obtuvo los resultados tabulados en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados TESA-blot H-64 frente a panel de sueros (N = 115)

		Panel de sueros		
		Positivo % (n)	Negativo % (n)	Total % (n)
TESA- blot H-64	Positivo % (n)	49.5 (57)	0.9 (1)	50.4 (58)
	Negativo % (n)	0.9 (1)	48.7 (56)	49.6 (57)
	Total % (n)	50.4 (58)	49.6 (57)	100.0 (115)

Sensibilidad 98.3% IC 95% 89.5 – 99.9

Especificidad 98.2 % IC 95% 89.4 – 99.9

Coefficiente de correlación *Kappa* 0.982609 (óptima)

En 1.7% (2/115) de los sueros del panel se obtuvo resultados que, según el criterio de OMS, presentaron una difícil interpretación, para los cuales se utilizó a TESA-blot Brasil como cuarta prueba diagnóstica. El suero ID 1 (Tabla 8) era negativo siguiendo el criterio de OMS (2/3 pruebas negativas), sin embargo, fue diagnosticado como positivo por GPAT y TESA-blot Brasil, técnicas que han demostrado una alta sensibilidad en la práctica, el mismo resultado se obtuvo con TESA-blot H-64. El suero ID 11 presentó un resultado dudoso por GPAT, un resultado positivo en zona gris por ELISA, confirmándose como positivo con TESA-blot Brasil. Ambos sueros fueron eliminados del panel, por lo que se recalculó la sensibilidad y especificidad relativas para la prueba TESA-blot H-64. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados TESA-blot H-64 frente a panel de sueros (N = 113)

		Panel de sueros		
		Positivo % (n)	Negativo % (n)	Total % (n)
TESA- blot H-64	Positivo % (n)	49.6 (56)	0.0 (0)	49.6 (56)
	Negativo % (n)	0.9 (1)	49.6 (56)	50.5 (57)
	Total % (n)	50.5 (57)	49.6 (56)	100.1 (113)
Sensibilidad		98.2%	IC 95% 89.4 – 99.9	
Especificidad		100.0%	IC 95% 92.0 – 100.0	

Coefficiente de correlación *Kappa* 0.991150 (óptima)

La prueba TESA-blot H-64 correlaciona en un 99.1% con TESA-blot Brasil, 98.2% con GPAT, un 97.3% con IFI y un 93.8% con ELISA, siendo todas correlaciones óptimas (Tabla 7).

Tabla 7. Correlación entre las pruebas utilizadas en el diagnóstico (N = 113)

Pruebas	Coefficiente <i>Kappa</i>	Interpretación
TESA-blot H-64 vrs. TESA-blot Brasil	0.991150	óptima
GPAT vrs. TESA-blot Brasil	0.991150	óptima
IFI vrs. TESA-blot Brasil	0.982301	óptima
TESA-blot H-64 vrs. GPAT	0.982301	óptima
TESA-blot H-64 vrs. IFI	0.973451	óptima
GPAT vrs. IFI	0.973451	óptima
ELISA vrs. TESA-blot Brasil	0.9490353	óptima
TESA-blot H-64 vrs. ELISA	0.938053	óptima
GPAT vrs. ELISA	0.938053	óptima
IFI vrs. ELISA	0.929204	óptima

De los sueros del panel de validación 12.2% (14/115) presentaron una serología discordante en alguno de los resultados obtenidos con las pruebas utilizadas para su diagnóstico, en forma de falsos positivos o falsos negativos con respecto al reporte siguiendo el criterio de OMS; en la tabla 8 se listan los resultados para cada suero, el criterio de OMS y el resultado obtenido con TESA-blot Brasil como cuarta prueba diagnóstica.

Tabla 8. Resultados de 14 sueros con resultados de serología discordante

ID	GPAT	ELISA manual	IFI	CRITERIO OMS	TESA-blot Brasil	TESA-blot H-64
1	+ 1:256	-	-	¿ - ?	+	+
2	+ 1:256	-	+ 1:40	+	+	+
3	-	-	+ 1:40	-	-	-
4	+ 1:256	-	+ 1:80	+	+	+
5	+ 1:64	-	+	+	+	+
6	+ 1:64	-	+	+	+	+
7	±	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-
9	-	-	+ 1:40	-	-	-
10	+ 1:64	-	+ 1:40	+	+	-
11	±	+ zona gris	+ 1:20	¿ + ?	+	+
12	+ 1:128	+ zona gris	+ 1:20	+	+	+
13	+ 1:128	+ zona gris	+ 1:40	+	+	+
14	±	-	-	-	-	-

Según el criterio de OMS para determinar la presencia/ausencia de infección en los sueros utilizados dentro del panel de validación de la prueba TESA-blot H-64, se determinó que 57 eran positivos y 56 negativos para la infección por *T. cruzi*. Con esto, la técnica GPAT presentó 2.6% (3/115) de reacciones dudosas, IFI presentó 1.7 % (2/115) de resultados falsos positivos y 0.9% (1/115) de falsos negativos, ELISA (procedimiento manual) presentó 0.9 % (1/115) de falsos positivos, 5.2 % (5/115) de falsos negativos y 2.6 % (3/115) de resultados positivos en zona gris. TESA-blot H-64 presentó 0.9% (1/115) de resultados falsos negativos (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados dudosos, falsos positivos, falsos negativos y positivos en zona gris obtenidos con cada una de las pruebas utilizadas (N = 115)

Prueba	Resultados dudosos	Falsos positivos	Falsos negativos	Positivos zona gris
GPAT	2.6 %	- 1	- 1	-
ELISA manual	-	0.9 %	5.2 %	2.6 %
IFI	-	1.7 %	0.9 %	-
TESA-blot H-64	-	0.0 %	0.9 %	-

¹ GPAT no presentó falsos positivos o falsos negativos francos, los resultados dudosos fueron 2 (1.7%) realmente negativos y 1 (0.9 %) realmente positivo.

