

COMUNICACIONES

Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*

Victor M. Monteón P., Angélica Ramos E. y Pedro A. Reyes L.
Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología "I. Chávez" Juan Badiano No.1, México D.F. C.P. 15600, México.

(Rec. 17-VIII-1992. Acep. 14-VII-1993)

Abstract: An antigenic extract prepared from four different Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* cultured on BHI (three came from human cases-Agripina, Fidelfa and Ninoa, and other from triatoma-Cocula) were assayed with human sera. ELISA results always were consistent with clinical diagnosis. Sera from patients with a diagnosis of Chagas disease were reactive and non-chagasic sera were negative. Western blot of chagasic sera recognized antigens of molecular weight >81 kd, 81 kd, 54 kd, 42 kd, and 26 kd. Sera with high OD in ELISA reacted with more peptide bands. The soluble extract antigens prepared from Mexican isolates of *T. cruzi* and from the Brazilian Y strain have an homogenous and similar reactivity.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, chagas disease, western blot, ELISA.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por reduvidos hematófagos (*Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Cavernicola*, Mott 1972). Es una enfermedad limitada a América (W.H.O. 1960), el número de casos en México ha ido en aumento desde que fue reconocida en 1940 (Mazzotti 1940, Tay *et al.* 1980).

Se ha informando que la población de *Trypanosoma cruzi* es muy heterogénea y presenta un comportamiento clonal (Tibayrenc *et al.* 1990). También existe variación de comportamiento entre cepas (Andrade 1985).

No conocemos estudios realizados con extractos antigénicos de aislamientos mexica-

nos de *T. cruzi*, ni de su comparación con cepa de referencia internacional. Aquí se compara la reactividad serológica de sujetos con diagnóstico clínico de cardiopatía chagásica crónica (Gloss *et al.* 1990) con la reactividad de sueros de sujetos clínicamente sanos hacia la fracción obtenida por sonicación y centrifugación de cuatro aislamientos mexicanos (Agripina, Cocula, Fedelfa, Ninoa) y la cepa brasileña Y.

El extracto antigénico fue obtenido de parásitos cultivados en medio de Infusión cerebro-corazón, los que fueron sonicados en cama de hielo en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF, ácido amino caproico y EDTA a concentración final de 10 mM). El sonicado se centrifugó a 12 000g durante 30 min, el sobrenadan-

te se almacenó a -70 C (se le determinó proteínas por el método de Lowry *et al.* 1951).

Se trabajaron 20 sueros de pacientes hospitalizados con diagnóstico de miocardiopatía chagásica crónica (Gloss *et al.* 1990) y 20 sueros de individuos sanos. En los sueros chagásicos había sido demostrado anticuerpo reactivo por inmunofluorescencia indirecta (Monteón *et al.* 1989).

El ensayo inmunoenzimático en fase sólida se llevó a cabo en tiras Inmunolon II (Dynatech), sensibilizando con 100 μl de antígeno por pozo de cada uno de los aislamientos, con una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La dilución seleccionada para los sueros humanos fue de 1:400 incubando por 1 hr a 37 C . El inmunomarcador de cabra anti IgG humana-peroxidasa se diluyó 1:40 000. En cada ensayo se incluyeron controles negativos, positivos y blancos.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se hizo según Leamlí (1970). La electroforesis (500 μg de proteína) de antígeno se llevó a cabo en geles al 10% en condiciones no reductoras en una cámara Mini Protean II (Bio-Rad).

La Inmuno electrotransferencia a papel de nitrocelulosa se hizo según Towbin (1979) en la misma cámara.

El bloqueo del papel de nitrocelulosa se realizó en PBS-Tween 0.1% - Albumina bovina 3% durante toda la noche a 4 C . La dilución de los sueros humanos y la del inmunomarcador de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa fue 1:1 000, la reacción se puso de manifiesto con una solución de 30mg de 4 cloro Naftol diluido en 10ml de metanol y 50 ml de PBS con 50 μl de H_2O_2 . La reacción se detuvo con agua.

