

***Trypanosoma cruzi*: una glicoproteína de 85 kDa marcadora de la fase aguda de la enfermedad de chagas. Detección por una técnica simple**

Martin, Ubaldo O.

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo. 3000. Santa Fe, Argentina. Tel: (054-342) 457-5206. Int. 117. E-mail: umartin@fbcb.unl.edu.ar

RESUMEN: El diagnóstico de certeza de la fase aguda de la enfermedad de Chagas corresponde a la demostración de parasitemia, pero no es práctico y técnicamente complicado para aplicar en campo. Diferentes trabajos mostraron que la detección de anticuerpos no es sensible en esta fase, por lo cual fue promovida la investigación de antígenos. En este trabajo se seleccionó una población problema y sus controles de comparación. Se diseñó una reacción inmunoenzimática sencilla, empleando un anticuerpo monoclonal específico para epítopos de inmunógenos de *T. cruzi*. La reacción mostró una sensibilidad del 90%. Su especificidad fue satisfactoria. Un anticuerpo monoclonal mono específico constituye una ventaja y permite pesquisar epítopos de una o varias moléculas circulantes del parásito en sangre periférica. El diagnóstico de fase aguda es importante, porque es el único curable por tratamiento médico. La reacción es un nuevo instrumento del diagnóstico y los sistemas inmunoenzimáticos de elección sobre todo cuando la biología molecular no ha proporcionado otro recurso aplicable en la práctica.

Palabras claves: diagnóstico - Patología - Inmunología - Inmunógenos

SUMMARY: *Trypanosoma cruzi*: a Glycoprotein of 85 kDa which marks the acute stage of the Chagas Disease. Detection by means of a simple technique. Martin, Ubaldo O. The diagnosis of certainty of the Chagas Disease acute stage corresponds to the demonstration of parasitemia, but this is impractical and technically complicated to be applied in the field. Several studies have shown that the detection of antibodies is not sensitive during this stage, therefore, antigens research has been promoted. In this work, a problem population has been selected and its controls of comparison. A simple immunoenzymatic reaction was designed using a monoclonal antibody specific for epitopes of *T. cruzi* immunogens. The reactions showed a sensitivity of 90 % and an optimum specificity. A monoclonal antibody has a lot of advantages and epitopes of one or various circulating molecules of parasite can be found in peripheral blood.

The diagnosis of the acute stage is highly important, since it is the only one which can be cured with a medical treatment. This reaction is a new instrument for this diagnosis, the same as the immunoenzymatic systems of election mainly if we into account that molecular biology has not provided any other resource to be applied in practice.

Key words: Diagnosis - Pathology - Immunology - Immunogens.

Introducción

La Enfermedad de Chagas ó Trypanosomiasis Americana es causada por un parásito Protozoario denominado *Trypanosoma cruzi*, descubierto por un investigador brasileño, Carlos Chagas, en el año 1909 (1). Existen varias formas clínicas de la enfermedad, que forman dos grandes grupos: Fase Aguda y Fase Crónica. El diagnóstico de la infección inicial es de importancia relevante, en especial porque el tratamiento es efectivo y permite la curación del paciente. Situación discutible de alcanzar, con las drogas actuales, cuando el infectado es crónico. En zonas de transmisión vectorial, la población de impacto de la infección son los niños (2). Solamente un 5-10%

de ellos presentan sintomatología, el resto transcurre con una infección solapada, lo cual hace dificultosa su identificación en zonas rurales de América Latina. La metodología de certeza diagnóstica es la investigación microscópica de parásitos en sangre periférica, sesgo dificultoso en áreas rurales endémicas por variadas razones (ausencia de luz, traslado del microscopio, personal entrenado, etc.), pero en especial porque es poco práctico debido a la pérdida de tiempo que implica examinar una población numerosa.

La detección de anticuerpos (acs) en muestras de suero de pacientes con infección aguda (con parasitemia demostrada) revela que una alta proporción son negativos (3,4,5). Por lo cual, un método

que elimine estas desventajas es de gran valor en el diagnóstico y control de la enfermedad de Chagas.

En los últimos años, se puso un énfasis especial en la detección de antígenos (ags) circulantes en suero u orina de pacientes agudos (4,6,7). En nuestro grupo de trabajo, hemos caracterizado inmunógenos excretados-secretados de la forma trypomastigotes de *T. cruzi* y hemos descrito un anticuerpo monoclonal (AcM) que reacciona contra un epítipo de la proteína 85 KDa presente en aquellos inmunógenos excretados-secretados de la forma Trypomastigotes y en el suero de pacientes agudos. La sensibilidad del test de inmunocaptura en esta fase evolutiva fue del 84% (8).