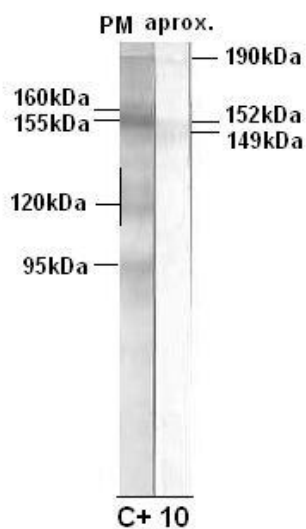
En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de reacciones cruzadas con anticuerpos contra antígenos de *Leishmania*. Para esto se enfrentó la prueba TESA-blot H-64 con 10 sueros con serología positiva para leishmaniasis, obteniéndose en 10% (1/10) de los sueros reacciones positivas. Dichos sueros fueron tamizados mediante cuatro pruebas distintas: aglutinación de látex (RLAT), inmunodifusión directa (IDD), GPAT e IFI. Con RLAT se obtuvo 20% (2/10) resultados positivos, con IDD 10% (1/10) de resultados positivos, con GPAT 10% (1/10) de reacciones dudosas y con IFI todas las pruebas fueron negativas.

Tabla 10. Ocurrencia de reacciones cruzadas con anticuerpos contra antígenos de *Leishmania* (N = 10)

ID	RLAT	IDD	GPAT	IFI	TESA-blot H-64
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	+	-	±	-	-
9	-	+	-	-	-
10	++	-	-	-	+

En la Fig. 3 se presenta, con fines de comparación, el resultado obtenido con TESA-blot H-64 para el suero 10. El peso molecular aproximado de las bandas obtenidas con este suero es ligeramente menor al obtenido para el control positivo utilizado. Sin embargo, la diferencia es mínima y difícil de detectar a simple vista y las bandas obtenidas se encuentran dentro del rango esperado para los antígenos SAPA (120-200 kDa).

Fig. 3. Evaluación de reacciones falso positivas con TESA-blot H-64 ¹



¹ Determinado frente a suero positivo para la infección por *Trypanosoma cruzi* (C+) y *Leishmania* (10)

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Fase I

1. Obtención de tripomastigotes

Para la obtención de la fase tripomastigote de *T. cruzi* se evaluó el funcionamiento de tres líneas celulares: RD, L20B y Hep-2, para lo cual se infectaron con el aislamiento H-7 siguiendo los procedimientos establecidos. En todas las líneas celulares fue posible observar formas intracelulares (amastigotes) cinco días después de la infección.

Con la línea celular RD se obtuvo un alto índice de infección en las 2 semanas siguientes, mientras que con las líneas celulares L20B y Hep-2 se obtuvo entre 2 y 3 semanas. A las dos semanas de incubación, tanto la línea celular RD como la L20B mostraron considerables y progresivos daños celulares lo que imposibilitó significativamente el aumento del índice de infección hasta los niveles necesarios para la obtención de TESA. La línea celular Hep-2 demostró ser más resistente a la infección, así como al daño provocado por el crecimiento y ciclo vital de *T. cruzi*, soportando hasta 1 mes después de la infección inicial.

Por lo anteriormente expuesto y por su morfología celular se eligió la línea celular Hep-2, la que permitió una mejor visualización de los amastigotes intracelulares. Las células Hep-2 se inocularon con 7 aislamientos guatemaltecos distintos obtenidos en el departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Se obtuvo un índice de infección muy bajo con los aislamientos TM-14, TM-31, TM-47 y H-38, mientras que no se obtuvo con el aislamiento H-4. Todos estos aislamientos han permanecido durante largos períodos en cultivo *in vitro*, lo que probablemente ha ocasionado la pérdida de virulencia e infectividad de los mismos (20). El aislamiento H-7 presentó mejor respuesta en el aumento del índice de infección, probablemente debido a que este aislamiento se ha mantenido por pasajes en cultivo celular y cultivo en medio LIT modificado para fines de otras investigaciones. El aislamiento H-64 se obtuvo de paciente a mediados del 2003 y se ha mantenido en cultivo celular en fase tripomastigote; con este aislamiento se obtuvo el mayor índice de infección, ya que por ser reciente probablemente conserva aún su virulencia e infectividad.

2. Inmunolectroforesis de TESA

Se recolectó el TESA de los aislamientos H-7 y H-64 y se separaron mediante SDS-PAGE con geles al 10%, porcentaje que permitió una buena separación de bandas y una fácil manipulación del gel. Sin embargo, el contenido proteico y antigénico de ambos TESA fue insuficiente para poder evidenciar las bandas en el inmunoblot, por lo que se concentraron las proteínas mediante liofilización. La liofilización permitió recuperar exitosamente el TESA H-64, por la evaluación visual de la presencia e intensidad de bandas antigénicas en el inmunoblot. Se produjo en total 8 lotes (1 lote = 1 vial reconstituido con 100 μ L de PBS) de 25 tiras cada uno, después de la inmunolectroforesis y bloqueo por 1 hora en PBS con leche descremada al 5%.

El éxito de la transferencia se evaluó por medio de la tinción de las membranas con Rojo de Ponceau con la que se observó una banda intensa entre 45 y 67 kDa. Las proteínas antigénicas que interesan para el diagnóstico se encuentran entre 116 y 200 kDa, sin embargo, no fue posible detectarlas con esta tinción.

Al comprobar el funcionamiento de la prueba como inmunoblot se incubó el primer anticuerpo y el conjugado en PBS con 1% de leche descremada, sin embargo, se produjo un efecto de fondo en las tiras, lo que impidió su interpretación; por lo que se modificó el procedimiento incubando el primer anticuerpo en PBS con 5% de leche descremada obteniendo resultados satisfactorios; se continuó según el procedimiento recomendado (5).