Los aislamientos mexicanos provienen de distintas zonas geográficas del país y distinta fuente: Agripina, Crónico (1985), Edo. Oaxaca; Cocula Triatoma (1968) Edo. Jalisco, Fidelfa Agudo (1985) Edo. Oaxaca y Ninoa, Agudo (1979), Edo. Oaxaca. Al ser utilizados como antígeno en los ensayos de ELISA no mostraron diferencias; los sueros positivos se comportaron como tales, un mismo suero enfrentado a los cuatro antígenos mostró diferencias mínimas en la lectura de densidad óptica (Fig. 1), el coeficiente de variación intraplaca fue del 10% mientras que el interplaca resultó de 20%.

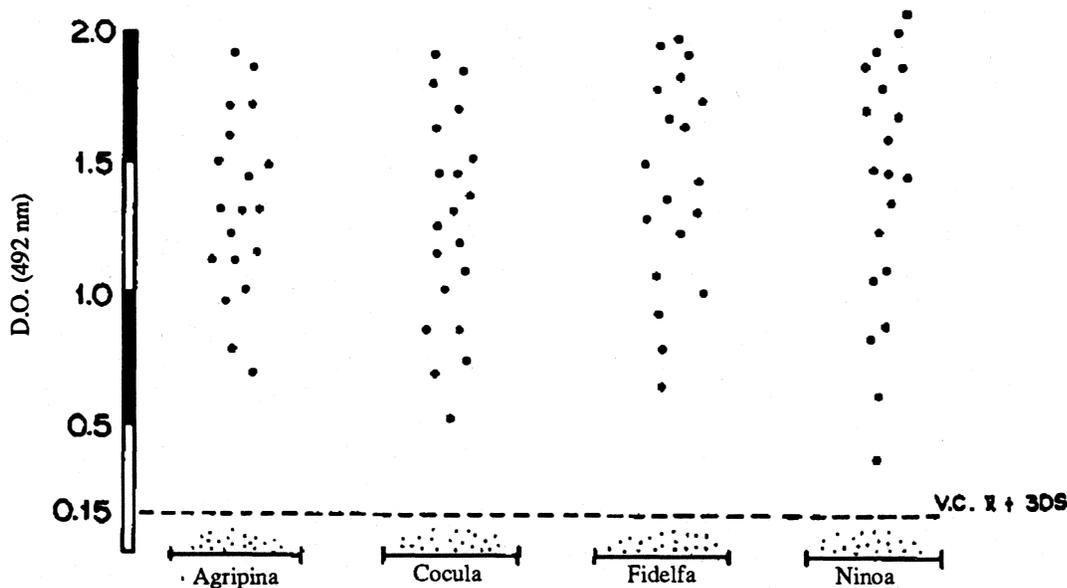


Fig. 1. Valores en Elisa de sueros chagásicos crónicos y sanos frente a extractos de varios aislamientos mexicanos. Dilución: 1-400.

