

Tesis de Maestría

Inhibición de la trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi como prueba confirmatoria en donantes de sangre

Blejer, Jorgelina L.

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magíster en
Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos
Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Blejer, Jorgelina L.. (2008). Inhibición de la trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi como prueba confirmatoria en donantes de sangre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5416_Blejer

Cita tipo Chicago:

Blejer, Jorgelina L.. "Inhibición de la trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi como prueba confirmatoria en donantes de sangre". Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5416_Blejer

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología

**INHIBICIÓN DE LA *trans*-SIALIDASA DE *Trypanosoma*
cruzi COMO PRUEBA CONFIRMATORIA EN DONANTES
DE SANGRE**

Dra. JORGELINA L. BLEJER

DIRECTORA: Dra. MARÍA SUSANA LEGUIZAMÓN.

79042

TESIS DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

2008

Para Julia, Cecilia
y Raúl.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UBA, por su apoyo, colaboración y ayuda constante, fundamentalmente a la Dra. María Susana Leguizamón, Directora de esta tesina, que me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio, a Paula Sartor, Marikena Risso, Daniel Musikant e Ivana Colaianni.

A todo el personal de la Sección Medicina Transfusional del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro, en especial al Dr. Horacio Joaquín Salamone, jefe de la Sección, por su constante estímulo y apoyo.

Al Dr. Oscar Bottasso de la Facultad de Medicina de la Facultad de Rosario por sus aportes y consejos.

A la Dra. Fernanda Frank por ceder los promastigotes de *Leishmania brasiliensis*.

Los resultados de esta Tesis de Maestría fueron publicados en:

Trans-sialidase Inhibition Assay for the detection of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donor samples from Argentina.

Blejer JL, Sartor PA, Bottasso O, Salamone HJ, Leguizamón MS.

Vox Sanguinis 2008;95:189-196.

INDICE

Contenido	Página
ABREVIATURAS	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	10
A. INTRODUCCIÓN	12
A.1. Enfermedad de Chagas.....	12
A.1.1. Transmisión por vía transfusional	13
A.1.2. Métodos de diagnóstico de <i>T.cruzi</i>	14
A.1.2.1.Métodos de diagnóstico en Bancos de Sangre	15
A.1.2.2. Problemática del Banco de Sangre.....	17
A.2. <i>trans</i> - Sialidasa.....	18
A.2.1. Respuesta humoral hacia la <i>trans</i> - Sialidasa	19
A.2.2. Inhibición de la actividad de <i>trans</i> - Sialidasa: TIA	20
B. OBJETIVOS.....	22
C. MATERIALES Y METODOS	23
C.1. Serología convencional	23
C.1.1. Hemoaglutinación Indirecta (HAI)	23
C.1.2. Enzimoinmunoensayo (ELISA)	23
C.1.3. Aglutinación de Partículas de gelatina (AP)	24
C.2.Tamizaje en donantes de sangre.....	24
C.2.1. Población de estudio.....	25
C.2.2. Cuestionarios a donantes de sangre.....	27
C.2.3. Criterios de exclusión.....	28
C.3. <i>trans</i> -sialidasa.....	28
C.3.1. Inducción y purificación de la <i>trans</i> -Sialidasa	28
C.3.2. Medición de la actividad de <i>trans</i> -Sialidasa.....	30
C.3.3. TIA: ensayo de inhibición de la actividad de <i>trans</i> -Sialidasa	31
C.4. Técnica de ELISA para <i>Leishmania</i>	32
C.5. Análisis estadístico	32
D. INSTITUCIONES PARTICIPANTES	33
E. REPAROS ÉTICOS	34
F. RESULTADOS	35
F.1. Purificación de la <i>trans</i> -Sialidasa	35
F.2. Prevalencia de anticuerpos anti- <i>T.cruzi</i> en donantes de sangre.....	36
F.3. Análisis por TIA en los diferentes grupos	37
F.3.1. Análisis por TIA en los grupos positivos.....	38
F.3.2. Análisis por TIA en los grupos débiles positivos	38
F.3.3. Análisis por TIA en los grupos falsos positivos y “borderline”	38
F.3.4. Análisis por TIA en los grupos negativos.....	42
F.4. Comparación de frecuencias y porcentajes de inhibición de muestras TIA positivas	42
F. 5. Análisis estadístico del riesgo epidemiológico.....	45
F.6. Reactividad frente a <i>Leishmania spp</i> en muestras TIA negativas con serología convencional positiva.....	45
G. DISCUSIÓN	47
H. CONCLUSIONES	53
I. REFERENCIAS	54

ABREVIATURAS

°C:	grados centígrados
µg:	microgramo
µl:	microlitro
ADN:	ácido desoxi-ribonucleico
AP:	aglutinación de partículas
BSA:	albúmina sérica bovina
cpm:	cuentas por minuto
DO:	densidad óptica
EDTA:	ácido etildiaminotetraacético
ELISA:	enzimoinmunoensayo
GPI:	glicosil-fosfatidil inositol
HAI:	hemoaglutinación indirecta
HPLC:	cromatografía líquida de alta performance
HRP:	peroxidasa
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IgG:	inmunoglobulina G
IMAC:	cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
IPTG:	isopropilo-L-thiol-β-D-galactósido
La:	lavado con buffer de siembra
M:	molar
mg:	miligramo
ml:	mililitro
mM:	milimolar
nm:	nanómetro
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPD:	O-fenilendiamina
P:	percolado
PBS:	solución buffer de fosfatos
PCR:	reacción en cadena de polimerasa
PM:	peso molecular
PMSF:	phenylmethylsulphonyl fluoride

RE:	riesgo epidemiológico
RIPA:	radioinmunoprecipitación
RP:	relación de positividad
rpm:	revoluciones por minuto
SAPA:	shed acute phase antigen
SC:	serología convencional
SDS:	duodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE:	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
TB:	terrific broth
TBS:	solución de buffer tris
TESA:	trypomastigote excreted secreted antigens
TMB:	tetramethylbenzidine
TS:	<i>trans</i> -sialidasa
WB:	western blot

RESUMEN

Trypanosoma cruzi se transmite habitualmente a través de las heces de los triatómidos infectados. La transmisión por transfusión es principalmente importante en áreas no endémicas y en áreas endémicas bajo control vectorial. Esta vía puede ser controlada detectando anticuerpos anti- *T. cruzi* en donantes de sangre. Los métodos convencionales no son lo suficientemente sensibles ni específicos y hasta el momento no está disponible ningún ensayo confirmatorio para las pruebas de tamizaje.

T. cruzi es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo*, lo adquiere a partir de los sialoconjugados del huésped mediante la *trans*- Sialidasa. Esta enzima no se ha detectado en parásitos que comparten su distribución geográfica. Los pacientes infectados crónicamente con *T. cruzi* producen altos niveles de anticuerpos neutralizantes de *trans*- Sialidasa, mientras que los que cursan la infección aguda poseen bajos niveles dependiendo del tiempo de evolución de la infección.

La técnica de Inhibición de la actividad de *trans*- Sialidasa, TIA, detecta anticuerpos contra la *trans*-Sialidasa y se ha demostrado que presenta alta sensibilidad y especificidad para la detección de la infección por *T. cruzi*.

Como alternativa para contribuir a resolver la problemática del Banco de Sangre, nos propusimos estudiar con la técnica de TIA, paneles de sueros obtenidos de donantes de sangre previamente analizados por los métodos convencionales: enzimoimmunoensayo, hemoaglutinación indirecta y aglutinación de partículas de gelatina. Para ello se distribuyeron en diferentes grupos:

1. Positivos (alta reactividad)
2. Positivos (débil reactividad)
3. Falsos positivos
4. "Borderline"

5. Negativos (sin antecedentes epidemiológicos)
6. Negativos (con antecedentes epidemiológicos)

Resultaron reactivas por TIA el 96,26 % de las muestras del grupo altamente reactivo, el 87,5 % del grupo con débil reactividad, el 40,7 % de las falsas positivas y el 52,3 % de las “borderline”. El 100 % del grupo negativo por la serología convencional sin riesgo epidemiológico fue TIA negativo, mientras que en 48 donantes con riesgo epidemiológico, una muestra fue TIA positiva.

Se detectaron diferencias significativas al comparar frecuencia de casos TIA positivos en donantes con riesgo epidemiológico, y aquellos sin riesgo de infección.

No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de muestras con diferente reactividad por serología convencional. Estos resultados nos permiten afirmar que el grado de neutralización obtenida empleando TIA, es independiente del grado de dificultad presentado por la serología convencional.

La aplicación de TIA en Bancos de Sangre, permitiría resolver el diagnóstico de pacientes con resultado inconcluso. Esto mejoraría el asesoramiento al donante y permitiría la reentrada del mismo para futuras donaciones. Asimismo, sería de gran utilidad para disminuir el riesgo transfusional al aplicarla en donantes con riesgo epidemiológico con resultados negativos por la serología convencional.

El conjunto de resultados previos y los obtenidos en este estudio apoyan la utilidad de TIA y su posible uso como técnica confirmatoria.

ABSTRACT

T. cruzi is usually transmitted through the faeces of infected triatomid insects. Transfusion of infected blood units becomes the primary route of transmission in areas with vectorial control and in nonendemic countries where screening programs have not been implemented. This way can be controlled detecting anti-*T. cruzi* antibodies in blood donors.

Conventional serology tests for *T. cruzi* Blood Banks screening are neither sensitive nor specific enough; no gold standard assay is available.

T. cruzi is unable to synthesize sialic acid “de novo”. Sialic acid is incorporated into their surface molecules by means of the enzyme *trans* - Sialidase. This enzyme has not been detected in other parasites which share geographical distribution. During the chronic phase infected patients display high levels of neutralizing antibodies against *trans* - Sialidase, while during the acute phase titers are lower and variable, depending on the time of infection evolution.

Trans-sialidase Inhibition Assay (TIA) detects neutralizing antibodies elicited against *T. cruzi trans*- Sialidase showing good accuracy.

As an alternative to contribute to resolve Blood Bank problematic, we have analyzed with TIA, sera panels from blood donor samples which were previously studied by conventional serology (enzyme immunoassay, indirect hemagglutination assay and particle agglutination). Therefore, the sera were distributed in different groups:

1. Positive (high reactivity)
2. Positive (low reactivity)
3. False positive
4. Borderline

5. Negative (without epidemiological risks)
6. Negative (with epidemiological risks)

The analysis of samples, showed that 96.26 % from the positive samples with high reactivity, 87.5 % from the positive samples with low reactivity, 40.7 % from the false positive and 52.38 % from borderline samples were TIA positive. All negative conventional serology samples from blood donors without epidemiological risks were TIA negative. However, within the group of donors presenting epidemiological risks, 1 out of the 48 samples gave a TIA positive result.

There were not significant differences between the percentages of inhibition in samples with different reactivity by conventional serology. These results allowed us to affirm that the degree of neutralization obtained with TIA is independent from the difficulty presented by conventional serology.

It was found a highly significant difference when comparing the frequency of TIA positive cases between donors at risk of infection with those without epidemiological risks.

TIA application in Blood Banks may be useful to resolve inconclusive samples, and thus improves blood donor counseling and allows the re-entry of individuals. The use of TIA in samples from donors with negative conventional serology but positive epidemiological antecedents, may also contribute to decrease transfusional risk.

Previous results and the results obtained in this study support TIA accuracy and suggest its possible use as a confirmatory test.