B. Fase II

1. Comparación de bandas en aislamientos H-7 y H-64

Para poder visualizar y comparar las bandas proteicas del aislamiento H-7 se unió el contenido de 6 viales y se produjo el TESA-blot siguiendo el mismo procedimiento que para H-64. H-7 no alcanzó el mismo índice de infección en cultivo celular, ni produjo suficiente cantidad de TESA, lo cual puede atribuirse a pérdida de virulencia del aislamiento por su constante manipulación *in vitro* y no reproducir su ciclo *in vivo*, es decir, utilizando modelos experimentales tales como ratones (20). Al enfrentar la prueba TESA-blot H-64 con una mezcla de sueros positivos de la seroteca del departamento de

Citohistología, se evidenció 6 bandas con peso molecular entre 116 a 200 kDa, mientras que con la prueba TESA-blot H-7 se obtuvo 4 bandas entre 116 a 200 kDa y 1 banda entre 45 y 67 kDa. La banda más evidente y conservada en ambas pruebas es la correspondiente a un peso molecular aproximado de 150 a 160 kDa, lo que correlaciona con los resultados reportados en estudios realizados en Brasil que aseguran que el antígeno de este peso molecular no varía entre aislamientos (Fig. 1) (5,28,39). No se pudo obtener el TESA de todos los aislamientos guatemaltecos y por lo tanto establecer la comparación, sin embargo, por los resultados obtenidos con los aislamientos H-64 y H-7 es posible aceptar la primera hipótesis propuesta en este trabajo de tesis.

2. Evaluación del funcionamiento de lotes de TESA-blot H-64

Para la validación de la prueba TESA-blot H-64 se evaluó los resultados obtenidos con los diferentes lotes de tiras. Los 8 lotes fueron producidos bajo las mismas condiciones experimentales y almacenados a 4°C; el 87.5% funcionó correctamente presentando en todos los casos una banda entre 150 a 160 kDa y las 5 bandas restantes mencionadas entre 116 a 200 kDa, con diferentes intensidades. El único lote que no cumplió con la evaluación se descartó.

3. Validación

Se validó la prueba con 115 sueros provenientes de diferentes pacientes y diagnosticados mediante el uso de tres pruebas serológicas: GPAT, ELISA e IFI, los que fueron evaluados en ciego por fines de validez estadística. De los sueros, 50 fueron completamente positivos (3/3), 51 fueron completamente negativos (0/3) y 14 presentaron serología discordante (1-2/3); de estos últimos 8 fueron positivos y 6 negativos. El panel fue diagnosticado según el criterio de OMS, el cual pide la utilización de por lo menos dos técnicas de distinto principio para dar el diagnóstico; aplicando el criterio de OMS el panel constaba de 58 sueros positivos y 57 sueros negativos (4,8).

Para los sueros diagnosticados como positivos con la prueba TESA-blot H-64 se evidenciaron de 1 a 6 bandas, encontrándose presente en todos los casos la banda de 150 a 160 kDa. En 8.9% (5/56) de los sueros diagnosticados como negativos con la prueba TESA-blot H-64 se evidenciaron de 1 a 4 bandas, todas entre 45 y 67 kDa; dichas bandas

se encontraban fuera del rango esperado para el diagnóstico específico de la enfermedad (Fig. 2), por lo que se interpretaron como negativas y se consideró como reacción inespecífica de los sueros. Se considera que con esta técnica es posible descartar algunas de las reacciones falso positivas que podrían presentarse si se utilizara TESA crudo en otro tipo de pruebas como TESA-ELISA (38).

Con TESA-blot H-64 fue posible discriminar a 57 de los 58 sueros positivos como positivos y a 56 de los 57 negativos como tales, obteniéndose así una sensibilidad relativa para la prueba de 98.3% (IC95% 89.5-99.9) y una especificidad relativa de 98.2% (IC95% 89.4-99.9). TESA-blot H-64 presentó un 98.2% de correlación con el panel de sueros utilizados para su validación, que según la tabla de interpretación del índice *Kappa* es considerada como óptima, descartando así la segunda hipótesis propuesta en esta investigación.

En la tabla 8 se listan los resultados obtenidos para 14 sueros con serología discordante. De éstos, 2 (identificados como ID 1 e ID 11) presentaron resultados de difícil interpretación, por lo que se utilizó TESA-blot Brasil como cuarta prueba diagnóstica. El suero ID 1 debía ser diagnosticado como negativo según OMS, sin embargo, con TESA-blot Brasil, TESA-blot H-64 y GPAT se obtuvo un resultado evidentemente positivo. Debido a que estas pruebas han demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad en la práctica, ID 1 se consideró como positivo y los resultados de ELISA e IFI como falsos negativos. El suero ID 11 también mostró un resultado dudoso con GPAT y un resultado en zona gris con ELISA, por lo que su diagnóstico no fue certero hasta su confirmación con TESA-blot Brasil y TESA-blot H-64. Ya que TESA-blot Brasil no se consideró como prueba en el diagnóstico de los sueros del panel, se eliminaron ambos sueros del estudio.

Al recalcular entonces la sensibilidad y especificidad relativas a la prueba (N = 113) se obtuvo una sensibilidad relativa de 98.2% (IC 95% 89.4 – 99.9) y una especificidad relativa de 100.0% (IC 95% 98.0-100.0), además de 99.1% de concordancia con el panel de sueros ajustado.

El único falso negativo obtenido con TESA-blot H-64 fue de un suero con serología discordante, presentando un resultado negativo con ELISA y una banda muy débil con TESA-blot Brasil.

La prueba TESA-blot H-64 presentó una correlación del 99.1% con TESA-blot Brasil, del 98.2% con GPAT, del 97.3% con IFI y de 93.8% con ELISA, siendo todas correlaciones óptimas según el índice *Kappa*. Los porcentajes de correlación obtenidos permiten seleccionar la combinación de pruebas más adecuada para el diagnóstico serológico. En este caso, TESA-blot H-64 en asociación con GPAT presenta la mejor correlación y por lo tanto, podría ser una buena opción para su uso en laboratorios dedicados a la confirmación de casos de la enfermedad de Chagas. Así mismo, se calculó la correlación entre las demás pruebas utilizadas en el estudio. Las correlaciones obtenidas para cada combinación fueron: GPAT vrs. IFI 97.3%, GPAT vrs. ELISA 93.8% e IFI vrs. ELISA 92.9%.

Al analizar por separado los 14 sueros con serología discordante se evaluó la ocurrencia de falsos positivos, falsos negativos o reacciones dudosas con las pruebas utilizadas en el diagnóstico. GPAT presentó 2.6% (3/115) de reacciones dudosas por no observarse una aglutinación franca. ELISA (procedimiento manual) presentó 0.9% (1/115) de falsos positivos, 5.2% (5/115) de falsos negativos y 2.6% (3/115) de resultados en zona gris o equívoca. IFI presentó 1.7% (2/115) de reacciones falso positivas y 0.9% (1/115) de reacciones falso negativas. TESA-blot H-64 presentó 0.9% (1/115) de reacciones falso negativas y 0% de reacciones falso positivas.