En este trabajo, se describe un sistema ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), con una sensibilidad mayor y algunas ventajas en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Materiales y Métodos

a) Población en estudio: las muestras de suero fueron obtenidas de pacientes de las Provincias de Santa Fe y Santiago del Estero. Todos agudos (N=40) con signos y síntomas de enfermedad, principalmente un chagoma palpebral unilateral (9). Su edad oscilaba entre 1 y 20 años. En todos los casos la parasitemia fue positiva, por la técnica de concentración de hemoflagelados (10). El grupo de pacientes con infección crónica, en su mayoría adultos, estuvo integrado por enfermos con cardiopatía demostrada por signos clínicos, electrocardiográficos o radiológicos (N=18) e infectados asintomáticos (N=20).

b) Población Control: en los ensayos fue necesario emplear diferentes poblaciones controles a los efectos de hacer comparaciones de los resultados obtenidos con el grupo objeto de este estudio. Estas poblaciones correspondieron a: 1) poblaciones que habitan la misma zona endémica que los infectados por *T. cruzi*, de edad similar pero cuyos exámenes permitieron denominarla como población normal de control. Una correspondió a niños para cotejarlos con la población de agudos, y otra de adultos para compararlos con los infectados crónicos. Para los objetivos de este estudio, ambas conformaron un mismo grupo (N=18), en virtud de que no existían diferencias entre ellas. 2) poblaciones de zonas no endémicas para la enfermedad de Chagas, (N=10), todos

con altos títulos de Factor Reumatoideo (FR) de clase inmunoglobulina M, como control de especificidad (N=10). 3) poblaciones con otras infecciones parasitarias en fase clínica aguda, correspondieron a Leishmaniasis (*Leishmania braziliensis-braziliensis*) (N=9), infectados con *Toxoplasma gondii* (N=8).

Una muestra de sangre venosa fue obtenida de cada uno de ellos y separado el suero fue conservado en todos los casos en tres alícuotas a -20°C , hasta el momento de los ensayos. En el caso de la población objeto de este estudio y la población control las muestras fueron obtenidas en campo. Mientras que, las demás correspondieron a muestras conservadas a -20°C en el Programa Provincial de Control de Zoonosis del Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe.

c) Preparación de Antígenos Excretados-Secretados (ESA) de Trypomastigotes: esta preparación fue explicada detalladamente (8). Brevemente, los ags ESA fueron obtenidos en medio de cultivo celular libre de suero (RPMI 1640); caracterizados y purificados tal cual fue descrito (8).

d) Producción de hibridomas: el procedimiento fue el clásico descrito por Milstein (11); animales BALB/c fueron inyectados intraperitonealmente con 50 μg de ESA en 0,1 ml de solución salina emulsificada con 0,1 ml de Adyuvante Completo de Freund (ACF). A los 15 días, fueron inyectados en forma intraperitoneal y tres días antes del experimento de hibridación, se inyectó en forma intravenosa, con la misma dosis y la misma preparación con ACF. En el procedimiento de fusión, se utilizaron células de mieloma SP2/O y de bazo mezcladas en relación 1:10 tal cual fue descrito (12). Por técnicas de inmunodifusión doble, utilizando Acs contra Igs de ratón, se mostró que el AcM es mono-específico y de clase IgM.

e) ELISA para la detección de epítipos ESA, utilizando un AcM: policubetas de poliestireno fueron incubadas toda la noche a 4°C con el AcM anti-ESA contenido en líquido ascítico a razón de 5 μg /ml de un buffer que contenía 1,59 g de carbonato de sodio-2,93 g de bicarbonato de sodio en un litro de agua destilada ($\text{pH}=9,5$). Las policubetas fueron lavadas tres veces con solución salina de buffer de fosfatos (PBS), consistente en 8 g de ClNa , 0,2 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 2,9 g de $\text{NaHPO}_4.12\text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g de KCl en un litro de agua destilada ($\text{pH}=7,4$). Luego fueron incubadas con PBS que contenía un 2% de