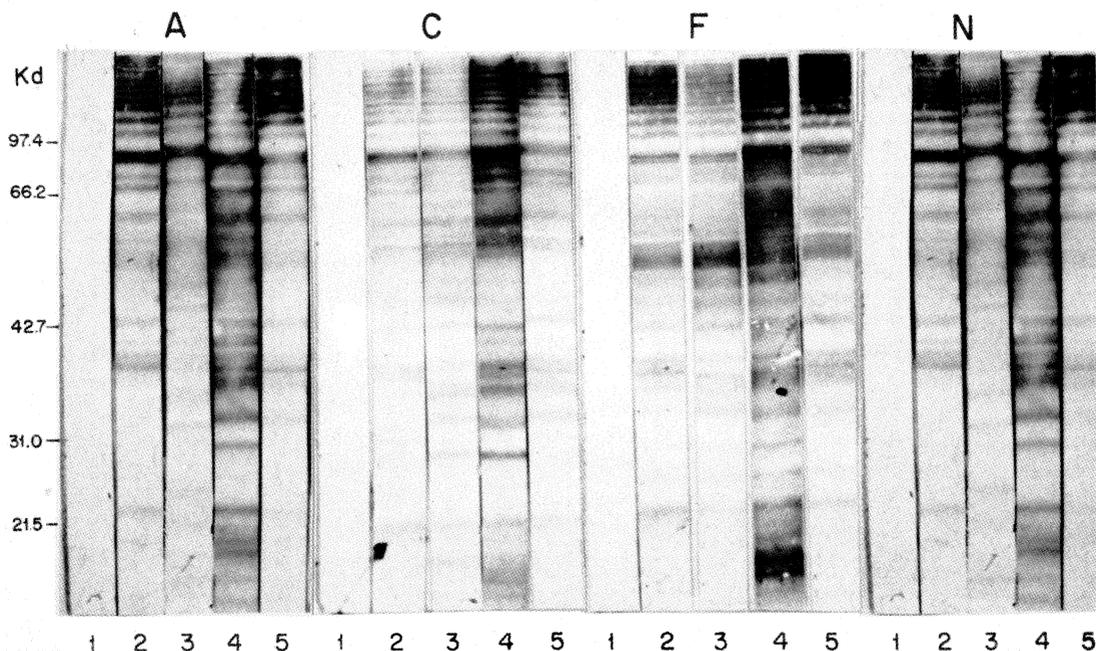


Fig. 2. Patrón antigénico de extractos de *Trypanosoma cruzi*. Aislamientos mexicanos. Carril 1 testigo sano, carriles 2 al 5 chagásicos. Electroforesis en SDS-PAGE al 10%. A Agripina, C Cocula, F Fidelfa, N Ninoa.

La sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA (Monteón *et al.* 1989) fueron 100% y 93% respectivamente.

Los patrones de reconocimiento antigénico de los aislamientos mexicanos fueron comparables entre sí tanto en posición como en número de bandas (Fig. 2).

Para fines de análisis el patrón antigénico se dividió en 3 zonas: 1 mayor de 65 kd; 2 de 65 a 40 kd y 3 menor de 40 kd.

En la zona 1 se observó el mayor número de bandas (alrededor de 20), con patrón similar en los sueros positivos probados; sobresalió un doblete de 81 kd, reconocido en los cuatro aislamientos mexicanos. En la 2 se observaron hasta 10 bandas, las dos más frecuentes tienen peso molecular alrededor de 54 kd y 42 kd y en la 3 la reactividad fue más irregular y hubo un número menor de bandas reconocidas.

Los sueros normales presentaron reactividad inespecífica hacia polipéptidos situados alrededor de 41 kd. Al comparar el patrón antigénico de los aislados mexicanos con el obtenido de la cepa Y, no observamos diferencias notables (Fig. 3).

Estos aislamientos mexicanos pertenecen al biotipo 3 de la clasificación de Andrade (1985). El patrón isoenzimático y la susceptibilidad a fármacos en datos preliminares (Ramírez y Jiménez 1990 y Noguera *et al.* 1990) sugieren que se trata de poblaciones distintas de parásitos.

En la literatura se ha informado que el patrón antigénico de *T. cruzi* de las cepas sudamericanas es similar (Mc Daniel *et al.* 1986) a pesar de existir variabilidad en componentes de superficie entre las poblaciones (Beard *et al.* 1988). Nuestra observación confirma estos datos, al comparar el patrón antigénico de aislamientos mexicanos de *T. cruzi* con una cepa de referencia brasileña, porque hasta donde sabemos no hay estudios con antígenos obtenidos de aislamientos mexicanos.

Ello tal vez es debido a que se ha especulado sobre la importancia de la enfermedad de Chagas en México, existiendo variedad de suposiciones, desde las que la consideran un problema de salud pública hasta aquellas que dicen que las cepas mexicanas son relativamente poco patógenas (Salazar *et al.* 1988, Velasco *et al.* 1992).