Estudios realizados por el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, reportan una sensibilidad relativa para GPAT de 97.3% y una especificidad relativa de 79.4%, sin embargo, en la presente investigación se demuestra que con el uso de esta prueba en el diagnóstico se evitan muchos de los resultados falsos positivos o negativos que presentan otras pruebas. Los únicos resultados discordantes obtenidos fueron dudosos, ningún patrón franco positivo o negativo fue reportado erróneamente.

La literatura reporta una sensibilidad relativa para IFI del 100% y una especificidad relativa cercana al 100%, lo cual se confirma con los resultados obtenidos con esta prueba. Por sus características IFI es una buena opción para el diagnóstico, sin embargo, requiere del uso de equipo sofisticado con el que no cuenta la mayoría de los laboratorios a nivel nacional, con la excepción de algunos dedicados a la investigación y de referencia (39).

El fabricante del kit de ELISA utilizado en el tamizaje de los sueros del panel de validación reporta una sensibilidad relativa del 98.3% y una especificidad relativa del 98.5%, sin embargo, en el presente estudio esta técnica presentó tanto falsos positivos como falsos negativos, además de resultados en zona gris. Estos resultados adquieren especial importancia si se aplican a bancos de sangre, ya que en estos laboratorios se trabaja principalmente con ELISA. Los resultados obtenidos en la presente investigación invitan a una re-evaluación de la técnica ya que un 5.2% de falsos negativos en banco de sangre es inaceptable. El procedimiento del ELISA utilizado fue manual por lo que dicha evaluación debería comprender tanto la técnica manual como la automatizada.

Entre las principales fallas de la mayor parte de pruebas disponibles comercialmente está la ocurrencia de resultados en zona gris y la constante presencia de reacciones cruzadas con otros antígenos, principalmente con los de *Leishmania* (37). Ante esta posibilidad TESA-blot H-64 fue evaluado en busca de reacciones cruzadas mediante el tamizaje de 10 sueros positivos para Leishmaniasis obteniéndose 10% (1/10) de resultados positivos. Dicho suero también fue positivo con RLAT y fue negativo con las otras técnicas (IDD, GPAT e IFI). Los patrones obtenidos concuerdan con los descritos en la literatura para antígenos SAPA, pertenecientes a la porción C-terminal de la enzima transialidasa (7). Según lo reportado en la literatura para la prueba TESA-blot Brasil se espera 0% de reacciones cruzadas produciendo la prueba mediante la técnica descrita, sin embargo, TESA-blot H-64 reaccionó con alguno de los anticuerpos presentes en este suero; debido a que se desconocen los datos del paciente del cual provenía dicha muestra (lugar de origen e historia clínica) se puede sospechar de una infección mixta con *T. cruzi*. Este dato necesita ser confirmado a través de un mayor número de sueros de los que se conozca la procedencia y determinar además la presencia de otras condiciones interferentes en los sueros que puedan provocar este tipo de reacciones.

Los resultados obtenidos sugieren que TESA-blot H-64 es una alternativa diagnóstica aceptable y confiable para la confirmación de casos de infección por *T. cruzi*, de forma integrada con otra técnica diagnóstica de tamizaje como GPAT. En aquellos casos en los que se sospeche una leishmaniasis o sean provenientes de zona endémica es necesaria la confirmación del resultado. Según la literatura TESA-blot permite el diagnóstico

diferencial de la fase aguda y crónica de la infección, lo que se consigue utilizando un conjugado IgM para el desarrollo del inmunoblot.

TESA-blot H-64 validada será establecida como prueba de rutina en la Unidad de Inmunodiagnóstico de LAMIR, para la confirmación de los casos referidos por los diversos centros asistenciales que utilizan este servicio. Además, se sugiere continuar con los estudios de reactividad cruzada y recuperar la infectividad de los demás aislamientos guatemaltecos mediante pasaje por ratón para evaluar su diversidad antigénica.

X. CONCLUSIONES

1. La prueba TESA-blot puede ser utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos obtenidos del aislamiento H-64.
2. Los TESA-blot obtenidos de los aislamientos guatemaltecos H-7 y H-64 presentan entre 4 y 6 bandas con peso molecular aproximado de 116 a 200 kDa y una banda conservada de peso molecular aproximado de 150 y 160 kDa.
3. TESA-blot H-64 presenta una sensibilidad relativa del 98.2% (IC 95% 89.4 – 99.9) y una especificidad relativa del 100.0% (IC 95% 92.0 – 100.0), correlacionando en un 99.1% con el panel de sueros utilizado en la validación según el índice *Kappa*.
4. TESA-blot H-64 es una alternativa en el diagnóstico confirmatorio y de rutina en los casos en los que se sospecha de una infección con *T. cruzi* en conjunto con la técnica GPAT, con la que correlaciona en un 98.2%.
5. Según el criterio de OMS para el reporte de presencia/ausencia de infección, en el panel utilizado para la validación GPAT presenta un 2.6% de reacciones dudosas; ELISA (procedimiento manual) 0.9% de falsos positivos, un 5.2% de falsos negativos y un 2.6% de resultados en zona gris; e IFI un 1.7% de falsos positivos y un 0.9% de falsos negativos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar pasajes por animales de laboratorio de los aislamientos guatemaltecos de *Trypanosoma cruzi* para recuperar la virulencia de los mismos; con esto en futuras investigaciones podría lograrse la comparación antigénica de TESA de los demás aislamientos.
2. Utilizar a TESA-blot H-64 en la confirmación de casos después de su tamizaje con GPAT.
3. Utilizar un suero con títulos bajos de anticuerpos como controles positivos bajos para una posterior estandarización de la concentración antigénica de la prueba y de su punto de corte.
4. Re-evaluar la validación y funcionamiento de las técnicas ELISA, manuales y automatizadas, principalmente en los Bancos de Sangre en los que reacciones falso negativas son inaceptables.
5. Realizar un estudio de la reactividad cruzada de *Trypanosoma cruzi* con *Leishmania* de modo que se pueda desarrollar a base de antígenos purificados o mezcla de ellos para evitar resultados falsos positivos. Que además incluya otras condiciones que podrían presentar reacción cruzada, como *Trypanosoma rangeli*, sífilis y fiebre reumática.
6. Continuar con estudios en los que se fomente la producción de técnicas diagnósticas con antígenos nativos, con las que la Universidad de San Carlos y sus Unidades puedan convertirse en centros de investigación y desarrollo para la Industria guatemalteca y así desarrollar el área de la Biotecnología de nuestro país.