albúmina sérica bovina durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación ocasional; luego se lavaron tres veces con PBS. Se agregó 50 ul de suero de cada paciente seleccionado para el ensayo. Los sueros fueron tratados previamente con Buffer de glicina-CIH (1 mM de glicina más 16 mM de CIH en un litro de agua destilada, pH=2,8 de la siguiente manera: poner 25 ul de suero con 25 ul de buffer). Agitar y neutralizar enseguida con 50 ul de PBS. Posteriormente diluir al 1/500 en PBS. Luego las policubetas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween, (PBS con 0,5 ml de Tween 20 por litro). Posteriormente se agregó el AcM diluido 1/2000 en PBS y se incubó 3 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas tres veces con PBS y se le agregó 50 ul de acs de cabra contra Igs de ratón, marcados con fosfatasa alcalina (Instituto Pasteur, París, Francia), diluidos 1/1000 en PBS durante 1 hora a 37°C. Luego fueron lavados tres veces con PBS-Tween. La cantidad de enzima retenida en la reacción inmunológica fue cuantificada usando 50 ul (1 mg/ml) de sustrato (4-nitrofenilfosfato en un buffer compuesto por 0,5 M Na₂CO₃ y 0,001 M Cl₂Mg, pH 10,4). Se incubó 1 hora

a 37°C y se detuvo la reacción por adición de 100ul de OHNa 2N. La intensidad de la reacción fue leída a 405 nm de longitud de onda usando el lector Multiscan Titertek. Diluciones y concentraciones óptimas del sistema fueron predeterminadas cuidadosamente en este test.

Resultados

En los sueros de los pacientes infectados con *T. cruzi* y en las muestras controles se estudió la presencia de ags ESA que contienen la proteína de 85KDa descrito anteriormente (8). Este ensayo emplea un sandwich con los epitopes en cuestión y el AcM en fase sólida y agregado en una segunda etapa; el revelado se hizo con un antisuero de cabra contra IgM de ratón marcado con fosfatasa alcalina. En este test los sueros fueron previamente tratados con buffer de Glicina-CIH (pH=2,8), para desdoblar los Complejos Inmunes Circulantes (CIC) y dejar libres los epitopes antigénicos (Fig. 1). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla:

Muestras de suero correspondiente a:	Total de casos	Resultados X= DO +/- DS
Chagas agudo	40	X= 0,91 +/- 0,62 (A1)
Chagas crónico	38	X= 0,28 +/- 0,34 (A2)
Controles normales	18	X= 0,19 +/- 0,03 (A3)
Leishmaniasis	9	X= 0,16 +/- 0,01 (A4)
Toxoplasmosis	8	X= 0,17 +/- 0,02 (A5)
Población control de zona no endémica con FR (+)	10	X= 0,17 +/- 0,02 (A6)

El análisis estadístico para comparar estos resultados, aplicando el test de Student, mostró la siguiente significación: A1 vs A3 = $p < 0,001$; A1 vs A2 = $p < 0,001$; A1 vs A4 = $p < 0,001$; A1 vs A5 = $p < 0,001$; A1 vs A6 = $p < 0,001$; A2 vs A3 = $0,01 < p < 0,05$; A3 vs A4 = $p < 0,15$; A3 vs A5 = $p > 0,10$; A3 vs A6 = $p > 0,15$

Estos resultados de la tabla fueron obtenidos después que los controles del sistema inmunoenzimático empleado fueron satisfactorios (test empleando otro AcM contra el Ag 5 del *T. cruzi* (3,8) para sensibilizar la placa, test sin agregado de sueros problema, test sin agregar el AcM secundario, etc.),

a los fines de demostrar que el sistema podría aplicarse sin sesgos técnicos.

Discusión y Conclusiones

El AcM anti-ESA que obtuvimos previamente, fue producido por la fusión de células de mieloma de ratón SP2/0 con linfocitos esplénicos obtenidos de ratones BALB/c inmunizados con el sobrenadante de cultivo de los trypomastigotes donde se encuentran los epitopes ESA (8). Un solo AcM que reconoce moléculas de 82-86 KDa cuyos epitopes parecen estar altamente conservados en las formas bioló-

gicas y cepas de *T. cruzi* (8). Los epitopes fueron investigados en *L. b. braziliensis*, *T. rangeli* y *O. volvulus*, en las fases estacionarias y logarítmicas de crecimiento de estos parásitos, con resultados negativos. Esto mostró la especificidad del anticuerpo monoclonal para ags de *T. cruzi*. Un AcM derivado de hibridoma de especificidad definida es sin duda un reactivo importante en el inmunodiagnóstico. Es homogéneo y puede ser producido en cantidades sin límites, aún cuando el ag inmunizante no sea puro (11).