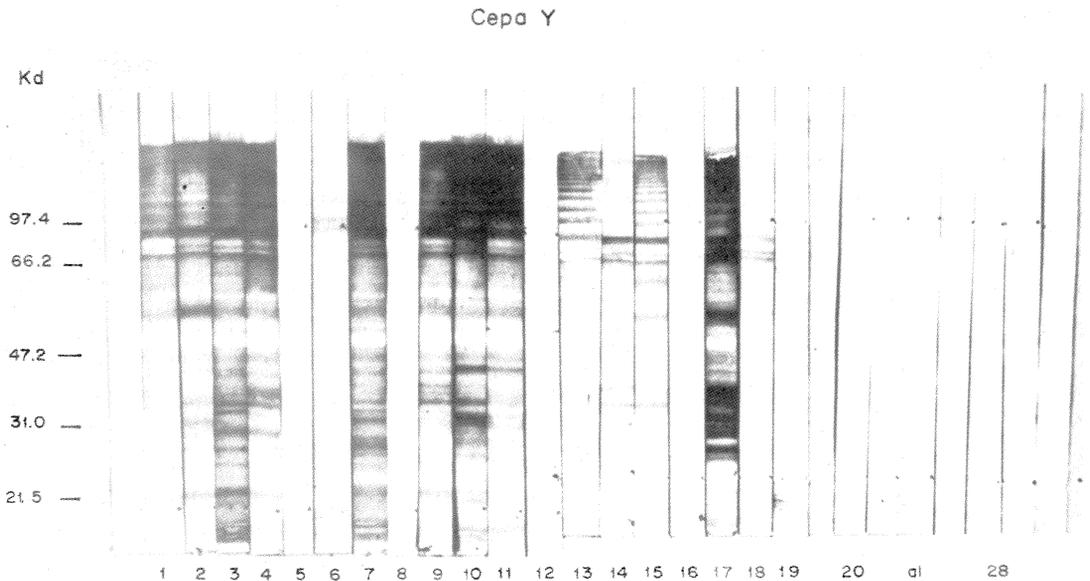


Fig. 3. Patrón antigénico de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Los carriles 1 al 4 corresponden a los sueros chagásicos positivos de la Fig. 2., en los carriles 20 al 28 testigos negativos. Electroforesis en SDS-PAGE al 10%.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Lourdes Calvo la donación de la cepa Y y a Marilú Hernández Juárez, por su invaluable ayuda.

REFERENCIAS

- Andrade, S.G. 1985. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 (supl.): 39-46.
- Beard C., R.A. Wrightsman & J. Manning. 1988. Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 KDa surface antigen gene family in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bioch. Paras.* 28: 227-234.
- Gloss, G., M. Barrera, V. Monteón & P.A. Reyes. 1990. Tripanosomiasis americana y cardiopatía chagásica crónica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 60: 261-266.
- Leamli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lowry, O. H., N.J. Rosebrough & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Mazzotti L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med.* 70: 417-420.
- Mc Daniel J., J. Russell J. & J. Dvorak. 1986. Identification and analysis of epimastigote surface and metabolic proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Bioch. Paras.* 19: 183-194.
- Monteón, P.V., T. Sosa & P.A. Reyes. 1989. Serological tests for American trypanosomiasis. A comparative study. *Rev. Latinoamer. Microbiol. Mex.* 31: 35-38.
- Mott, K.E. 1972. American Trypanosomiasis. p. 1065-1072. In P.D. Hoepflich (ed.) *Infectious Diseases*. Harper & Row, Nueva York.
- Noguera, T.B., A.R. Alejandro, M.L. Calvo, J.M. Cortés & R.C. Wong. 1990. Susceptibilidad de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en México al Radanil y Lampit. *Memorias III Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. México, México.*
- Ramírez, E. & Jiménez, E. 1990. Determinación de patrones isoenzimáticos de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias III Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. México, México.*
- Salazar P.M., I. de Haro & T. Uribarren. 1988. Chagas disease in México. *Paras. Today* 4: 348-351.
- Tay J., P.M. Salazar & M.I. Bucio. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *R. Sal. Púb. Mex.* 22: 409-450.

Tibayrenc, M., F. Kjellberg & A. Ayala F. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2414-2318.

Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon 1979. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Velasco, O., J.L. Valdespino, R. Tapia, B. Salvatierra, C. Guzman, C. Magos, A. Llaúsas, G. Gutierrez & J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Sal. Pub. Mex.* 34: 186-195.

W.H.O. 1960. Report of the advisory group on research in Chagas' disease. World Health Organization, Technical Report series, No. 22. Ginebra.