XII. REFERENCIAS

1. Paz-Bailey G, *et al.* Incidente of *Trypanosoma cruzi* infection in two Guatemalan communities. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002;96:48-52.
2. Umezawa E & Da Silveira J. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. 285 Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999;94(1):285-288.
3. Tópico I: Enfermedad de Chagas con Parasitemia Evidente. *Rev. Arg. Card.* 2002;70:15-39.
4. Rosa R, *et al.* Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay.* 2001;17:125-132.
5. Umezawa E, *et al.* Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas Disease. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(9):2143-2147.
6. Noia J, *et al.* A *Trypanosoma cruzi* Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease is Due to a Single Parasite Lineage. *J. Exp. Med.* 2002;195:401-413.
7. Montagna G, *et al.* The trans-sialidase from the African trypanosome: *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:2941-2950.
8. Saez-Alquézar A, *et al.* Serological confirmation of Chagas' Disease by a Recombinant and peptide Antigen Line Immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:851-854.
9. Matsumoto T, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Isolation of an immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted-secreted antigens) by gene cloning. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2002;42:187-192.
10. Bosseno M, *et al.* Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:627-632.
11. Vissoci Reiche E, *et al.* Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59:750-756.

12. Thomas M, *et al.* Mapping of the antigenic determinants of the *Trypanosoma cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin. Exp. Immunol.* 2001;123:465-471.
13. Rangel-Flores H, *et al.* Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of Central México: Correlation with electrocardiographic alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65:887-895.
14. Umezawa E, *et al.* Chagas' disease. *The Lancet* 2001;357:797-799.
15. Wendel S, Brener Z. Chagas Disease; American Trypanosomiasis: it's impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo; Brasil [Serial online] ISBT, 1992. Disponible en URL: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>
16. Vargas AM. Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre completa por la técnica de PCR empleando los cebadores 121 y 122 del ADN del minicírculo del kinetoplasto. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000. p. 16-19.
17. Machuca JE. Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre por medio de PCR como método específico en el diagnóstico rápido de la Enfermedad de Chagas. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000. p. 9-10.
18. Aguilar F. Parasitología Médica. USAC, Guatemala: 1987, 250-261.
19. Basombrio M, *et al.* Endemic *Trypanosoma cruzi* infection in Indian populations of the Gran Chaco territory of South America: performance of diagnostic assays and epidemiological features. *An. Trop. Med. Parasitol.* 1999;93:41-48.
20. Tabaru Y, *et al.* The geographical distribution of vectors in Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* 1999;50:9-17.
21. Ferreira A, *et al.* Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas' Disease Employing a *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigen that Consists of Four Different Peptides. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:4390-4395.
22. Gürtler R, Segura E, Cohen J. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infección in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* [Serial online] 2003;8. Disponible en URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/02-0274.htm>

23. Umezawa E, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM. Changes in Isotype Composition and Antigen Recognition of Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibodies from Acute to Chronic Chagas' Disease. *J. Clin Lab. Analis.* 1996;10:407-413.
24. Wendel S, Brener Z. Chagas Disease; American Trypanosomiasis: it's impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo; Brasil [Serial online] ISBT, 1992. Disponible en URL: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter3.html>
25. Araújo C, Mello C & Jansen A. *Trypanosoma cruzi* I and *Trypanosoma cruzi* II: recognition of sugar structures by *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin) lectin. *J. Parasitol.* 2002;88:582-586.
26. Devera R, Fernandes O, Rodrigues J. Should *Trypanosoma cruzi* be Called "cruzi" Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after *in Vitro* Culturing and Mice Infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):1-12.
27. Cruz DA. Caracterización de diez cepas de *Trypanosoma cruzi* por curvas de crecimiento en cultivo *in vitro*. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. p. 10-11.
28. Umezawa E, *et al.* Immunoblot Analysis of Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens as a Tool for the Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains and Isolates. *J. Parasitol.* 2000;86(4):862-867.
29. Da Silveira J, Umezawa E, Ostermayer A. Chagas Disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 2001;17:286-291.
30. Lages-Silva E, *et al.* Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megasophagus: blood and tissue parasitism. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65:435-441.
31. Añez N, *et al.* Detection and significance of inapparent infection in Chagas' Disease in Western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65:227-232.
32. Millar A, Kahn S. The SA85-1.1 Protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase Superfamily Is a Dominant T-Cell Antigen. *J Infect Immun.* 2000;68:3574-3580.
33. *Trypanosoma cruzi*: el invasor. Disponible en URL: <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy02/trypanosoma.htm>
34. Umezawa E, *et al.* Chagas' Disease. *The Lancet.* 2002;359:627.

35. Sosa-Estani S. IV. La seroepidemiología en la investigación de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Uruguay: Organización Panamericana de la Salud, Doc. Tec. 2001. (p. 15-22).
36. Brusés B, Lucero H, Gorodner J. Utilidad de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Argentina: UNNE. Disponible en URL: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/3-Medicas/M-027.pdf>
37. Houghton R, *et al.* Multiepitope Synthetic Peptide and Recombinant Protein for the Detection of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with Treated or Untreated Chagas' Disease. J. Infect. Dis. 2000;181:325-330.
38. Umezawa E, Nascimento M, Stolf AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2001;39:169-176.
39. Yabsley M, Pittman G & Pung O. Comparison of Serological Methods and Blood Culture for Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in raccoons (*Procyon lotor*). J. Parasitol. 2001;87:1155-1159.
40. Control de la Enfermedad de Chagas. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, Doc. Tec. No. 811. 1991. 102p. (P.17, 30)
41. De León M. Estudio Clínico, Serológico y Epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán, Santa Rosa. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. p. 69.
42. Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. Am. J. Epidem. 1987;126:161-169.
43. Murray P, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 8 ed. USA: ASM Press. Vols. 2, vol. 2, 2003. 2322p. (p.)