Nosotros publicamos una alternativa de diagnóstico utilizando el mismo AcM en un ELISA de Inmuncaptura de ags acomplejados, revelando el test a través de la detección del isotipo de Ig (8). Previamente demostramos la formación de CIC en las distintas fases de la enfermedad de Chagas (13).

El test propuesto en este trabajo es más sensible, más simple y más económico. Una ventaja que consideramos importante es el tratamiento previo de los sueros con buffer ácido de Glicina-ClH que disuelve los CIC y deja libre los epitopes de ESA para que reaccionen con el AcM adherido a las policubetas. Otra ventaja es que el número de sueros de pacientes en fase aguda utilizados aquí, ha sido mucho mayor y suficiente para concluir con las condiciones de eficiencia y eficacia de toda prueba diagnóstica. Los resultados presentados demuestran la especificidad parasitaria del test utilizando un AcM contra Inmunógenos del *T. cruzi* excretados-secretados (Fig. 1). Es posible en la enfermedad de Chagas que el test no establezca una diferencia que permita una definición entre agudos y crónicos para todos los casos. Es cierto también que la definición tampoco es precisa por la investigación de la parasitemia y la clínica, en especial en área endémica algunos factores como por ejemplo las reinfecciones en los crónicos, la baja sensibilidad de la investigación de la parasitemia en sangre periférica, la misma historia natural de la enfermedad de Chagas, etc. son causales de los límites de la definición clínica. Ante esto, un test como el que se presenta aquí cobra mayor importancia en la aplicación práctica. Los resultados presentados permiten deducir que en toda la población infectada por *T. cruzi* (N=78), 4 casos de la población aguda no hubiesen sido sometidos a tratamiento, mientras que se trataría sin riesgos la población clasificada como crónica, cuyo test fue positivo. Más aún, se lo propone como importante en la definición de los indicadores epidemiológicos,

en especial en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica implementado en los niños, en las zonas altamente endémicas de América Latina.

Bibliografía

- 1- Chagas, C. Nova. 1909. Trypanosomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. Mem Inst Oswaldo Cruz, I: 159-218;
- 2- Chuit R. 1989. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Médicas. Universidad Nacional de Córdoba,
- 3- Martín UO, Maidana CG, Fernandez H, Marteleur A, Subias E. 1986. Anticuerpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* en niños con enfermedad de Chagas aguda, Medicina (B. Aires) 46: 167-169.
- 4- Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein A. 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J Clin Microbiol, 25: 133-137.
- 5- Cervetta L, Basso B, Castro I, Santamarina N, Moretti E; 1997. Enfermedad de Chagas. Reactividad serológica hacia antígenos crudos y semipurificados del *T. cruzi* en distintos grupos clínicos de pacientes. Medicina (B Aires), 57: 161-168.
- 6- Martín, UO, Afchain D, Loyens M, Maidana C, Capron A; 1989. *Trypanosoma cruzi*: circulating polysaccharide factors excreted in vitro and in vivo. Medicina (B Aires) 49: 33-36,
- 7- Bertot GM, Corral RS, Fresno M, Rodriguez C, Katzin AM, Grinstein S; 1998. *Trypanosoma cruzi*: tubulin eliminated in the urine of the infected host. J Parasitol, 84: 608-614,
- 8- Ouassii A, Taibi A, Loyens M, Martín UO, Afchain D, Maidana C, Candioti C, Cornette J, Marteleur A, Velge P, Marty B, and Capron A. 1991. *Trypanosoma cruzi*; a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. Am J Trop Med and Hyg, 45: 2.
- 9- Romaña C. 1935. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas; la conjuntivitis esquizotripanozoide unilateral. Mis Est Pat Reg Arg 22: 16-19.
- 10- Strout R G. 1962. A method for concentrating hemoflagelates. J Parasitol 48: 100-103.
- 11- Milstein C and Galfre P. 1982. Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedure. UNDP/WORLD BANK/WHO/TDR. Geneve, Switzerland.
- 12- Velge P, Ouassii MA, Cornette J, Afchain D, Capron A. 1988. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. Parasitology, 97: 1-14.
- 13- Martín UO, Afchain D, Marteleur A, Ledesma O, Capron A. 1987. Complejos Inmunes Circulantes en los distintos estados evolutivos de la enfermedad de Chagas. Medicina (B. Aires) 47:159-162.

Figura 1: Enfermedad de Chagas: Sistema ELISA para la detección de fase aguda