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, o Tripanosomiasis Americana, es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, que afecta a 16-18 millones de personas en países latinoamericanos (World Health Organization, 2002). Su distribución, desde el paralelo 40 de latitud norte hasta el paralelo 42 de latitud sur, coincide con la presencia de los insectos vectores adaptados a la vivienda humana (Kirchhoff LV, 2006). En el sur de América del Norte la transmisión es fundamentalmente silvestre.

Los vectores que diseminan el parásito son insectos reduvídeos. Se han descrito más de 130 especies y 16 géneros aunque sólo unas pocas especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* adquieren importancia epidemiológica como vehículos del parásito entre animales domésticos y humanos. *Triatoma infestans* es el principal vector en Argentina, Uruguay y en regiones de Brasil, Paraguay, Bolivia, Chile y de Perú (World Health Organization, 2002).

Las actividades del hombre, que irrumpieron en la transmisión selvática, permitieron que especies del vector se adaptaran a las viviendas humanas precarias, favoreciendo la "domiciliación" del mismo y por lo tanto la transmisión al humano.

La infección humana por transmisión vectorial ocurre por el acceso del *T. cruzi* al torrente sanguíneo a partir de las heces del insecto depositadas sobre el hombre. El vector se infecta al ingerir sangre de los mamíferos con tripomastigotes circulantes. En el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican como epimastigotes por fisión binaria y posteriormente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos localizándose finalmente en el intestino posterior. Cuando el vector infectado se alimenta de un mamífero, emite deyecciones conteniendo los

tripomastigotes metacíclicos, que pueden invadir las células en la puerta de entrada. Dentro de ellas se diferencian en amastigotes que se multiplican por fisión binaria y posteriormente a tripomastigotes. Por ruptura mecánica de las células los tripomastigotes quedan libres en circulación con capacidad de infectar otras células y diseminar la infección en el huésped.

Otras formas de transmisión de la infección son las transfusiones con sangre contaminada, la transmisión congénita, y en menor proporción, la infección por accidentes de laboratorio, por transplantes de órganos y por alimentos contaminados (World Health Organization, 2002).

En la infección humana por *Trypanosoma cruzi* se describen tres fases clínicas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda se presenta en general con síntomas inespecíficos y con alta parasitemia. La reacción inflamatoria generada por la entrada del parásito se conoce como “chagoma”, cuando ésta se produce por el ojo se induce el Signo de Romaña, que es patognomónico de la infección por *T. cruzi*. Posteriormente, los pacientes pasan por un largo período sin manifestaciones clínicas, con serología positiva y parasitemia muy bajas: fase indeterminada. Es de destacar la importancia de la búsqueda de anticuerpos en estos pacientes asintomáticos crónicos. Un tercio de esta población de pacientes infectados desarrollan muy tardíamente (20 años) las lesiones típicas del período crónico: miocardiopatía o megavisceras de colon o esófago. En nuestro país la cardiopatía es la forma clínica predominante.

A.1.1. Transmisión por vía transfusional

La vía transfusional adquiere mayor relevancia fuera de la zona endémica, así como en regiones bajo control vectorial. La ausencia de la implementación de programas efectivos en el tamizaje de donantes de sangre aumenta significativamente la

transmisión por esta vía (Schmuñis GA, 1991). El riesgo por unidad infectada transfundida es del 12-25 % (Wendel S, 1995).

Existe un número importante de personas que emigran desde América Latina a países no endémicos, lo que representa un riesgo de transmisión por vía transfusional en países desarrollados (Wendel S, 1993; Leiby DA, 2002). Tanto en EEUU como en Europa, se ha detectado infección por *T. cruzi* en donantes de sangre (Leiby DA, 1997; Frank M, 1997; Tobler LH, 2007) y se han descrito casos de transmisión de *T. cruzi* a receptores de transfusiones de hemocomponentes (Nickerson P, 1989; Cimo P, 1993; Leiby DA, 1999; Young C, 2007).

La transmisión por vía transfusional puede ser controlada aplicando técnicas de tamizaje eficaces para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* en donantes de sangre (Schmuñis GA, 1991).

En América Latina, la prevalencia de donantes de sangre infectados con *T. cruzi* es variable; del 2-3 % en grandes ciudades como Buenos Aires o Caracas al 62 % en Bolivia (Salles NA, 1996; Blejer JL, 2001).

A.1.2. Métodos de diagnóstico de *T. cruzi*

El diagnóstico durante la fase aguda de la infección se basa principalmente en la detección de los tripomastigotes sanguíneos, debido a los altos niveles de parasitemia que caracteriza este período de la infección. Los métodos habitualmente utilizados son el microhematocrito, frotis, gota gruesa y Strout.

El diagnóstico de laboratorio de la infección crónica por *T. cruzi* presenta mayor complejidad. Las pruebas parasitológicas como xenodiagnóstico y hemocultivo son específicas pero presentan una sensibilidad del 30 al 50 % debida a la baja parasitemia en el hombre. Por otra parte, el diagnóstico puede demorar más de un mes y deben

realizarse en centros especializados (Brenner, 1979). El ensayo de PCR para *T. cruzi* es específico pero la sensibilidad está ligada a la liberación intermitente de parásitos, es costoso y debe desarrollarse en laboratorios de cierta complejidad.

Por estas razones, las pruebas usadas corrientemente para demostrar la exposición al parásito, son los ensayos serológicos para detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (Kirchhoff LV, 1993).

A.1.2.1. Métodos de diagnóstico en Bancos de Sangre

Las pruebas convencionales utilizadas con mayor frecuencia son la hemoaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzoinmunoensayo (ELISA) (Saéz Alquézar A, 2003). Estos ensayos no son suficientemente específicos ni sensibles (Guhl F, 1987; Carvalho MR, 1993). Las preparaciones antigénicas derivan de extractos o fracciones semipurificadas de epimastigotes y los procedimientos técnicos difieren entre laboratorios, lo que genera reacción cruzada con *Leishmania spp* y *T. rangeli*. También son muy frecuentes los resultados indeterminados. Por otra parte, algunos pacientes chagásicos pueden presentar resultados falsos negativos (Luquetti AO, 1987). La reacción cruzada con las especies mencionadas es una problemática importante a resolver ya que las zonas endémicas se superponen con la de *T. cruzi*.

Debido a las dificultades de la serología convencional (SC), se recomienda el uso de al menos dos técnicas diferentes para el tamizaje serológico en Bancos de Sangre (Carvalho MR, 1993). En Argentina se utilizan dos ensayos obligatorios (par serológico) de acuerdo con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1991). Las técnicas empleadas generalmente son ELISA y HAI. En Brasil se ha discontinuado el método de HAI en diciembre de 2002, y

se recomienda en ese país utilizar únicamente el ensayo de ELISA, que emplea antígenos recombinantes o péptidos sintéticos y presenta mejor sensibilidad y especificidad (Saéz Alquézar A, 2003).

Los estudios realizados en donantes de sangre de diversos centros empleando diferentes ELISAs comerciales mostraron resultados satisfactorios, en cuanto a sensibilidad y especificidad, respecto de las HAIs (Pan AA, 1992; Brashear RJ, 1995; Oeleman WMR, 1998; Leiby DA, 2000). A pesar del bajo costo y facilidad de procesamiento, la HAI no presenta sensibilidad y especificidad adecuadas (Saéz Alquézar A, 1998).

Frecuentemente, las limitaciones de estas técnicas conducen a resultados discordantes obligando al descarte innecesario de unidades y además dificultan el correcto asesoramiento al donante, lo que dio lugar a la búsqueda de ensayos que mejoren la detección de la infección.

Para resolver las limitaciones de la SC se propusieron, a partir de la utilización de técnicas de la biología molecular, una serie de antígenos recombinantes de *T. cruzi* así como de péptidos sintéticos para uso diagnóstico (Frasch C, 1990; Umezawa ES, 1999; da Silveira JF, 2001; Umesawa ES, 2003). Los ELISAs que emplean antígenos recombinantes, ensayados con sueros de diferentes países de Latinoamérica, mostraron mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales, (Umezawa ES, 1999; Umezawa ES, 2003). Dado que los sueros individuales reaccionan con varios antígenos en formas diferentes, se propuso la utilización de mezclas de antígenos recombinantes para incrementar la sensibilidad (Umezawa ES, 2004). Se obtuvieron resultados similares utilizando péptidos sintéticos (Vergara U, 1991; Peralta JM, 1994).

A su vez, se ha desarrollado en EEUU una técnica de radioinmunoprecipitación (RIPA) con promisorios resultados y se lo ha propuesto como método confirmatorio en

dicho país (Leiby DA, 2000; Kirchhoff LV, 2006).

A.1.2.2. Problemática del Banco de Sangre

Por las razones mencionadas anteriormente, en cuanto a las dificultades en el diagnóstico preciso de la infección por *T. cruzi*, podemos resumir la problemática que representa su detección en el tamizaje de donantes de sangre mencionando que:

1. La especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas son altas cuando se evalúan muestras bien caracterizadas, sueros de personas con xenodiagnóstico positivo o sueros negativos de personas sin historia de exposición al *T. cruzi*. Pero cuando se utilizan combinaciones de ensayos serológicos en muestras obtenidas de estudios epidemiológicos o tamizaje en Bancos de Sangre en áreas endémicas, se detectan frecuentemente resultados discrepantes (Carvalho MR, 1993; Salles NA, 1996).
2. Ninguno de los métodos de diagnóstico presenta un 100 % de sensibilidad para el tamizaje de los donantes de sangre.
3. En áreas endémicas, en poblaciones de baja prevalencia como donantes de sangre, es de esperar que el valor predictivo positivo sea bajo, dando lugar a una importante cantidad de falsos positivos que deben ser confirmados por otros métodos.
4. Son de importancia las reacciones cruzadas con *T. rangeli* y *Leishmania spp.*

Para el tamizaje serológico de *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre es imperiosa la necesidad de ensayos cuyos resultados sean reproducibles y confiables, tanto con respecto a la sensibilidad como a la especificidad. La asociación de pruebas proporciona un gran número de resultados discordantes de difícil interpretación. Esta situación genera un problema de costo económico, y de pérdida de material biológico

valioso, y además causa ansiedad en los donantes de sangre, a quienes hay que informarles los resultados. No disponemos hasta el momento de una técnica que pueda ser considerada “gold standard” para definir estos resultados indeterminados.

Como alternativa para contribuir a resolver los problemas antes mencionados en la detección de la infección por *T. cruzi* nos propusimos estudiar paneles de sueros obtenidos de donantes de sangre con la técnica de Inhibición de la Actividad de la *trans*-Sialidasa (TIA).

A.2. *trans*- Sialidasa

Un grupo restringido de protozoos patógenos es incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo* pero los adquiere a partir de los sialoconjugados del huésped. *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. congolense* y *Endotrypanum* pueden incorporar ácido siálico a sus propias moléculas de superficie mediante una enzima llamada *trans*- Sialidasa (TS) (Frasch AAC, 2000). Esta actividad no ha sido descrita en *P. falciparum*, *Leishmania spp* ni en *T. rangeli* (Frasch AAC, 2000). No está presente en mamíferos, en ellos, la sialidación es mediada por sialil transferasas (Frasch AAC, 2000).

La TS utiliza como dadores residuos sialilo α 2-3 unidos a β galactosilos de glicolípidos o glicoproteínas (Parodi AJ, 1992). Los residuos terminales β galactosilos actúan como aceptores y el ácido siálico es siempre transferido en uniones α 2-3 (Frasch AAC, 2000).