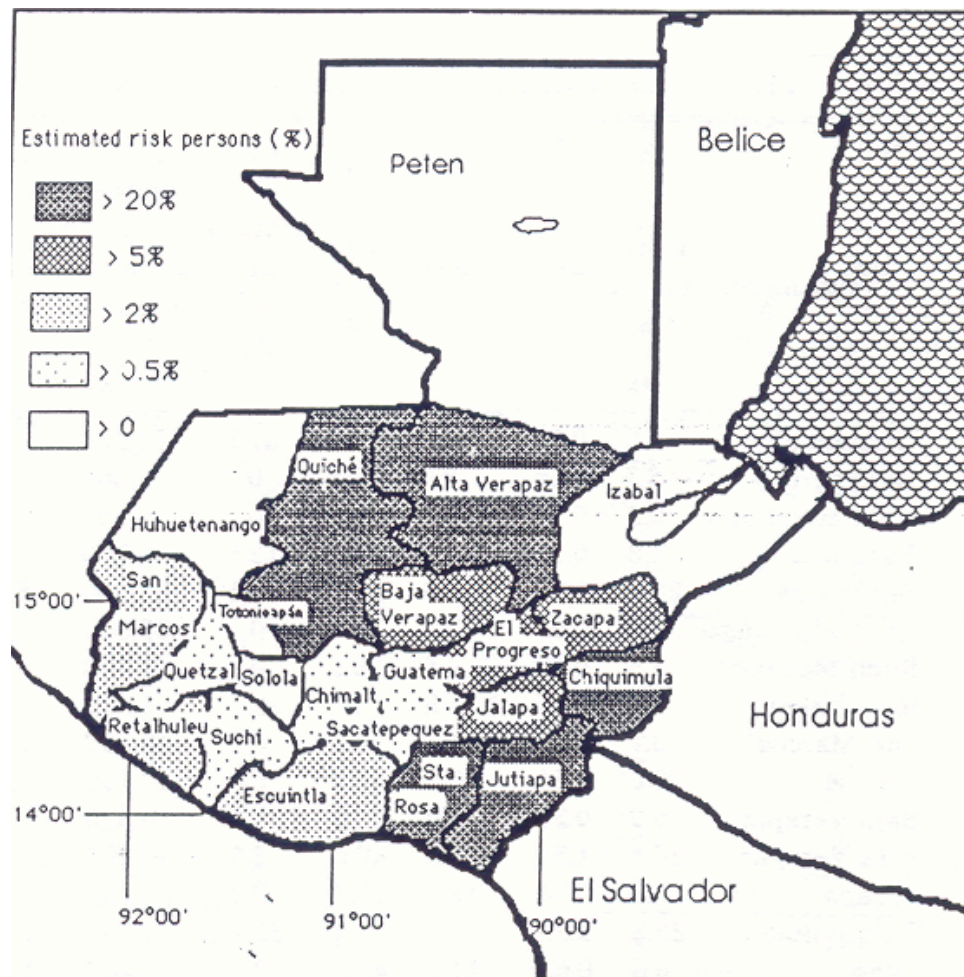
XIII. ANEXOS

Anexo 1. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas
en América Latina



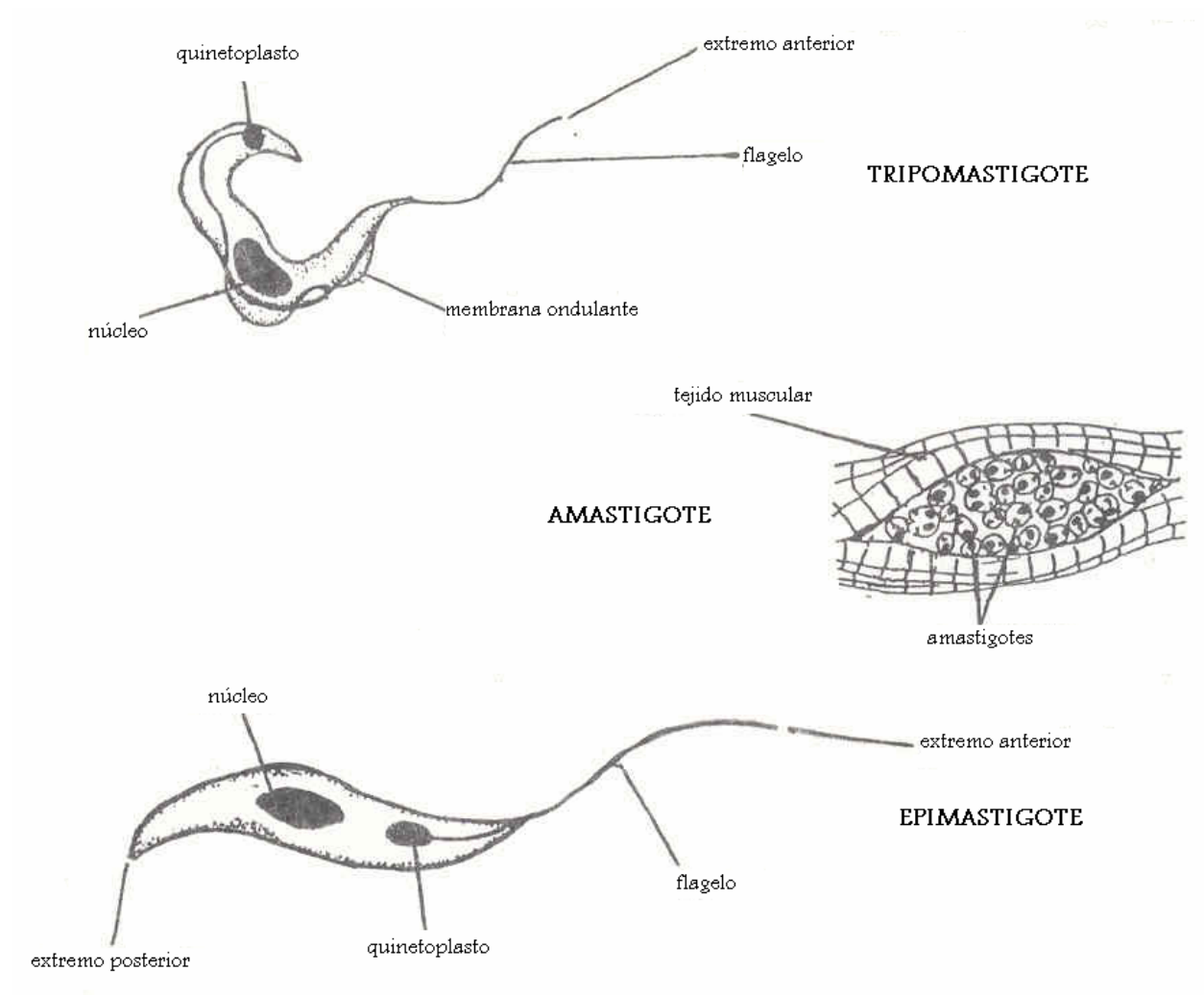
Tomado de: Control de la Enfermedad de Chagas. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, Doc. Tec. No. 811. 1991. 102p. (P. 30)

Anexo 2. Departamentos en riesgo de infección con Enfermedad de Chagas en la República de Guatemala.

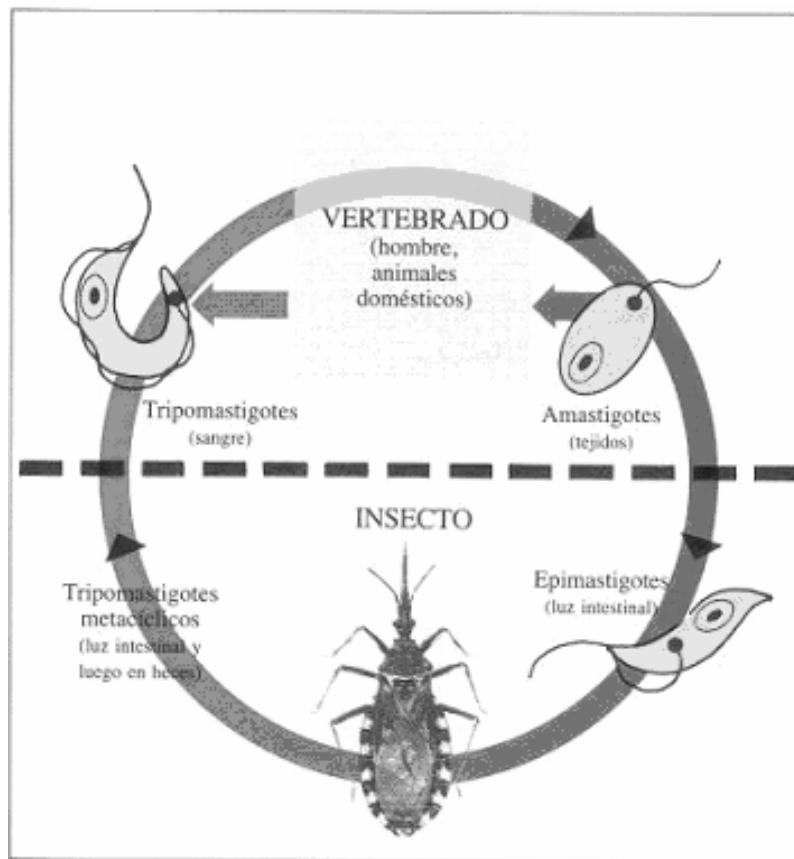


Tomado de: Tabaru Y, *et al.* The geographical distribution of vectors in Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* 1999;50:9-17.