La TS está organizada en dos dominios, uno N-terminal, en el cual reside la actividad enzimática (Campetella OE, 1994) y otro C-terminal, inmunodominante, compuesto de un número variable de repeticiones de 12 aminoácidos denominado SAPA (Shed Acute Phase Antigen) (Pollevick GD, 1991). La unión a la membrana plasmática del parásito está dada por GPI (glicosil fosfatidil inositol) y es liberada al

medio circundante. SAPA es responsable del aumento de la vida media de la molécula en circulación. La expresión de la actividad enzimática está regulada en los distintos estadios del parásito. Los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos la expresan en su superficie y la liberan al medio, mientras que los epimastigotes presentan una molécula activa sin la región repetitiva y el estadio amastigote no la expresa (Frasch AC, 2000).

La TS pertenece a una superfamilia de antígenos de superficie constituida por cuatro familias. La familia TS/SAPA/neuraminidasa es la única que contiene miembros activos (Frasch AC, 2000).

A.2.1. Respuesta humoral hacia la *trans*- Sialidasa

La región SAPA induce una fuerte respuesta humoral que es detectada muy tempranamente durante la infección humana y experimental (Reyes MB, 1990; Leguizamón MS, 1991). El antígeno SAPA como marcador de la infección humana aguda fue propuesto para el diagnóstico de la infección congénita (Reyes MB, 1990). Los anticuerpos anti-SAPA no neutralizan la actividad TS.

Los pacientes infectados crónicamente con *T. cruzi* producen altos niveles de anticuerpos capaces de neutralizar la actividad de TS, mientras que los que cursan la infección aguda poseen bajos niveles dependiendo del tiempo de evolución de la infección (Leguizamón MS, 1994). TIA (*trans*-sialidase inhibition assay) detecta dichos anticuerpos con alta sensibilidad y especificidad (Pereira-Chioccola VL, 1994; Leguizamón MS, 1994; Leguizamón MS, 1997). También se inducen anticuerpos hacia el dominio N terminal que carecen de capacidad neutralizante de la actividad enzimática.

A.2.2. Inhibición de la actividad de *trans*- Sialidasa: TIA

Los primeros ensayos utilizando TIA se realizaron empleando sueros de pacientes argentinos, brasileños y paraguayos (Pereira-Chioccola VL, 1994; Leguizamón MS, 1994) en los que hubo un 100 % de correlación con la SC. Los pacientes en etapas crónicas de la infección poseen anticuerpos capaces de neutralizar la actividad de la TS hasta en un 92 % mientras que los valores alcanzados en pacientes con infección reciente son menores y variables, dependiendo del tiempo de evolución de la infección (Leguizamón MS, 1994).

Se analizaron seguimientos de pacientes infectados por vía vectorial o transplacentaria que fueron tratados durante el período agudo. A ambas cohortes se las consideró parasitológicamente curadas, según los criterios actuales, es decir negativización parasitológica y serológica de los métodos convencionales. Se encontró persistencia de anticuerpos neutralizantes de TS con valores constantes en todos los seguimientos, aún 14 años post tratamiento (Leguizamón MS, 1997). Una posible interpretación de esta persistencia es que TIA sería un método de mayor sensibilidad que la SC, capaz de detectar la presencia de infecciones crípticas a pesar del tratamiento antiparasitario.

Posteriormente, se analizaron sueros muy particulares ya que provenían de aborígenes paraguayos que viven con alto riesgo de infección vectorial (800 vinchucas infectadas/vivienda) que permanecían negativos para los métodos parasitológicos y serológicos convencionales realizados en distintas oportunidades. En este grupo se detectó un 90 % de pacientes TIA positivos (Leguizamón MS, 1998, Buchovsky AS, 2001).

Por otra parte, este ensayo permitió resolver muestras que por serología convencional daban valores “borderline”. De ellos, el 94 % de las muestras de

aborígenes paraguayos con alta exposición vectorial fue reactivo por TIA, así como el 53 % de los pacientes provenientes de zona endémica del mismo país. Se analizaron 42 sueros de pacientes paraguayos y brasileños con cardiopatías o megavisceras idiopáticas, compatibles con las formas clínicas típicas de la enfermedad de Chagas. De ellos, dos resultaron positivos, uno que presentaba megaviscera y otro cardiopatía (Buchovsky AS, 2001).

En los estudios de especificidad (Buchovsky AS, 2001) se emplearon sueros de pacientes que padecían malaria, leishmaniosis, sífilis o enfermedades autoinmunes, todos seronegativos para *T. cruzi*. En todos los casos los sueros fueron no reactivos por TIA. Es de destacar la importancia del análisis de sueros de pacientes infectados con *Leishmania spp.*, ya que poseen antígenos que dan reacción cruzada con *T. cruzi* por los métodos convencionales, y presentan distribución epidemiológica superpuesta. En el norte de nuestro país la especie involucrada es *Leishmania braziliensis* que induce las formas clínicas cutánea y muco-cutánea, siendo dificultosa la discriminación serológica entre ambas infecciones. Del análisis de sueros de pacientes negativos para *T. cruzi* pero con infección por *Leishmania spp.*, diagnosticado por serología y por el hallazgo de amastigotes en lesión, se demuestra que TIA es específico para *T. cruzi*. También se analizaron sueros con infección mixta por *T. cruzi* y *Leishmania spp.* diagnosticada por serología convencional. La especificidad de TIA permitió discriminar los pacientes que sufren de ambas infecciones de los que sólo padecen infección por *Leishmania spp.* (Buchovsky AS, 2001).

B. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue evaluar a la técnica de TIA como posible “gold estándar” para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* utilizando paneles de sueros de donantes de sangre analizados previamente por métodos convencionales.

Para ello se trabajó con paneles de sueros con la finalidad de analizar:

1. Sueros con resultados de muestras en zona gris, con valores negativos por debajo del 20 % del valor de corte.
2. Sueros con resultados indeterminados.
3. Sueros de donantes negativos con y sin factores de riesgo.
4. Sueros de donantes positivos.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. Serología convencional

Las muestras fueron analizadas por los siguientes ensayos comerciales utilizados rutinariamente en la Sección Medicina Transfusional de la Fundación Favaloro. Las muestras se estudiaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las mismas se detallan brevemente a continuación.

C.1.1. Hemoaglutinación Indirecta (HAI)

Se empleó HAI Polychaco, Buenos Aires, Argentina. Se dispensaron 25 µl de diluyente de muestra en policubetas de 96 orificios. Se agregaron 25 µl de los sueros y del control positivo y se diluyeron al medio hasta la dilución 1/512. Se depositaron 25 µl de hematíes no sensibilizados en los pocillos de la segunda posición y 25 µl de hematíes sensibilizados con antígeno en los pocillos restantes. Se agitaron las policubetas durante 30 segundos y se dejaron en reposo durante un mínimo de dos horas a temperatura ambiente antes de la lectura. Se consideraron reactivas las muestras con títulos $\geq 1/32$.

C.1.2. Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Se empleó Chagatek, Biomerieux, Buenos Aires, Argentina. Se agregó a cada pocillo 200 µl de diluyente de muestra y en los pocillos correspondientes 10 µl de los controles (dos negativos y uno positivo) y 10 µl de cada muestra. Se incubó a 37°C durante 20 minutos. Luego del lavado con un lavador automático se dispensaron 100 µl de la solución de conjugado y se incubó nuevamente a 37°C durante 20 minutos. Luego del lavado se dispensaron 100 µl de la solución de sustrato/TMB y se incubó a

temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos. La lectura se realizó a 450 nm. El valor de corte se calculó como el promedio de los controles negativos más 0,100. La presencia de anti-*T. cruzi* se determinó relacionando la densidad óptica (DO) de la muestra con el valor de corte, obteniéndose la relación de positividad (RP). Se consideraron reactivas las muestras con $RP \geq 1$.

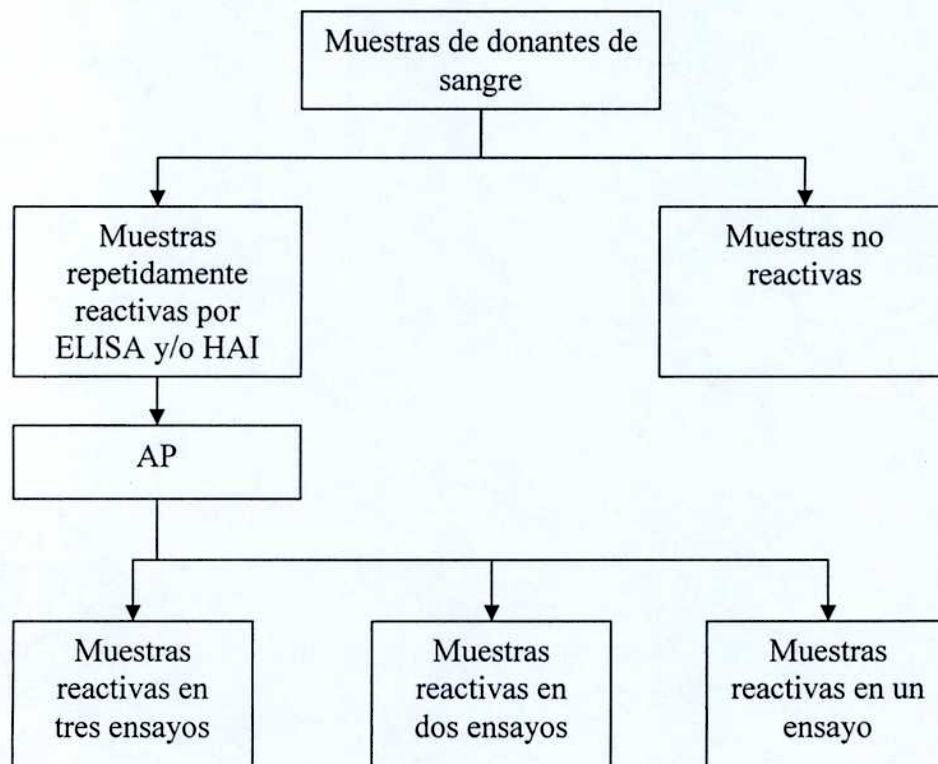
C.1.3. Aglutinación de Partículas de gelatina (AP)

Se empleó Serodia, Fujirebio, Tokio, Japón. Se dispensaron 75 µl de diluyente de muestra en los pocillos de posición 1 y 25 µl en pocillos de posición 2 y 3 de policubetas de 96 orificios. Se colocaron 25 µl de los sueros y del control positivo en la posición 1 y se realizaron las diluciones de los mismos. Se dispensaron 25 µl de Partículas de Control en los pocillos de posición 2 y 25 µl de Partículas Sensibilizadas en los pocillos de posición 3. Se agitaron las policubetas durante 30 segundos y se dejaron en reposo durante un mínimo de dos horas a temperatura ambiente antes de la lectura. Se consideraron reactivas las muestras con títulos $\geq 1/32$.

C.2. Tamizaje en donantes de sangre

Para la detección de donantes de sangre infectados por *T. cruzi* se utilizó el protocolo de tamizaje que se observa en la Figura 1. Los sueros que fueron reactivos en al menos dos de las tres pruebas se consideraron positivos.

Figura 1: Protocolo de tamizaje para anti-*T. cruzi* en donantes de sangre.



C.2.1. Población de estudio

Se seleccionaron 321 muestras a partir de 32.757 donantes consecutivos de reposición que concurrieron a la Sección Medicina Transfusional de la Fundación Favaloro desde enero de 2002 hasta diciembre de 2005.

Las muestras se distribuyeron en 12 grupos de acuerdo a su grado de reactividad para las técnicas de SC mencionadas. En el Cuadro 1 se describen los siguientes grupos:

- Positivos (G1, G2, G3 y G4): muestras que fueron reactivas para los tres ensayos o para dos ensayos con ELISA $RP \geq 2$.

- Débiles positivos (G5 y G6): muestras que fueron reactivas por dos métodos (ELISA $RP < 2$).
- Falsos positivos (G7, G8 y G9): muestras que fueron reactivas sólo por uno de los ensayos.
- “Borderline” (G10): muestras fueron negativas para la técnica de ELISA pero los valores de absorbancia eran elevados (hasta un 20% por debajo del valor de corte).
- Negativos que no presentaron riesgo epidemiológico (RE) (G11).
- Negativos que presentaron riesgo epidemiológico (RE) (G12).

Cuadro 1: Criterio de clasificación de muestras según su reactividad en la serología convencional.

Criterio	Grupo	Número de muestras	Resultado de la serología convencional			
			ELISA		HAI	AP
			Reactivo $RP \geq 2$	Reactivo $RP \geq 1 < 2$		
Positivo	G1	17	+		+	+
	G2	13		+	+	+
	G3	14	+		-	+
	G4	10	+		+	-
Débil positivo	G5	18		+	-	+
	G6	6		+	+	-
Falso positivo	G7	36	-	-	+	-
	G8	26	+		-	-
	G9	78		+	-	-
“Borderline” ^a	G10	21	-	-	-	NR
Negativo (sin RE)	G11	34	-	-	-	NR
Negativo (con RE)	G12	48	-	-	-	NR

RP: relación de positividad. RE: Riesgo epidemiológico. NR: No realizado.

a) Borderline: muestras negativas para HAI y ELISA y valores de absorbancia dentro del 20% debajo del valor de corte.

C.2.2. Cuestionarios a donantes de sangre

Todos los donantes de sangre respondieron a un cuestionario general destinado a detectar factores de riesgo con el objetivo de disminuir la posibilidad de transmisión de enfermedades por vía transfusional.

Con el fin de conformar grupos de serología negativa, sin y con factores de riesgo epidemiológico (G11 y G12 respectivamente), se diseñó un cuestionario más exhaustivo, relacionado al riesgo individual para infección por *T. cruzi* que se describe a continuación:

Cuestionario:

¿Vive o vivió en área rural (en el campo)? **SI** ☐ **NO** ☐ *Provincia*

.....

¿Trabaja o trabajó en área rural (en el campo)? **SI** ☐ **NO** ☐ *Provincia*

.....

¿Vive o vivió su madre en área rural
(en el campo)?

SI ☐ **NO** ☐ *Provincia*

.....

¿Trabaja o trabajó su madre en área rural
(en el campo)?

SI ☐ **NO** ☐ *Provincia*

.....

¿Ha recibido transfusiones?

SI ☐ **NO** ☐

¿Presentan sus hermanos la enfermedad de
Chagas?

SI ☐ **NO** ☐

¿Conoce a la vinchuca?

SI ☐ **NO** ☐

Muchas gracias

Los donantes con serología negativa que contestaron NO a todas las preguntas fueron incluidos en el G11.

Los donantes con serología negativa que contestaron SI a una de las preguntas y eran oriundos de provincias endémicas fueron incluidos en el G12.

C.2.3. Criterios de exclusión

- Las muestras fueron no reactivas para marcadores del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis C y/o Antígeno de Superficie para el virus de la hepatitis B.
- Las muestras no fueron lipémicas.

C.3. *trans*-sialidasa

C.3.1. Inducción y purificación de la *trans*-Sialidasa

La *trans*- Sialidasa recombinante con trece repeticiones de SAPA (TS-SAPA) está clonada en el vector de expresión pTrisHis (Invitrogen). En las bacterias *E. coli* transformadas, se expresa como una proteína de fusión con 6 histidinas terminales.

Para la expresión de las proteínas recombinantes se partió de una colonia aislada de *E. coli* BL21 transformadas que crecieron en medio líquido Terrific Broth (TB) más ampicilina (Sigma) 10 µg y 0,8 % glicerol. Una alícuota de este cultivo se creció a 37°C en medio TB-glicerol-ampicilina (dilución 1/50) hasta alcanzar biomasa (3-4 horas). Luego se indujo la síntesis proteica con IPTG (Sigma) 0,5 M a 18°C y posteriormente fueron cosechadas.

El pellet bacteriano, se resuspendió en buffer de lisis: Tris-HCl 40 mM pH=8,0 50 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) y 0,5 % Triton-X100. Se incubó durante aproximadamente 1 hora con el agregado de 5 mM MgCl₂ y 0,2 mg/ml de DNasa I (Sigma) hasta perder viscosidad.

El extracto crudo se centrifugó 45 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante se filtró con filtro Millipore de 0,45 micras.

La purificación se realizó utilizando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). Para ello se emplearon columnas HiTrap Chelating (Amersham) a las que se acoplaron Ni^{++} utilizando una solución de Cl_2Ni 300 mM pH 7,0. A continuación la columna se equilibró con buffer IMAC (Tris 20 mM, ClNa 500 mM) pH 8,0.

Posteriormente se sembró el sobrenadante filtrado (previamente ajustado a 500 mM Cl Na) con un flujo de 3 ml/minuto y se conservó el percolado. Luego se lavó con 30 ml de buffer de siembra equilibrio.

Para la elución se utilizaron dos concentraciones de imidazol: Imidazol 30 mM en buffer IMAC pH 6,8, luego buffer Imidazol 100 mM en buffer IMAC pH 6,8. Se colectaron 6 fracciones de 1 ml cada una.

En las fracciones de elución el grado de purificación se verificó por SDS-PAGE (7,5 %). Una alícuota de la muestra a analizar se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 5 minutos previa resuspensión en buffer de muestra para proteínas de pH 6,8 que contiene Tris-HCl 15 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 4 % SDS 0,1 % y DTT 1 mM como agente reductor. La electroforesis se realizó con buffer de corrida de pH 8,3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %) a 150 V durante aproximadamente 75 minutos y la tinción de los geles con Coomassie Blue R-250 0,5 % (Sigma) en solución acuosa con metanol 50 % y ácido acético 10 %. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

Las fracciones recolectadas se dializaron en buffer Tris 20 mM y 20 mM Cl Na pH 8 a 4°C. El segundo paso de purificación se realizó por la técnica de intercambio iónico en un equipo de HPLC (Äkta, Pharmacia), utilizando una columna MonoQ-

Sepharosa (Amersham) equilibrada con el buffer de diálisis. Para la elución se empleó en este caso un gradiente lineal de NaCl 20 a 500 mM en buffer Tris 20 mM de pH 8,0. Posteriormente se midió actividad de *trans*-Sialidasa en las fracciones de interés.

C.3.2. Medición de la actividad de *trans*-Sialidasa

La actividad enzimática, en un volumen final de 30 μ l, se midió detectando la transferencia de residuos de ácido siálico entre un dador y un aceptor marcado radiactivamente (Leguizamón MS, 1994).

Se expuso la enzima a una mezcla de reactivos que contenía 1 mM N-acetil-neuraminil-lactosa (Sigma) como dador de ácido siálico en la conformación que reconoce la enzima y 12 μ M D-glucosa-C¹⁴-lactosa 54 mCi/mmol (Amersham) como aceptor de ácido siálico, en buffer Tris 20 mM de pH 7,6 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La reacción se detuvo con 1 ml de agua bidestilada. Posteriormente se agregaron 150 μ l de una suspensión densa en agua de la resina de intercambio aniónico QAE-Shepadex A- 25 (Sigma) que captura las moléculas del aceptor radioactivo con carga negativa debido a la transferencia de ácido siálico por la enzima.

Se agitó varias veces durante 10-15 minutos y luego se centrifugaron los tubos (2000 rpm, 1 minuto) y se descartó el sobrenadante cuidando de no levantar perlas de QAE.

A continuación se realizaron dos lavados con 1 ml de agua bidestilada. Las moléculas adsorbidas se eluyeron con 0,8 ml de NaCl 0,5 M y luego de 10 minutos de incubación se centrifugó 1 minuto.

El eluido se transfirió a viales (Polistor) con 2 ml de líquido de centelleo sintético biodegradable Optiphase Hisafe3 (Perkin Elmer). La cuantificación de la

transferencia de ácido siálico se realizó midiendo la radiactividad (en cpm) en un contador de centelleo líquido β (Beckman).

C.3.3. TIA: ensayo de inhibición de la actividad de *trans*-Sialidasa

La actividad de la enzima circulante es inhibida por anticuerpos neutralizantes del huésped durante la infección, los cuales son detectados de manera específica por el ensayo denominado TIA (Leguizamón MS, 1998, Buchovsky AS, 2001).

Para la realización de TIA, se preincubaron 15 μ l de los sueros problema con 10 μ l de una dilución de TS recombinante capaz de generar aproximadamente 4000 cpm, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a medir la actividad enzimática remanente según se detalló en la Sección C.3.2.

En todos los casos las muestras se procesaron por duplicado, utilizando como controles negativos y positivos mezclas de sueros de donantes de sangre.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la actividad enzimática TS (Leguizamón MS, 1994), considerando 0 % de inhibición los valores obtenidos con los sueros normales (Leguizamón MS, 1997). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \frac{\text{cpm muestra} - \text{cpm blanco}}{\text{cpm suero normal} - \text{cpm blanco}} \right] \times 100$$

La determinación se consideró positiva para aquellas muestras que arrojaron un índice superior a 50 %.

C.4. Técnica de ELISA para *Leishmania*

Sobre microplacas para ELISA de poliestireno (Nunc) se adsorbieron durante toda la noche a 4°C 1 µg por pocillo de lisado total de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Los sitios libres de antígeno se bloquearon con PBS-5 % leche descremada durante 1 hora a 37°C, incubando a continuación durante 2 horas a la misma temperatura 100 µl de los sueros diluidos 1/100 en PBS-1 % leche descremada.

Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios de conejo específicos para IgG humana total conjugado a HRP (Dako). El anticuerpo secundario se diluyó en PBS-1 % leche descremada (dilución 1/6.000) y se incubaron 100 µl de la dilución durante 1 hora a 37°C. El revelado se realizó utilizando peróxido de hidrógeno (Riëdel de Häen) diluido en buffer citrato pH 5,2 en presencia de OPD (Sigma) como sustrato. La reacción enzimática se detuvo por agregado de 20 µl de H₂SO₄ 1N.

Entre cada una de las incubaciones se realizaron 5 lavados con de buffer TBS (pH 7,5) adicionado con 0.05 % Tween 20 (Sigma). Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro, a 490 nm.

C.5. Análisis estadístico

Se compararon frecuencia de pruebas reactivas y niveles de anticuerpos. Las variables categóricas se analizaron por los métodos de χ^2 o Fisher cuando correspondía, mientras que los análisis no paramétricos de varianza y la prueba de Mann Whitney fueron utilizadas para evaluar diferencias en valores promedio. Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

D. INSTITUCIONES PARTICIPANTES

El estudio preliminar de tamizaje de muestras se realizó en su totalidad en la Sección Medicina Transfusional del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular (ICYCC), Fundación Favaloro. La Sección opera con controles de calidad externa, provenientes de la Organización Panamericana de la Salud y Hospital Garrahan y controles de calidad internos de elaboración propia.

Todos los estudios de TIA se procesaron en el Departamento de Microbiología, Área Parasitología de la Facultad de Medicina, UBA.

E. REPAROS ÉTICOS

Los donantes dejan constancia de su donación voluntaria y dan su consentimiento para que la muestra obtenida sea estudiada y utilizada por la Fundación Favaloro para la Docencia e Investigación Médica según lo considere apropiado.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y por el Comité de Bioética para Investigación Clínica de la Fundación Favaloro.

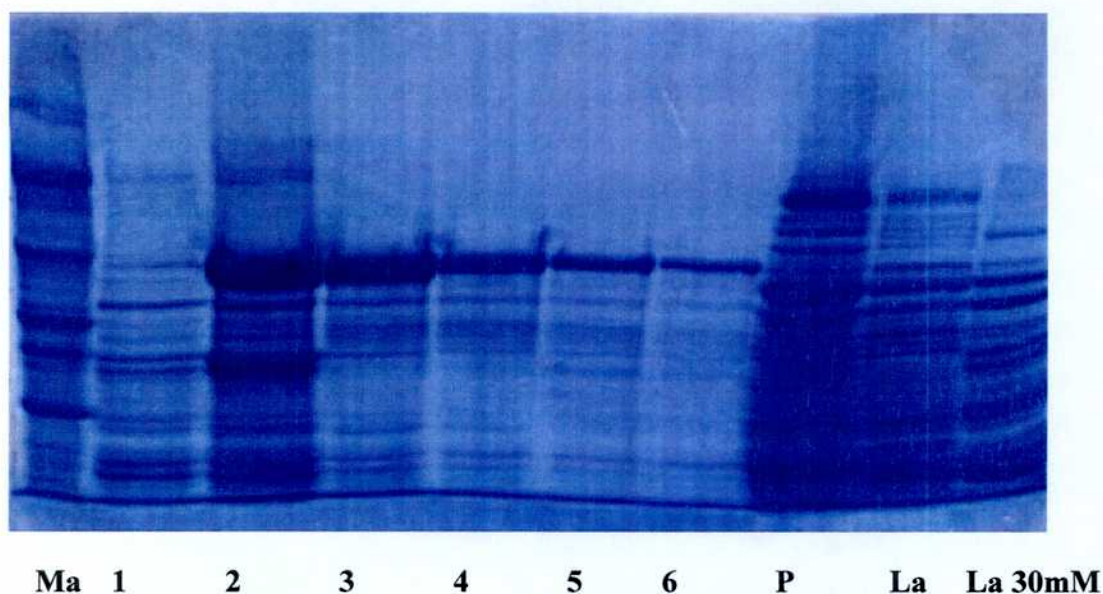
F. RESULTADOS

F.1. Purificación de la *trans*-Sialidasa

La producción de la enzima recombinante se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, los resultados se muestran a continuación.

En la Figura 2 se observa la tinción del gel con Coomassie Blue de las distintas fracciones obtenidas al purificar la TS mediante una columna IMAC (Inimoacetic Metal Affinity Chromatography) HiTrap Chelating (Amersham).

Figura 2: Gel de las distintas fracciones de la purificación de la TS mediante IMAC.



Ma: Marcador de Peso Molecular. 1 – 6 Fracciones 1 a 6 de la elución de la columna con Imidazol 100 mM en buffer IMAC pH= 6,8. P: Percolado. La: Lavado con buffer de siembra IMAC pH = 8,8; L 30mM. Lavado con Imidazol 30 mM en Buffer IMAC pH = 6,8.

En el Cuadro 2 se observa la DO de cada una de las fracciones, la concentración proteica y la actividad enzimática de las mismas.

Cuadro 2: Concentración proteica y actividad enzimática de las fracciones.

Fracción	DO	Concentración proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Actividad enzimática Cpm
1	1,123	6,522	1263/1190
2	1,077	58,4	14476/14562*
3	0,93	18,4	11280/10592 *
4	1,19	7,5	6179/5791 *
5	0,955	4,05	3322/3477 *
6	0,875	4,05	1808/1954 *
P			608/458
L			675/578
L 30mM			876/609

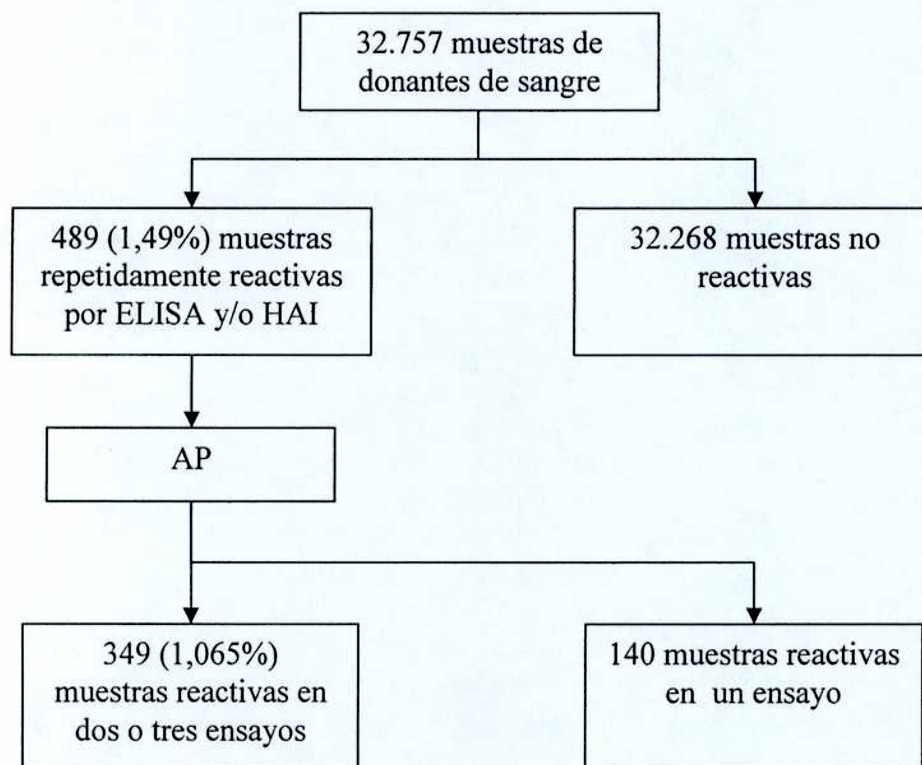
* las cpm son las obtenidas con las diluciones 1/500.

De acuerdo a lo detallado en la Figura 2 y en el Cuadro 2, se han utilizado las fracciones 2 a 4 para el segundo paso de purificación en un equipo de HPLC. Se colectaron distintas fracciones y las que presentaron mayor actividad enzimática se congelaron a -20°C en glicerol 50 %.

F.2. Prevalencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en donantes de sangre

La prevalencia observada en los donantes que concurrieron durante el período 2002-2005 se detalla en la Figura 3.

Figura 3: Prevalencia obtenida mediante diferentes técnicas de la serología convencional.



Es de hacer notar que el 28,63 % de las muestras (140/489) fueron consideradas falsas positivas, por ser reactivas sólo por un método.

F.3. Análisis por TIA en los diferentes grupos

Según se describe en el Cuadro 1 de Materiales y Métodos, las muestras se agruparon, según las reactividades presentadas con las distintas técnicas de SC, en Positivas (G1, G2, G3 y G4), Débiles positivas (G5 y G6), Falsas positivas (G7, G8 y G9) y “Borderline” (G10). Las negativas se agruparon en un grupo sin factores de riesgo epidemiológico (G11) y otro con factores de riesgo (G12) de acuerdo a las respuestas brindadas por los donantes a los cuestionarios presentados.

F.3.1. Análisis por TIA en los grupos positivos

Los resultados obtenidos al ensayar muestras positivas por SC (G1 al G4, Cuadro 1) arrojaron un 96,29 % de casos TIA positivos (Figura 4). Una muestra presentó un porcentaje de inhibición muy próximo al valor de corte y otra un valor de TIA negativo (5 %).

F.3.2. Análisis por TIA en los grupos débiles positivos

Al analizar las muestras débiles positivas (G5 y G6, Cuadro 1), el 87,5 % fueron positivas por TIA (Figura 5). Las tres muestras que no presentaron neutralización de la actividad de TS (dos negativas y una con valores cercanos al valor de corte) corresponden al grupo que incluye reactividad por ELISA y HAI (Grupo 6), siendo esta última una técnica de utilidad discutida (Sáez Alquézar, 1998). En contraste, las muestras débilmente positivas por ELISA y AP (Grupo 5) presentaron una correlación del 100 % con TIA.

F.3.3. Análisis por TIA en los grupos falsos positivos y “borderline”

Con respecto al grupo falso positivo con reactividad únicamente por HAI (G7, Cuadro 1), sólo una muestra de 36 (2,27 %) resultó positiva por TIA (Figura 6). Al analizar las muestras con reactividad sólo para ELISA (G8 y G9, Cuadro 1) y “borderline” (G 10, Cuadro 1) se observó que la positividad por TIA fue del 26,9 %, 62,8 %, y 52,3 % en cada grupo respectivamente (Figura 6). El G7 presentó una frecuencia de positividad para TIA con diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al resto de los grupos falsos positivos (G8 y G9).

Figura 4: Reactividad por TIA en muestras con serología convencional positiva.

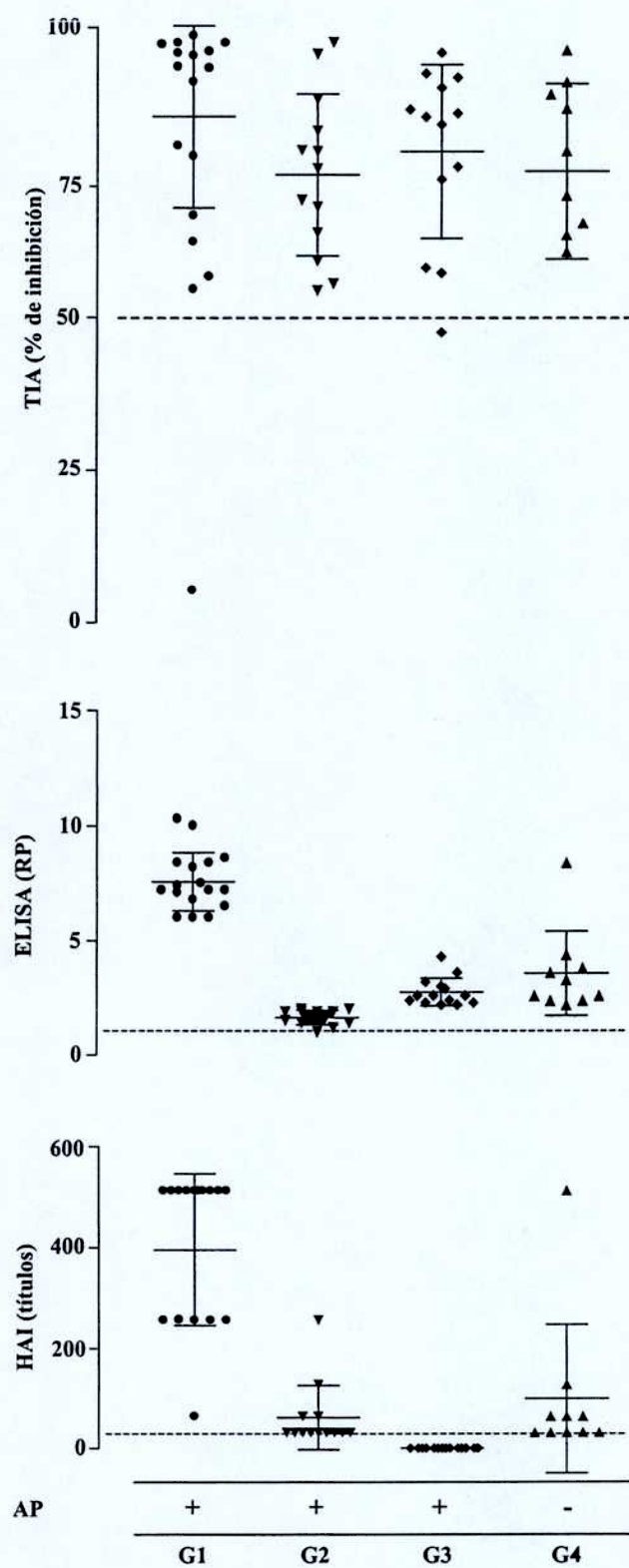


Figura 5: Reactividad por TIA en muestras con serología convencional débil positiva.

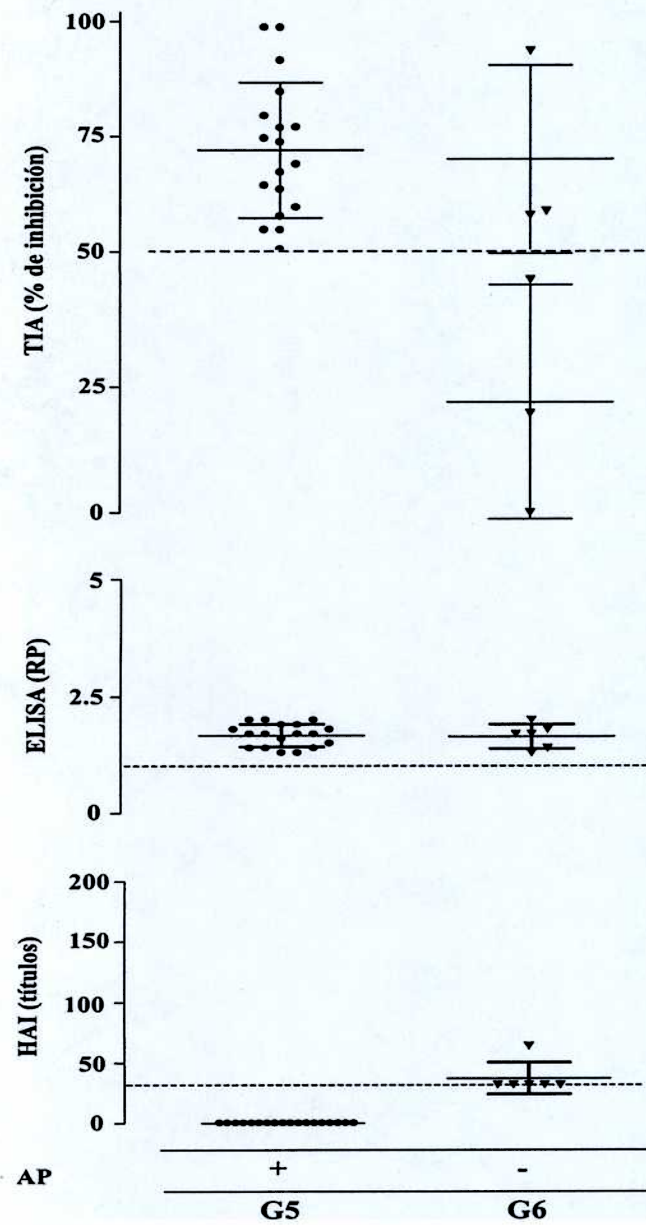
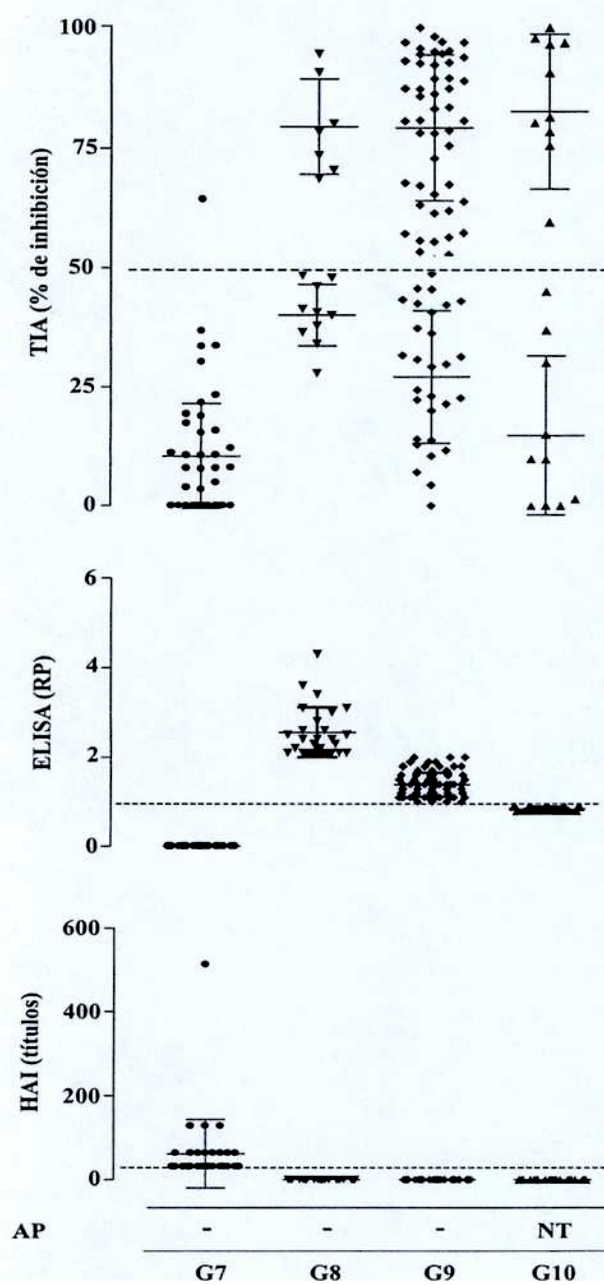


Figura 6: Reactividad por TIA en muestras con serología convencional falsa positiva y “borderline”.



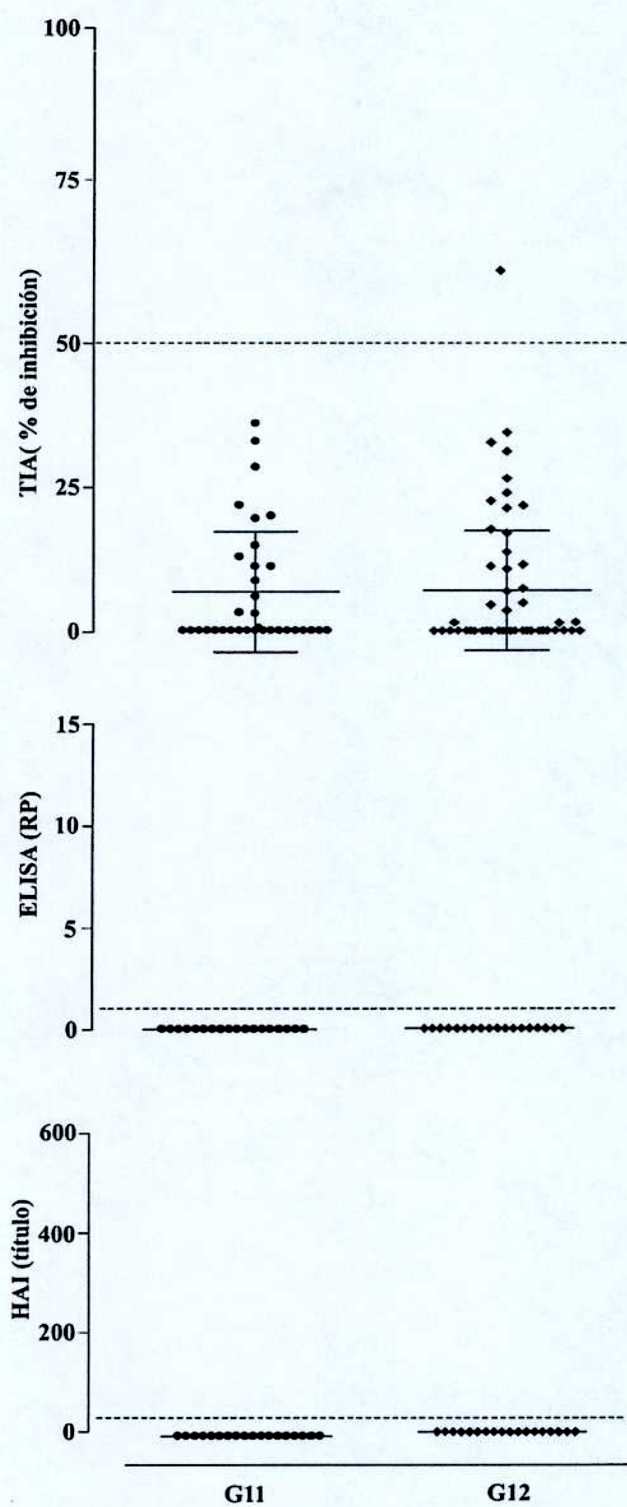
F.3.4. Análisis por TIA en los grupos negativos

En la Figura 7 se observa que las muestras de donantes con SC negativa, sin ningún tipo de riesgo epidemiológico para *T. cruzi* (G11, Cuadro 1), resultaron todas TIA negativas. Sin embargo, al estudiar los 48 donantes con SC negativa y riesgo epidemiológico (G12, Cuadro 1), se detectaron anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS en uno de ellos con un valor del 60,1 % de inhibición.

F.4. Comparación de frecuencias y porcentajes de inhibición de muestras TIA positivas

En el Cuadro 3 se detallan las frecuencias de muestras reactivas por TIA en los distintos grupos según los criterios descritos en el Cuadro 1. Como era de esperar, la diferencia observada entre todos los grupos es significativa: χ^2 140.4 $P < 0,000001$.

Se comparó la frecuencia de casos TIA positivos (G1 al G6) respecto a las falso positivas (G7 al G9) y se observó que la diferencia fue significativa ($p < 0,025$). Cuando se comparó la frecuencia de los casos TIA positivos con respecto a las “borderline”, se obtuvo también una diferencia significativa ($p: 0,005$). Sin embargo, al comparar los falsos positivos y “borderline” no se detectó diferencia significativa ($p: 0,9$).

Figura 7: Reactividad por TIA en muestras con serología convencional negativa.

Cuadro 3: Frecuencia de muestras TIA positivas según los distintos criterios.

Grupos	Criterio	% de muestras positivas (n)	Total de muestras
1-2-3-4	Positivo	96,27 (52)	54
5-6	Débil positivo	87,5 (21)	24
7-8-9	Falso positivo	40,71 (57)	140
10	“Borderline”	52,38 (11)	21
11	Negativo (sin RE)	0 (0)	34
12	Negativo (con RE)	2,08 (1)	48

RE: Riesgo epidemiológico

Posteriormente se analizaron, entre los distintos grupos, los porcentajes de inhibición medios de muestras TIA positivas (Cuadro 4). No encontramos diferencias significativas entre ellos ($p: 0,09$).

Cuadro 4: Porcentajes de inhibición medios en muestras TIA positivas.

Criterio	TIA positivos/n	% Inhibición $\pm$ DS
Positivo	52/54	80,64 $\pm$ 13,80
Débil positivo	21/24	71,65 $\pm$ 14,80
Falso positivo	57/140	78,8 $\pm$ 14,63
“Borderline”	11/21	82,68 $\pm$ 16,47

F. 5. Análisis estadístico del riesgo epidemiológico

Cuando analizamos la correlación entre la reactividad por TIA y el riesgo epidemiológico, encontramos que el número de casos TIA positivos fue significativamente superior en muestras de donantes con factores de riesgo conocidos ($p < 0,000006$) (Cuadro 5).

Cuadro 5: Reactividad por TIA y zona de procedencia.

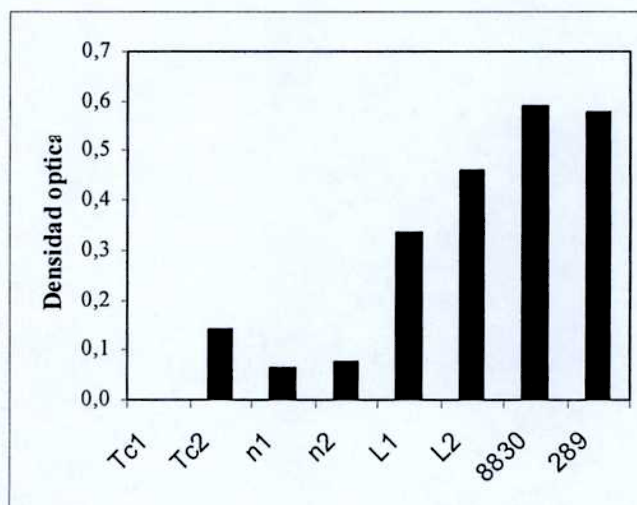
TIA	Zona no endémica	Zona endémica	Total
Negativo	75 (42 %)	104 (58 %)	179
Positivo	22 (16 %)	120 (84 %)	142
Total	97	224	321

F.6. Reactividad frente a *Leishmania spp* en muestras TIA negativas con serología convencional positiva

Se analizó la reactividad para *Leishmania spp* por la técnica de ELISA en las muestras TIA negativas de los grupos G1 y G3. Una de ellas con valores TIA negativos del G1, (muestra 8830) y la segunda del G3 con valores cercanos al valor de corte de TIA (muestra 289).

Como se observa en la Figura 8, ambas son reactivas para *Leishmania*, presentando valores de absorbancia de alrededor de 0,6.

Figura 8: Prueba de ELISA para *Leishmania spp* en muestras TIA negativas con serología convencional positiva.



Tc: control *T.cruzi*.

n: control normal.

L: control *Leishmania* positivo.

G. DISCUSIÓN

La transmisión de *T. cruzi* por vía transfusional, presenta mayor relevancia en las zonas endémicas bajo control vectorial y en zonas no endémicas. Puede controlarse por medio del tamizaje de las muestras de los donantes de sangre. Las técnicas usadas convencionalmente no poseen suficiente sensibilidad ni especificidad, lo que deriva en muchos casos en resultados discordantes, que no pueden ser resueltos por la ausencia de un método confirmatorio (Carvalho MR, 1993; Sáez Alquézar 2003).

Las técnicas serológicas para detección de anticuerpos, son las recomendadas para identificar individuos infectados crónicamente con *T. cruzi*. En general, las especificidades y sensibilidades de los ensayos comerciales son altas cuando se evalúan con sueros bien caracterizados, pero son muy frecuentes las discrepancias cuando se utilizan combinaciones de técnicas serológicas en estudios epidemiológicos o tamizaje en Bancos de Sangre (de Andrade AL, 1992; Carvalho MR, 1993; Salles NA, 1996).

La utilización de diferentes métodos ha dado lugar a resultados contradictorios, debido probablemente a la utilización de diferentes cepas de *T. cruzi* y a diferentes procedimientos de fraccionamiento antigénico, causando variaciones en la sensibilidad y especificidad (Sáez Alquézar A, 1995).

Estas desventajas mencionadas con respecto a la serología convencional, dan lugar, además del riesgo de transmisión de la enfermedad por vía transfusional, al descarte innecesario de componentes sanguíneos, a la pérdida de donantes potenciales y a un inadecuado asesoramiento de los mismos.

La seroprevalencia total del Servicio de Medicina Transfusional de la Fundación Favaloro observada en los donantes de sangre durante los cuatro años desde 2002 al 2005, fue 1,49 %, de ellas, el 1,017 %, se confirmaron positivas (Figura 3).

Es de destacar que alrededor del 30 % de las muestras fueron sólo reactivas para uno de los ensayos, (falsas positivas). Todas ellas fueron descartadas sin poder comunicarle al donante un resultado certero.

Trabajos anteriores y según hemos descripto en la sección Introducción han señalado la utilidad de TIA como un ensayo aplicable al diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Pereira-Chioccola VL, 1994; Leguizamón MS, 1994; Leguizamón MS, 1997; Leguizamón MS, 1998; Buchovsky AS, 2001). Esta técnica posee buenas condiciones en términos de sensibilidad y especificidad, por lo cual nos interesó aplicarla al estudio de muestras de donantes de sangre. Para ello analizamos sueros positivos (G1 al G6) y fue de particular interés el estudio de muestras dudosas por SC: “borderline”, falsos positivos, así como sueros de donantes con factores de riesgo, negativos por la serología convencional (Cuadro 1).

Al analizar los resultados obtenidos se observó una buena correlación entre la reactividad por TIA y por SC en muestras positivas (G1 al G4) (96,26 %) (Figura 4). Una muestra correspondiente a un donante del G1, presentó un resultado negativo para TIA. Por otra parte, una de las muestras del G3, presentó un valor de inhibición próximo al valor de corte. En la Figura 8 se observa que las dos muestras mencionadas positivas por SC son reactivas para *Leishmania braziliensis* por la técnica de ELISA. Es interesante destacar que el donante TIA negativo del G1, es oriundo de Bolivia, país en el que se detecta tanto leishmaniosis visceral como cutánea (Brastrenta B, 2003). Por ello, podría tratarse de un individuo portador de cualquiera de las dos formas de leishmaniosis. TIA es capaz de discriminar esta parasitosis con respecto a la infección crónica por *T. cruzi* (Buchovsky AS, 2001). La actividad de TS no ha sido detectada en *Leishmania spp* (Medina-Acosta, 1994) y los sueros de pacientes con leishmaniosis no presentan reactividad por TIA (Buchovsky AS, 2001). El conjunto de estos resultados

nos sugieren que la discrepancia de la serología convencional y TIA podría deberse a un falso positivo para la serología convencional, ya que estos métodos utilizan homogenatos o extractos parasitarios. En este sentido, Kirchhoff y colaboradores (Kirchhoff LV, 2006) detectaron falsos positivos por serología convencional utilizando RIPA, una técnica con reconocida especificidad. Utilizando INNO-LIA, que emplea antígenos recombinantes, se comunicaron resultados similares. (Sáez Alquézar A, 2000). El segundo donante del G3 si bien no proviene de zona endémica, no puede descartarse que haya viajado y presente las mismas características del caso anterior.

Cuando se ensayaron las muestras débiles positivas del G6 (Figura 5), se detectaron dos casos TIA negativos y uno cercano al valor de corte. El G6 incluye a HAI con valores reactivos. Por otra parte, las muestras del G5 que no incluye muestras reactivas por HAI, sino por AP, presentaron una concordancia del 100 % entre SC y TIA. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que destacan la menor especificidad de HAI con respecto a otros ensayos (Sáez Alquézar A, 1998; Sáez Alquézar A, 2003).

Al analizar el resultado obtenido en muestras sólo reactivas por HAI (G7) (Figura 6), se detectó una muestra TIA positiva en 36 (2,77 %) mientras que al ensayar muestras sólo reactivas por ELISA (G8 y G9) el 61,5% fueron TIA positivas. Por otra parte, el estudio de muestras “borderline” (G10) mostró que el 52,38 % fue TIA positivo (Cuadro 3). A partir de los resultados descriptos, es posible apreciar que al aplicarse técnicas de tamizaje de baja especificidad, como HAI, un número significativamente menor de muestras es detectado como TIA positivo. Se observa lo contrario cuando se utiliza la técnica de ELISA. Estos resultados están en concordancia con las limitaciones señaladas para HAI por otros autores (Sáez Alquézar A, 1998; Leiby DA 2000; Sáez Alquézar A, 2003).

Teniendo en consideración los antecedentes de TIA, estudiamos muestras de pacientes seronegativos por SC. Al ensayar las muestras de donantes con SC negativa y sin riesgo epidemiológico, en el 100 % de los casos el resultado de TIA fue negativo. Sin embargo, al estudiar muestras de donantes con SC negativa y con riesgo epidemiológico, una muestra de 48 resultó TIA positiva (Figura 7). Nuestro grupo ha descrito anteriormente resultados similares (Leguizamón MS, 1998). En ellos se describe la presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad de TS en una población de aborígenes en alto riesgo de infección vectorial y negativos por métodos serológicos y parasitológicos convencionales (Leguizamón MS, 1998), en muestras de pacientes agudos tratados exitosamente (Leguizamón MS, 1997) así como en individuos que padecían megacolon y cardiopatía de origen hasta ese momento idiopático (Buchovsky AS, 2001). En este sentido, Salamone y col. han detectado *T. cruzi* por PCR en muestras de individuos con serología convencional negativa y con riesgo epidemiológico, además algunos de ellos presentaban síntomas de enfermedad cardíaca (Salomone OA, 2003). Otros autores, empleando técnicas con distintos principios como TESA (Trypomastigote excreted secreted antigens) (Zarate-Blades CR, 2007) e INNO-LIA (Saez-Alquézar A, 2000) también detectaron muestras falsas negativas por SC.

Al analizar las frecuencias de muestras TIA positivas entre los grupos positivos (G1 al G4)/ débiles positivos (G5 y G6) y las muestras débiles positivas (G7 al G9)/ “borderline” (G10) se observa que TIA detecta mayor número de casos positivos en los primeros (Cuadro 3). Leiby y col. describieron resultados semejantes empleando RIPA, ya que este ensayo correlaciona mejor con muestras con altos títulos de anticuerpos por SC (Leiby DA, 2000).

Es de destacar, que el análisis estadístico entre los grupos falsos positivos y “borderline” entre sí no presentaron diferencias significativas ($p: 0,9$).

Por otra parte, cuando se analizaron los porcentajes de inhibición medios para muestra reactivas por TIA en los distintos grupos (Grupos 1 al 10), no se encontraron diferencias significativas ($p: 0,09$) (Cuadro 4). Es decir que los valores de neutralización son semejantes a los obtenidos en sueros con diferentes títulos de anticuerpos detectados por SC. Estos resultados nos permiten afirmar entonces que el grado de neutralización obtenida empleando TIA es independiente del grado de dificultad presentado por SC.

Por otra parte, es de destacar la correlación entre la reactividad por TIA y el riesgo epidemiológico. El número de muestras TIA positivas fue significativamente superior en donantes con factores de riesgo (Cuadro 5).

Diferentes grupos de investigación han realizado importantes esfuerzos para resolver el problema de la ausencia de una técnica “gold standard” en la detección serológica de la infección por *T. cruzi*. Se ha propuesto el uso del “Western Blot” ya sea utilizando lisados de epimastigotes (Reiche EM, 1998) o antígenos secretados por los tripomastigotes (TESA) (Silveira-Lacerda EP, 2004). La mayor desventaja de estos métodos es la dificultad para contar con una calidad reproducible de los antígenos empleados, ya que incluyen homogenados de parásitos o antígenos liberados al medio. El RIPA es una técnica que se ha empleado en muchos estudios como prueba confirmatoria, ha mostrado un buen desempeño pero involucra el uso de parásitos y material radioactivo (Leiby DA, 2000; Kirchhoff LV, 2006).

Las técnicas de INNO-LIA (Saez Alquézar A, 2000) y el Immunoblot de Abbott (Chen KY, 2007) emplean antígenos definidos unidos a membranas de celulosa. El ensayo de INNO-LIA emplea siete antígenos para los cuales se deben desarrollar siete bandas diferentes. En el Immunoblot de Abbott se pueden detectar hasta cuatro bandas

diferentes. La ventaja respecto del anterior es que cada una de ellas incluye una mezcla de antígenos recombinantes, péptidos sintéticos y diferentes dominios para evitar los falsos negativos. Estos formatos son fácilmente manejables por los Bancos de Sangre pero las lecturas de las intensidades de las bandas son subjetivas y por lo tanto la reproducibilidad es dificultosa.

TIA está basado en la neutralización de la actividad de la TS recombinante. Por otra parte es cuantificable a diferencia de las técnicas mencionadas. La cantidad de resultados indeterminados es muy baja, dificultad que se observa frecuentemente en los ensayos de “inmunoblot”.

Si bien el actual formato de TIA es difícil de aplicar al laboratorio de rutina, podría ser de gran utilidad en la resolución del diagnóstico de muestras inconclusivas en Bancos de Sangre. Además de mejorar el asesoramiento al donante y permitir la reentrada del mismo para futuras donaciones. El estudio por TIA de muestras de donantes con SC negativa, pero con antecedentes epidemiológicos, podría contribuir a reducir el riesgo transfusional. En estos casos sería de utilidad implementar el cuestionario de riesgo epidemiológico, y, en caso de respuesta afirmativa mantener los hemocomponentes en cuarentena hasta la realización de TIA.

La detección de muestras TIA positivas que no son resueltas por SC le brindaría al paciente la oportunidad de un seguimiento clínico. Ante la eventual aparición de sintomatología en el mismo podría recibir un tratamiento antiparasitario disminuyendo la posibilidad de desarrollo de las formas clínicas características de la infección crónica.

El conjunto de resultados previos y los obtenidos en este estudio apoyan la utilidad de TIA y su posible uso como técnica confirmatoria.

H. CONCLUSIONES

➤ Los resultados permitieron:

- Confirmar el 96,26 % de las muestras positivas y el 87,5 % de las débiles positivas por serología convencional para anti-*T. cruzi*.
- Resolver el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en el 40,71 % de las muestras inconclusas por SC (falsas positivas). Se confirmó el 54 % de muestras TIA positivas cuando se ensayaron muestras reactivas por ELISA y el 2,6 % con TIA positivas cuando se ensayaron por HAI. TIA presenta una buena correlación con ELISA y no con HAI, técnica de cuestionada sensibilidad y especificidad
- Confirmar como positivos el 52,3 % de las muestras “borderline”.
- Detectar anticuerpos neutralizantes en 1 de 48 muestras con serología convencional negativa pero con riesgo epidemiológico.
- Observar una correlación significativa entre muestras TIA positivas y antecedentes epidemiológicos.
- Destacar que los niveles de neutralización son independientes de la reactividad por serología convencional.

➤ Concluimos que TIA puede mejorar:

- a) La seguridad transfusional: al analizar muestras obtenidas a partir de donantes con serología convencional negativa y riesgo epidemiológico.
- b) El asesoramiento al donante: la resolución de muestras inconclusivas por la serología convencional.
- c) Re-entrada al plantel de donación: a los donantes cuyas muestras no resueltas por la SC resultan negativas por TIA.

I. REFERENCIAS

- Blejer JL, Saguier MC, Salamone HJ. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Buenos Aires, Argentina. *Int J Infect Dis* 2001;5:89-93.
- Brashear RJ, Winkler MA, Schur JD, Lee H, Burczak JD, Hall HJ, Pan AA. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. I. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. *Transfusion* 1995;35:213-218.
- Brastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M,. Human mixed infection of *Leishmania spp.* and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian area: identification by polimerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 255-264.
- Brener Z, Andrade ZA. Diagnóstico de Laboratorio in *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p.175-95.
- Buchovsky AS, Campetella O, Russomando G, Franco L, Oddone R, Candia N, Luquetti A, González Cappa SM, Leguizamón MS. *trans*-sialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas's disease. *Clin Diag Lab Immunol* 2001;8:187-189.
- Campetella OE, Uttaro AD, Parodi AJ, Frasch AC. A recombinant *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Mol Biochem Parasitol* 1994;64:337-340.
- Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquézar A, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DF, Goldenberg S. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 1993;10:830-834.
- Cheng KY, Chang Ch, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:355-361.
- Cimo P, Luper W, Scouros M. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Texas Med* 1993;89:48-50.
- da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001; 17:286-291.
- de Andrade AL, Martelli CM, Luquetti AO, de Oliveira OS, Almeida e Silva. Serological screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam* 1992; 113: 19-27.
- Frank M, Hegenscheid B, Janitschke K, Weinke T. Prevalence and epidemiological significance of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin American immigrants in Berlin, Germany. *Infection* 1997;25:355-358.
- Frasch AAC, Reyes MB. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. *Parasitology Today* 1990;6:137-139.
- Frasch AAC. Functional diversity in the *Trans*-sialidase and Mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 2000;16:282-286.
- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 1987;94:475-484.
- Kirchhoff LV. Chagas' disease: American trypanosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:487-502.
- Kirchhoff LV, Paredes P, Lomelí-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejía M, et al. Transfusion-associated Chagas disease (American

- trypansomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion* 2006;46:298-304.
- Leguizamón MS, Campetella O, Reyes MB, Ibañez CF, Basombrio MA, Rincon J, Om A, Frasch AC. Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic human Chagas disease. *Parasitology* 1991;102:379-385.
 - Leguizamón MS, Campetella O, Russomando G, Almiron M, Guillén I, González Cappa SM, et al. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *J Infect Dis* 1994;170:1570-1574.
 - Leguizamón MS, Russomando G, Luquetti A, Rassi A, Almirón M, González-Cappa SM, Frasch ACC, et al. Long-lasting antibodies detected by a trans-sialidase inhibition assay of sera from parasite-free, serologically cured chagasic patients. *J Infect Dis* 1997;175:1272-1275.
 - Leguizamón MS, Russomando G, de Arias Ar, Samudio M, Cabral M, González Cappa SM, Frasch ACC, Campetella O. Use of *trans*-sialidase inhibition assay in a population serologically negative for *Trypanosoma cruzi* but at high risk of infection. *Clin Diag Lab Immunol* 1998;5:254-255.
 - Leiby DA, Read EJ, Lenes BA, Yund AJ, Stumpf RJ, Kirchhoff LV, Dodd, RY. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent for Chagas disease in US blood donors. *J Infect Dis* 1997;176:1047-1052.
 - Leiby D, Lenes B, Tibbals M. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J med* 1999;341:1237-1239.
 - Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol* 2000;38:639-642.
 - Leiby DA, Herron MR Jr, Read EJ, Lens BA, Stumpf RJ. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion*. 2002;42:549-555.
 - Luquetti AO. Megaesofago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med* 1987;33:1-16.
 - Nickerson P, Orr P, Schroeder MI, Sekla L, Johnston LB. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med* 1989;111:851-853.
 - Oelemann WMR, Teixeira MGM, Da Costa GCV, Borges-Pereira J, De Castro JDF, Rodrigues Coura J, Peralta JM. Evaluation of three commercial Enzyme-Linked Immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1998;36:2423-2427.
 - Pan AA, Rosenberg GB, Hurley MK, Schock GJ, Chu VP, Aiyappa A. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J Infect Dis* 1992;165:585-588.
 - Parodi AJ, Pollevick GD, Mautner M, Buschiazzi A, Sanchez DO, Frasch AC. Identification of the gene(s) coding for the *trans*-sialidase of the *T. cruzi*. *EMBO J* 1992;11:1705-1710.
 - Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM Jr, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1994;32:971-974.

- Pereira-Chiocola VL, Schenkman S, Kloetzel J. Sera from chronic patients and rodents infected with *Trypanosoma cruzi* inhibit *trans*-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain. *Infect Immun* 1994;62:2973-2978.
- Pollevick GD, Affranchino JL, Frasch AC, Sanchez DO. The complete sequence of a shed acute-phase *antrastigen* of *T. cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1991;47:247-250.
- Reiche EM, Cavazzana M Jr, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius JV. Evaluation of the estern blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:750-756.
- Reyes MB, Lorca M, Muñoz P, Frasch AC. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2846-2850.
- Sáez Alquézar A, Salles NA, Sabino EC: Serological diagnosis of Chagas' disease in blood banks. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90 (Supl 1): 34.
- Saez-Alquezar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro-dos-Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas' disease. *Vox Sang.* 1998;74:228-31.
- Saez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, Pottel H, Stoops E, Zrein M. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J Clin Microbiol* 2000; 38:851-54.
- Saéz-Alquézar A. Tamizaje y diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Transf* 2003;29:117-124.
- Salamone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M, ernández RA, Enders J, Palma A, Barral JM, Madoery RJ. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1558-1562.
- Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonca MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Sáez Alquézar A. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion* 1996;36:969-973.
- Schmuñis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 1991;31:547-557.
- Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, Umezawa ES. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang* 2004; 87:204-207.
- Tobler LH, Contestable P, Pitina L, Groth H, Shaffer S, Blackburn GR, Warren H, Lee SR, Busch MP. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Chagas antibody in US blood donors. *Transfusion* 2007;47:90-96.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *J Clin Microbiol* 1999;37:1554-1560.
- Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003;43:91-97.
- Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira F. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: Results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol* 2004;42:449-452.

- Vergara U, Lorca M, Veloso C, Gonzalez A, Engstrom A, Aslund L, Pettersson U, Frasch AC. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. J Clin Microbiol 1991;29:2034-2037.
- Wendel S, Gonzaga AL. Chagas' disease and blood transfusion: A new world problem.?. Vox Sang 1993;64:1-12.
- Wendel S. Current concepts on the transmission of bacteria and parasites by blood components. Sao Paulo Med J 1995;113:1036-1052.
- World Health Organization. 1991. Control of Chagas' disease. . Report of W.H.O. expert committee. W.H.O. Tech. Rep. Ser. 811:38-47.
- World Health Organization. 2002. Control of Chagas' disease. Report of W.H.O. expert committee. W.H.O. Tech. Rep. Ser. 905:1-109.
- Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. Transfusion 2007;47:540-544.
- Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, da Silveira JF, Umezawa ES. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57:229-232.



MARIA SUSANA LEGUIZAMÓN
D.T.O. MICROBIOLOGÍA FAC. DE MEDICINA U.B.A.
INVESTIGADOR INDEPENDIENTE
CONICET