Anexo 3. Morfología de *T. cruzi*

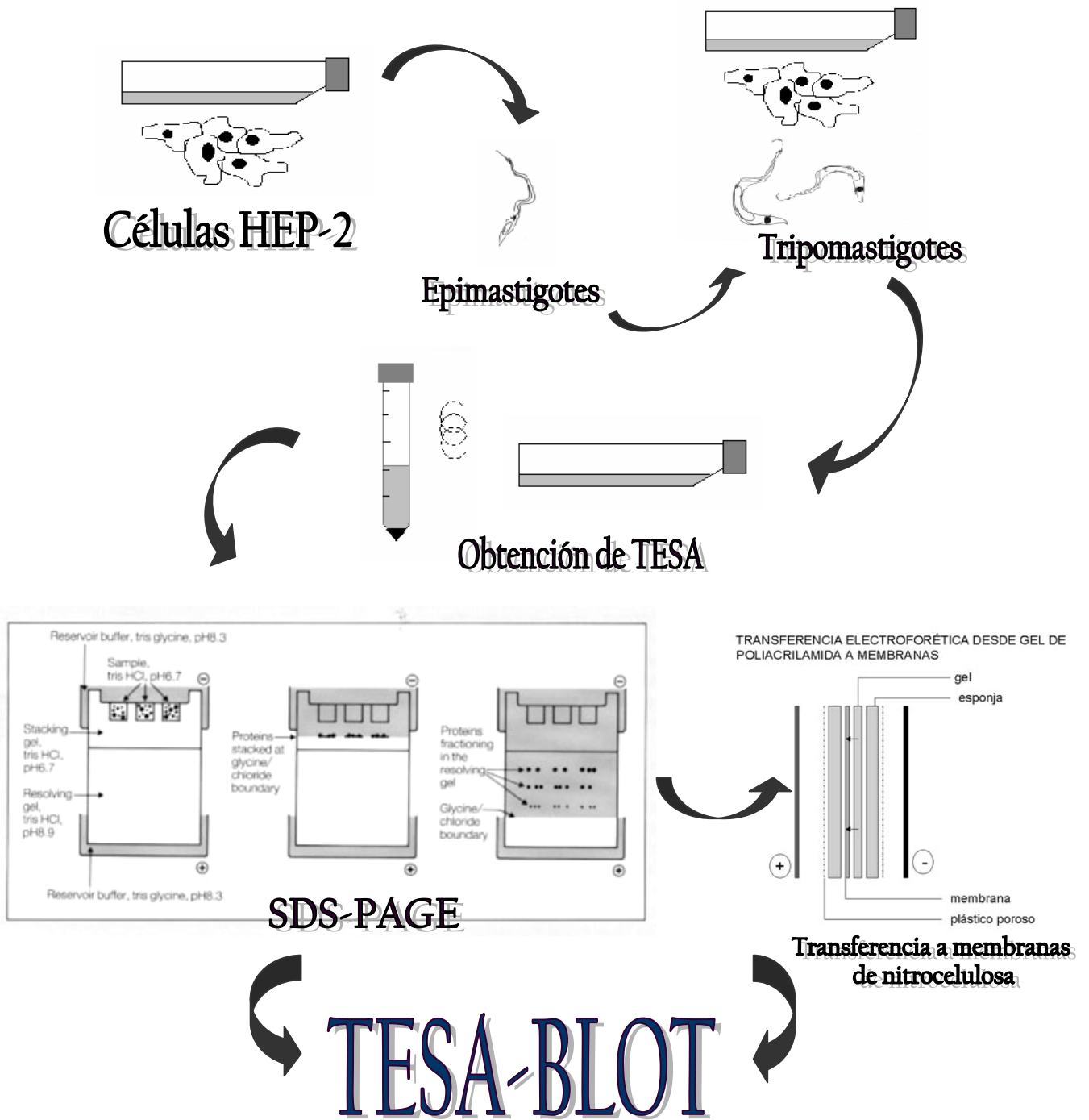


Tomado de: De León M. Estudio Clínico, Serológico y Epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán, Santa Rosa. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. p. 69.

Anexo 4. Ciclo evolutivo de *T. cruzi*

Tomado de: <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy02/trypanosoma.htm>

Anexo 5. Procedimiento para la producción de TESA-blot



Anexo 6. TESA-blot

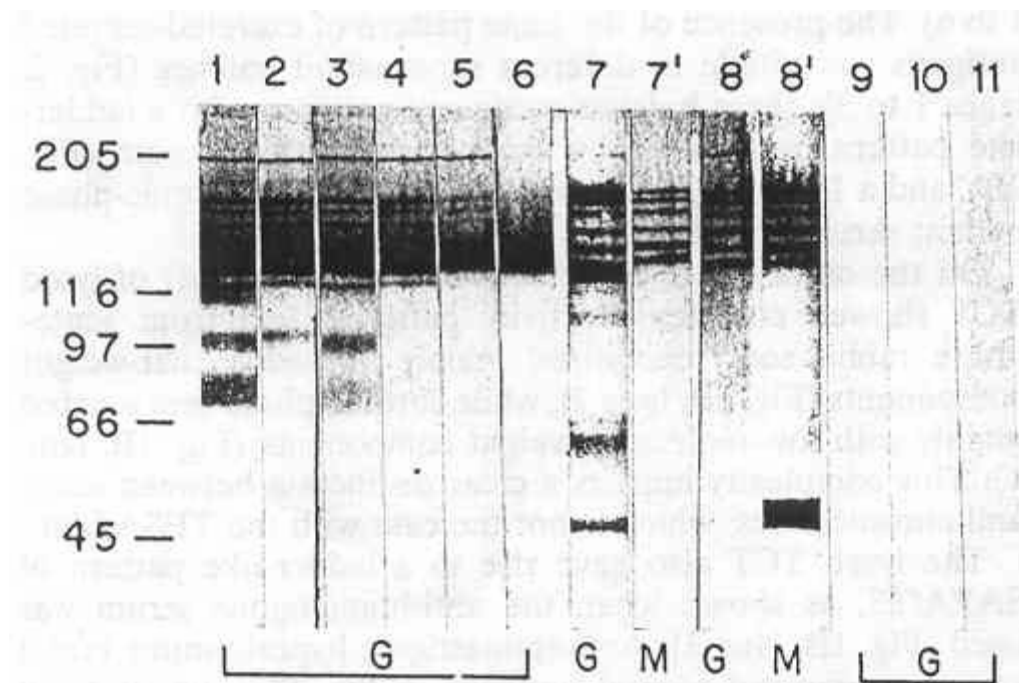


FIG. 3. TESA blot polypeptides recognized by IgG (G) from chronic (lanes 1 to 6) or acute chagasic patients (lanes 7 and 8) or by IgM (M) from acute chagasic patients (7', 8'). Patients in lanes 1, 5, and 6 were classified as having indeterminate forms and patients in lanes 2 to 4 were classified as having cardiac forms of chronic Chagas' disease. Patients in lanes 1, 3, and 6 were positive for PCR+Xe. Reactivities of IgG from nonchagasic groups are shown as follows: normal (lane 9), *T. rangeli* (lane 10), and leishmaniasis (lane 11). The lanes in this figure represent the patterns found in the 512 serum samples analyzed. Molecular mass markers are on the left.

Tomado de: Umezawa E, *et al.* Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas Disease. J. Clin. Microbiol. 1996;34(9):2143-2147.

Anexo 7. Análisis de resultados

		Sueros de referencia	
		+	-
TESA- blot	+	a	b
	-	c	d

$$\text{Sensibilidad} = a/(a+c)$$

$$\text{VPPP} = a/(a+b)$$

$$\text{Especificidad} = d/(d+b)$$

$$\text{VPNP} = d/(c+d)$$

$$\text{Coeficiente } Kappa (\kappa) = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde: Po = Proporción de concordancias observadas
 Pe = Proporción de concordancias esperadas

$$Po = (a+d)/(a+b+c+d)$$

$$Pe = \frac{[(a+b)(a+c)] + [(c+d)(b+d)]}{(a+b+c+d)^2}$$

Tomado de: Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misure of the Kappa statistic.
 Am. J. Epidem. 1987;126:161-169.

Anexo 8. Escala de concordancia *Kappa*

Kappa	Concordancia
< 0.00	Malo
0.00-0.20	Pobre
0.21-0.40	Sufrible
0.41-0.60	Regular
0.61-0.80	Buena
0.81-0.99	Óptima
1.00	Perfecta

Tomado de: Maclure M, *et al.* Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic.

Am. J. Epidem. 1987;126:161-169.

Ana Lidia Cabrera Aguirre

Autora

Licda. Vivian Lucrecia Matta Ríos

Asesora

Licda. María Paula De León Granados

Asesora

Licda. Amanda Elisa Gálvez Figueroa

Revisora

Lic. Martín Nestor Fernando Gil Carrera

Revisor

Licda. Alba Marina Valdés de García

Directora de Escuela

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano