

EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN MICROGOTAS SOBRE NITROCELULOSA (Dot-ELISA) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. I. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS PREPARACIONES ANTIGENICAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

ROSA M. DE HUBSCH*/**, NORMA CHIECHIE****, GUILLERMO COMACH*/**, RAFAEL RANGEL ALDAO** & RENATO D'A. GUSMAO***

* Departamento de Parasitología, ** Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua, Apdo 4944, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela *** Unidad de Investigación de la Dirección de Endemias Rurales, M. S. A. S./OPS, Venezuela **** Laboratorio de Chagas Dirección de Endemias Rurales M. S. A. S., Venezuela

The Dot-Enzyme linked immunosorbent assay (Dot-Elisa) in the diagnosis of Chagas' disease. I. Comparative study of two antigenic preparations of *Trypanosoma cruzi* – Using the Dot-ELISA technique, two antigenic preparations of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms have been compared for the diagnosis of Chagas' disease: (1) The cytoplasmic fraction (cytoplasmic antigen) and (2) whole formalin fixed epimastigotes (integral antigen). There was been used sera from 95 chagasic patients with chronic cardiomyopathy, positive conventional serology and either positive or negative xenodiagnosis; 74 subjects with negative conventional serology, and either clinically normal or presenting cardiomyopathy; 74 patients with different diseases including siphilis, toxoplasmosis, leishmaniasis or autoantibodies such as rheumatoid factor and antinuclear antibodies. By defining the diagnostic titers (cut off): 1:512 for cytoplasmic antigen and 1:128 for the integral antigen, a sensitivity of 100% has been obtained with both antigenic preparations, being the specificity of 96% for the former and 100% for the latter when leishmaniasis sera were not included. A comparative study with conventional serology was carried out using 147 sera from a Laboratory of Chagas' diagnosis; Dot-ELISA with cytoplasmic antigen showed co-positivity index of 1.0, co-negativity 0.989 and efficiency of 0.993, and Dot-ELISA with integral antigen 1.0, 0.979 and 0.986 respectively. According to this evaluation, Dot-ELISA using whole formalin fixed epimastigotes might be a practical alternative for the serological diagnosis of Chagas' disease.

Key words: immunoserology – Dot-ELISA – *Trypanosoma cruzi* antigenic preparations

El diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, es realizado a través de pruebas inmunológicas principalmente en la fase crónica cuando la parasitemia es subpatente. La alta prevalencia de la infección en grandes áreas rurales de el continente americano hace que el riesgo de transmisión directa (transfusión, transplantes, etc.) esté presente en la mayoría de las grandes metrópolis debido a la migración campesina en busca de mejores condiciones de vida, aún en presencia de exitosos programas de control de vectores.

La detección y cuantificación de anti-

cuerpos séricos contra *T. cruzi*, facilitan el diagnóstico, la evaluación de casos y posibilitan los estudios seroepidemiológicos de la enfermedad.

Pruebas inmunológicas clásicas como Reacción de Fijación de Complemento (RFC), Hemaglutinación Indirecta (RHI) e Inmunofluorescencia Indirecta (RII), considerados de aceptable sensibilidad y especificidad (Camargo et al., 1977) están limitadas en su uso por la complejidad relativa de su ejecución. En consecuencia, la búsqueda de pruebas inmunodiagnósticas de ejecución rápida y sensibles es una prioridad, así como su desarrollo tecnológico y operacional.

El Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* fue establecido por Voller et al. (1975) y es hoy día aceptado como prueba de gran utilidad en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (Anthony et al., 1979; Spencer

Subvencionado en parte por: UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases y por Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICIT), Venezuela.

Recibido el 6 de Octubre de 1987.
Aceptado el 13 de Abril de 1988.

et al., 1980). El uso de nitrocelulosa como soporte sólido para la adsorción de proteínas ha sido ampliamente difundido desde que Towbin et al., en 1979 reportaron la transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a láminas de nitrocelulosa, con ulterior análisis inmunológico de las fracciones obtenidas, mediante el uso de un segundo anticuerpo acoplado a radioisótopos. Entre las primeras aplicaciones de esta nueva tecnología está la hibridización de DNA (Dot-hibridización) descrita por Kafatos et al. (1979) que sirvió de base a Hawkes et al. (1982) para el desarrollo de un método con fines diagnósticos, usando nitrocelulosa como matriz sólida y el segundo anticuerpo marcado con isótopo radiactivo que denominaron "Dot-Immunobinding".

Posteriormente Pappas et al. (1984) describieron una técnica similar para el diagnóstico de Leishmaniasis Visceral pero empleando el segundo anticuerpo marcado con enzimas y la denominaron "Dot-ELISA". La utilización de dicho ensayo para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* ha sido descrito por Flint et al. (1984) y luego por Araujo (1985) con resultados muy promisorios, lo cual hace necesario una evaluación más amplia de la prueba para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas.

El objetivo del presente trabajo es estudiar comparativamente la sensibilidad y especificidad de la prueba de Dot-ELISA en la detección de anticuerpos séricos contra *T. cruzi*, mediante el empleo de dos preparados antigénicos: uno citoplasmático y otro, el parásito total en su forma epimastigota fijados previamente con formol (antígeno integral), a fin de evaluar su aplicabilidad diagnóstica.

MATERIALES Y METODOS

Sueros: Para establecer el título diagnóstico y el estudio de la sensibilidad y especificidad, se examinaron 243 sueros distribuidos en seis grupos como se indica a continuación: Grupo 1, constituido por 24 sueros de individuos adultos (14 hombres con 36 ± 21 años de edad y 10 mujeres con 43 ± 14 años de edad) con la característica común de haber presentado xenodiagnóstico positivo a *T. cruzi*, además de presentar resultados positivos con las tres técnicas serológicas convencionales: RHI, RII y RFC para diagnóstico de infección chagásica; Grupo 2, integrado por 71 sueros de individuos (36

hombres de 68 ± 14 años de edad y 35 mujeres con 55 ± 12 años de edad) con cardiopatía, referidos al laboratorio por Médicos Cardiólogos y que presentaron resultados positivos en por lo menos dos de las tres técnicas serológicas convencionales y xenodiagnóstico negativo; Grupo 3 formado por 42 sueros de individuos sanos (28 hombres con 35 ± 11 años de edad y 14 mujeres con $30 \pm$ años de edad), seleccionados al azar entre un grupo de trabajadores de distintas industrias y voluntarios, todos ellos presentando resultados negativos en las técnicas RHI, RII y RFC para *T. cruzi*; Grupo 4, integrado por 32 sueros de individuos (20 hombres con 49 ± 17 años de edad y 12 mujeres con 43 ± 14 años de edad) seleccionados del grupo de pacientes con miocardiopatía referidos al laboratorio por Médicos Cardiólogos, procedentes de áreas endémicas pero que presentaron resultados negativos con la serología convencional; Grupo 5 compuesto por 61 sueros de individuos con diagnóstico clínico y serológico de: Sífilis (26), Toxoplasmosis (23), Factor Reumatoide (6) y sospechosos de Lupus Eritematoso sistémico (LES) con anticuerpos anti-nucleares (6); Grupo 6 que incluye 13 sueros de pacientes con diagnóstico clínico y parasitológico de: Leishmaniasis Visceral (7) y de Leishmaniasis Cutánea (6). A fin de hacer un estudio comparativo a doble ciego con las pruebas serológicas convencionales, se estudiaron 147 sueros obtenidos de individuos cuyas edades estaban comprendidas entre 49 ± 14 años los cuales fueron referidos al laboratorio de diagnóstico de Chagas de la Dirección de Malariología en Maracay, Estado Aragua, donde se les practicó la RFC, RHI y RII.

Antígenos de Trypanosoma cruzi — Se utilizaron dos preparados antigénicos de *T. cruzi* (Cepa Petra Mendoza), uno citoplasmático (Maekelt, 1960) preparado en el Instituto de Medicina Tropical, U. C. V. a una concentración de $400 \mu\text{g}/\text{ml}$; y el otro una suspensión de formas epimastigotas con una concentración de 4×10^6 parásitos/ml en Buffer fosfato salino 0,01M, NaCl 0,15M (PBS) pH 7.6, obtenidas e cultivo del parásito en medio LIT, mantenidos a 28°C . Los epimastigotas se colectaron a los siete días y se lavaron cinco veces en PBS pH 7.6 para luego resuspenderlo en formaldehído al 1% durante 24 horas, al final de las cuales se sometieron al mismo proceso de lavado.

Técnicas Serológicas

Reacción de Hemaglutinación Indirecta (RHI) — este ensayo se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kagan & Norman (1970), con el antígeno citoplasmático (Maekelt, 1960).

Reacción de inmunofluorescencia Indirecta (RII) — se empleó el procedimiento descrito por Camargo (1966), utilizándose como antígeno formas epimastigotas formoladas de *T. cruzi* y como conjugado anti-inmunoglobulina humana total marcada con Isotiocianato de Fluoresceína preparada en nuestro laboratorio a partir de suero de carnero inmunizado con gammaglobulina humana. La antigammaglobulina de carnero obtenida es purificada mediante combinación de precipitación con Sulfato de Amonio y Cromatografía con DEAE celulosa, la conjugación con el Isotiocianato se hizo según técnica descrita por Hebert et al. (1972).

Reacción de Fijación del Complemento (RFC) — se llevó a cabo siguiendo la Técnica semicuantitativa de Freitas (1951) modificada por Maekelt (1960) determinando la unidad de complemento al 50% de Hemólisis.

DOT-ELISA — se utilizó el método descrito por Pappas et al. (1984) con algunas modificaciones, el procedimiento utilizado es resumido a continuación: se cuadricula una lámina de nitrocelulosa de 20 x 20 cm (Schleider & Schnell, Keene N. H.) en pequeños cuadrados de 6 x 6 mm la cual se sumerge en agua destilada durante 10 minutos y después se estabiliza en PBS pH 7.6 durante 30 minutos. Posteriormente se deposita en el centro de cada cuadrado 2 μ l de cada antígeno. Una vez adsorbido el antígeno, la lámina de nitrocelulosa se coloca entre hojas de papel de filtro 3 M, durante 24 horas a 4°C. Al cabo de este tiempo se sumerge la lámina de nitrocelulosa en una solución de PBS pH 7.6 más Tween 20 al 0.2% (Moriearty, 1984) durante 1 hora con agitación continua a fin de bloquear los sitios no cubiertos por el antígeno. Después de secar a temperatura ambiente se cortan los cuadritos de nitrocelulosa y se depositan en pequeños tubos de vidrio de 1 x 5 cms, con tapa plástica donde se realiza ulteriormente la reacción, o bien se colocan en placas de cloruro de polivinilo con excavaciones de 0,5 ml de capacidad y un diámetro interno de 1.4 cms y siendo guardados a 4°C hasta su uso.

Se hicieron diluciones al doble de cada suero desde 1:16 hasta 1:4096, en PBS pH 7.6 más Tween 20 al 0,05% (PBS-T) transfiriéndose luego 0,5 ml de cada dilución al tubo correspondiente que contiene el papel de nitrocelulosa sensibilizado con el antígeno, se incubó durante 90 minutos a 37°C posteriormente se hicieron cuatro lavados por aspiración y llenado con PBS-T pH 7.6. Luego se añadió 0,2 ml de conjugado de anti-inmunoglobulina G humana conjugada con peroxidasa, Sigma diluido 1:500 en PBS-T pH 7.6 y se incubó durante 45 minutos a 28°C, se repitieron los cuatro lavados con PBS-T pH 7.6 al final de los cuales se añadió 0,2 ml de substrato (4 cloro 1 — naftol) ajustado a una concentración de 3 mg/ml en metanol y diluido 1:3 en PBS 7.6 al 0,04% v/v de H₂O₂. Después de 30 minutos en obscuridad se agregó 0,2 ml de agua destilada, aspirándose después el contenido total del tubo. La aparición de una mancha color violeta sobre el papel de nitrocelulosa indica la positividad del ensayo.

Determinación del título diagnóstico — se hizo la distribución de frecuencia de los títulos de los sueros de los diferentes grupos; en base a esta distribución, se estableció el título diagnóstico mediante dos modalidades: a) Se calcula la media de los Log₂ de la recíproca de los títulos de los sueros de personas no chagásicas (grupos 3, 4, 5 y 6) más dos desviaciones estándar. Si el valor obtenido corresponde exactamente con un título serológico determinado se toma éste como diagnóstico; si por el contrario el valor calculado es intermedio entre dos títulos se toma el mayor como diagnóstico; b) Se hizo gráficamente la distribución de frecuencia de los títulos de los sueros de personas chagásicas y no chagásicas, la inflexión de las curvas obtenidas con los sueros negativos y positivos se debe corresponder con un título, el inmediato superior a éste, se tomó como título diagnóstico, lo que garantiza una mayor especificidad del ensayo.

Análisis de los datos — El análisis de los resultados serológicos en muestras no independientes se hizo usando la comparación entre dos grupos con la elaboración de tablas de 2x2 y la prueba de estadística de McNemar (Remington & Schorck, 1970), con un nivel de significación de P < 0.05. Los índices de co-positividad, co-negatividad y eficiencia se calcularon según la fórmula descrita por Gart & Buck (1966).

RESULTADOS

La determinación del título diagnóstico para Dot-Elisa con antígeno citoplasmático se presenta en la Fig. 1 y la Tabla I. Los títulos obtenidos tanto con la determinación gráfica (Fig. 1) como con el cálculo matemático (Tabla I) fueron comparables. Así vemos que el valor matemático de 8,86 correspondió a un título intermedio entre 1/256 y 1/512 y que al tomar el valor mayor de 1/512 (ver Materiales y Méto-

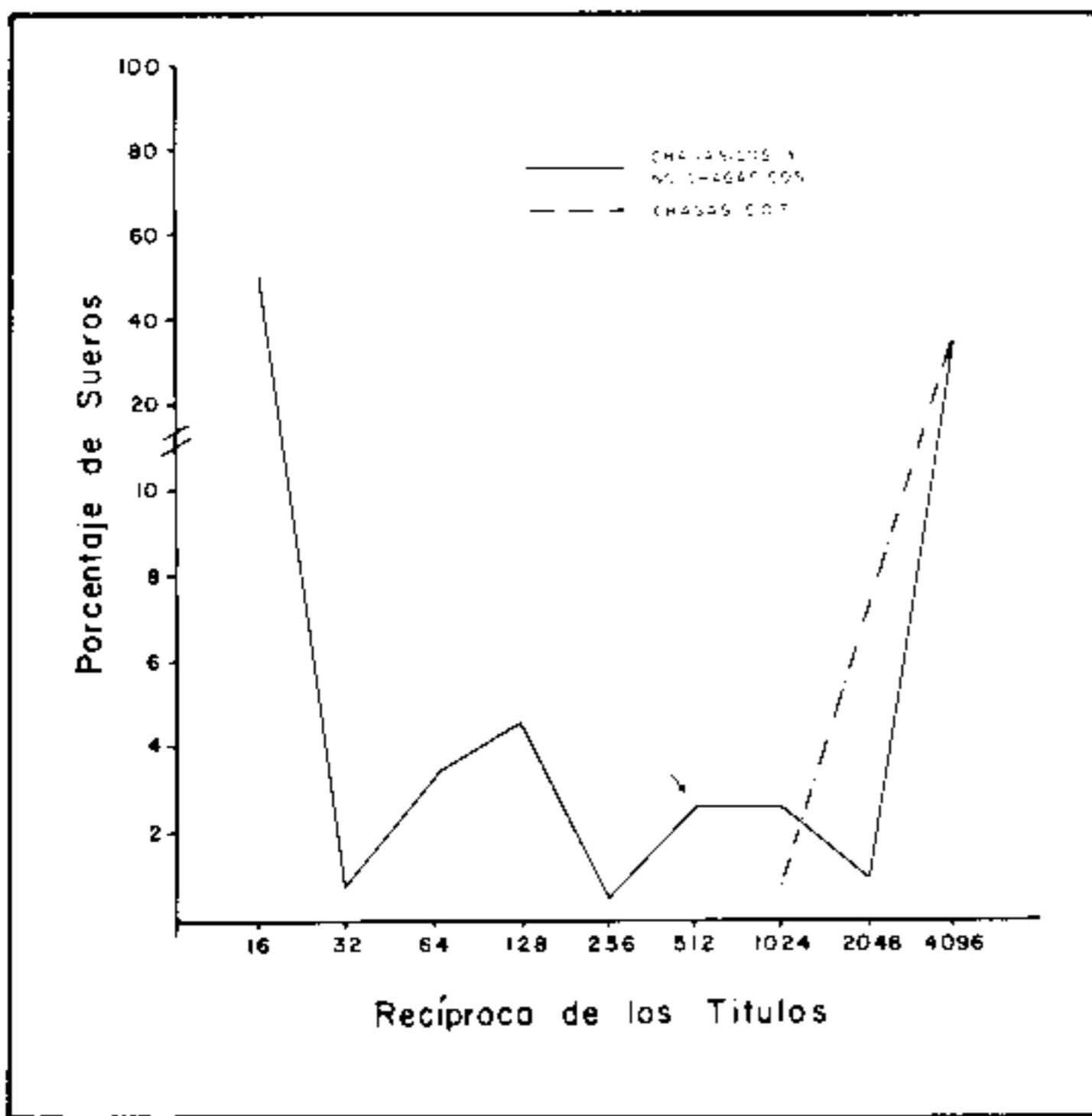


Fig. 1: distribución de frecuencia de los títulos obtenidos con Dot-ELISA y antígeno citoplasmático de *Trypanosoma cruzi*, en sueros de pacientes chagásicos y no chagásicos.

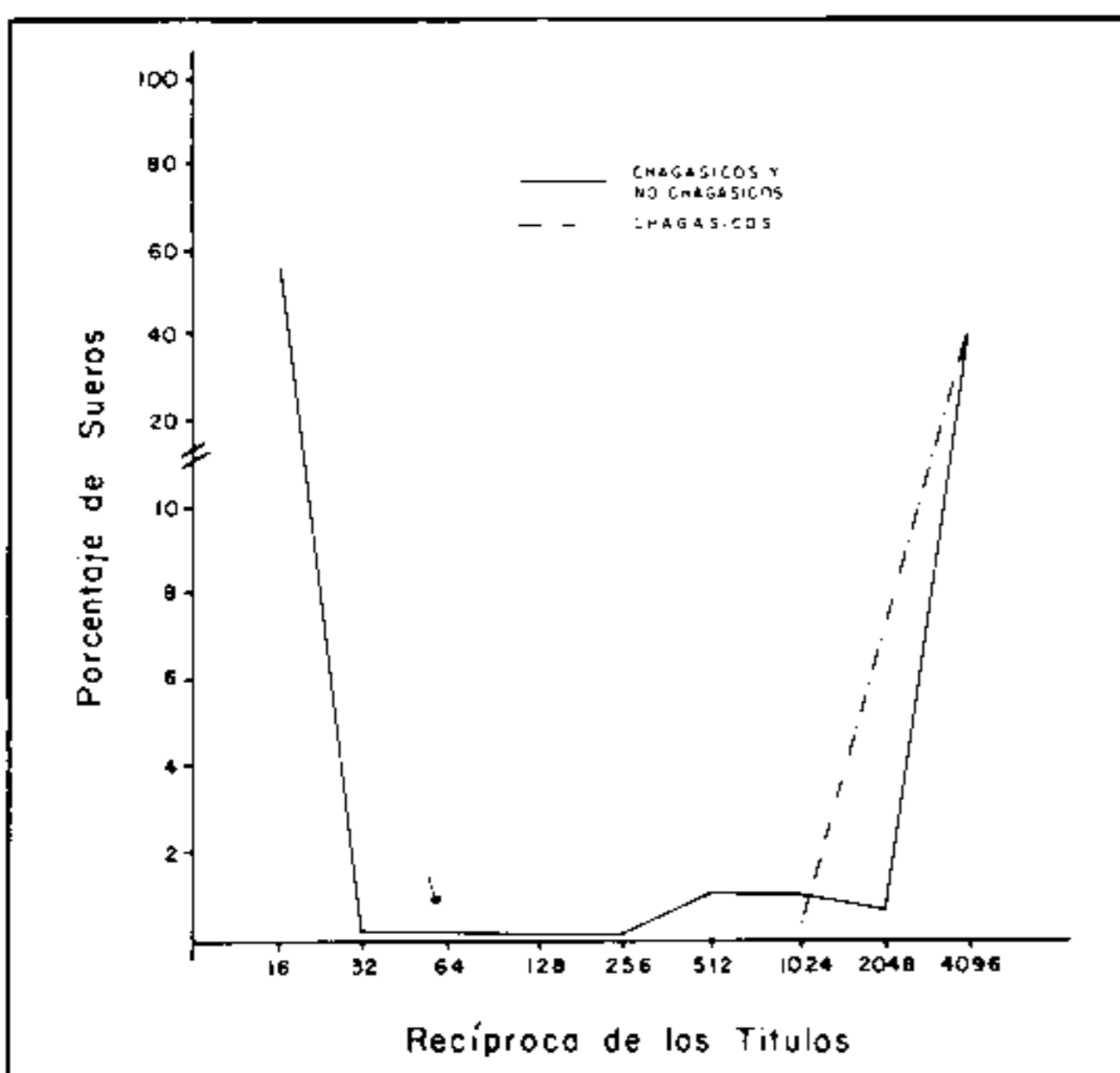


Fig. 2: distribución de frecuencia de los títulos obtenidos con Dot-ELISA y una suspensión de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* como antígeno, en sueros de pacientes chagásicos y no chagásicos.

dos) resulta igual al título obtenido gráficamente. En lo que respecta al título diagnóstico para Dot-Elisa con antígeno integral, no hubo concordancia entre el obtenido gráficamente (título de 1/64) y el determinado matemáticamente (Valor de 7,48 correspondiente a un título entre 1/128 y 1/256) (Ver Tabla II y Fig. 2, respectivamente). En este caso, al no coincidir los títulos, se tomó el intermedio entre ambos métodos (Título de 1/128) a objeto de garantizar una mayor especificidad sin sacrificar la sensibilidad.

En la Tabla III se presentan los resultados de la sensibilidad y especificidad de la prueba Dot-Elisa basados en la determinación del título diagnóstico de 1/512 para antígeno citoplasmático y de 1/128 para el antígeno integral. En cuanto a la sensibilidad se obtuvo el 100% con los dos preparados antigénicos siendo la especificidad de 96,6% para el antígeno citoplasmático y del 100% para el integral. Hay que hacer notar que para la determinación de la especificidad de la prueba, se excluyeron los resultados de los sueros de personas con leishmaniasis debido a la comprobada reactividad serológica cruzada entre ambas enfermedades parasitarias por la presencia de antígenos comunes en los agentes etiológicos (Afchain et al., 1979).

En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos al comparar el ensayo de Dot-ELISA con los dos preparados antigénicos y la serología convencional, examinando un total de 147 muestras de sueros obtenidos de pacientes referidos al laboratorio de diagnóstico de Chagas de la Dirección de Malariología (Maracay, Edo. Aragua). De las muestras estudiadas 49 de ellas (33.3%) mostraron positividad por la serología convencional, mientras que al examinar las muestras con Dot-ELISA, con el antígeno citoplasmático, 50 (34%) resultaron positivas y con el antígeno de epimastigotes íntegros 51 (34.6%). Utilizando la prueba de Mc Nemar para análisis estadístico, con un nivel de significación de $P < 0.05$ encontramos que éstas diferencias no son estadísticamente significativas. En este análisis comparativo se obtuvieron índices de co-positividad, co-negatividad y de eficiencia de 1,0, 0,989 y 0,995 respectivamente, al confrontar Dot-ELISA con antígeno citoplasmático y la serología convencional, al establecer la misma comparación pero usando el antígeno de epimastigotes íntegros, se obtuvo una co-positividad de 1,0, co-negatividad de 0,979 y de eficiencia de 0,986.

TABLA I

Determinación del título diagnóstico basado en la distribución de frecuencia de los títulos obtenidos con DOT-ELISA utilizando un preparado citoplasmático de *Trypanosoma cruzi*, en 243 sueros de personas chagásicas y no chagásicas

Grupo Clínicos/Nº Individuos (n)	Recíproca de Título								
	<16 (*) 4	32 5	64 6	128 7	256 8	512 (**) 9	1024 10	2048 11	≥4096 12
Chagásicos									
I. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico positivos (24)							2		22
II. Con cardiopatía, serología convencional positiva y xenodiagnóstico negativo (71)									71
No Chagásicos									
III. Personas sanas (42)	30		4	8					
IV. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico negativos (32)	29				1		2		
V. Personas con sífilis, toxoplasmosis, factor reumatoide y lupus (61)	51		4	2		3	1		
VI. Personas con leishmaniasis (visceral y cutanea) (13)	1	3				3	2	2	2

(*) Log₂ de la recíproca de los títulos.

(**) Título diagnóstico: valor de 8,86 obtenido por la formula $\bar{X} + 2DE$ (Ver materiales y Metodos).

TABLA II

Determinación del título diagnóstico basado en la distribución de frecuencia de los títulos obtenidos con DOT-ELISA utilizando una suspensión de epimastigotes intactos de *Trypanosoma cruzi*, en 243 sueros de personas chagásicas y no chagásicas

Grupo Clínicos/Nº Individuos (n)	Recíproca de Título								
	<16 (*) 4	32 5	64 6	128 7 (**)	256 8	512 9	1024 10	2048 11	≥4096 12
Chagásicos									
I. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico positivos (24)							1		23
II. Con cardiopatía, serología convencional positiva y xenodiagnóstico negativo (71)									71
No Chagásicos									
III. Personas sanas (42)	42								
IV. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico negativos (32)	32								
V. Personas con sífilis, toxoplasmosis, factor reumatoide y lupus (61)	61								
VI. Personas con leishmaniasis (visceral y cutanea) (13)	4					3	2	2	2

(*) Log₂ de la recíproca de los títulos.

(**) Título diagnóstico: valor de 7,48 obtenido por la formula $\bar{X} + 2DE$ (Ver materiales y Metodos).

TABLA III

Sensibilidad y especificidad de la prueba Dot-Elisa utilizando dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi* en 243 sueros de personas chagásicas y no chagásicas

Grupo Clínico/Nº Individuos (n)	% Sueros Positivos Dot-Elisa con antígeno	
	citoplasmático (*)	integral (**)
Chagásicos		
I. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico positivos (24)	100	100
II. Con cardiopatía, serología convencional positiva y xenodiagnóstico negativo (71)	100	100
No Chagásicos		
III. Personas sanas (42)	0	0
IV. Con cardiopatía, serología convencional y xenodiagnóstico negativos (32)	6.7	0
V. Personas con:		
1. anticuerpos anti-nucleares (6)	16.7	0
2. sífilis (26)	7.7	0
3. toxoplasmosis (23)	0	0
4. factor reumatoide (6)	16.7	0
VI. Personas con leishmaniasis:		
1. visceral (7)	57.1	71.4
2. cutánea (6)	83.3	66.7

(*) Título diagnóstico 1/512.

(**) Título diagnóstico 1/128.

TABLA IV

Comparación entre los resultados de las pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de chagas y Dot-ELISA con dos preparados antigénicos de *Trypanosoma cruzi*, en 147 sueros seleccionados al azar de pacientes que concurren al laboratorio de diagnóstico de chagas M. S. A. S. Maracay Estado Aragua

Pruebas convencionales (RFC, RHI, RII) Nº	%	Dot-Elisa Ag. Citoplasmático			Dot-Elisa Ag. Epimastigotes			
		Nº	%	Indices de: co-positi- vidad, co-negatividad, eficiencia	Nº	%	Indices de: co-positi- vidad, co-negatividad, eficiencia	
Posit.	49	33.3 (*)	50	34	1.0	51	34.6	1.0
Negat.	98	66.6	97	65.9	0.989	96	65.3	0.979
					0.993			0.986

(*) Positivos para las tres pruebas o dos de ellas.

RFC: Reacción de Fijación del Complemento.

RHI: Reacción de Hemaglutinación Indirecta.

RII: Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta.

DISCUSION

Uno de los pasos importantes en el desarrollo de la Técnica Dot-ELISA es impedir que en los espacios de la nitrocelulosa no ocupados por el antígeno se adhieran otras proteínas. De acuerdo con Batteiger et al. (1982) estos sitios pueden ser bloqueados con Tween 20 a una concentración muy baja tal como 0,05% v/v, sin embargo Moreiarty (1984) utiliza el Tween 20 al 0,3%, en este trabajo se utilizó a una concentración de 0,2% v/v con iguales resultados, no siendo necesario el uso de proteínas ni en el bloqueo inicial ni en los subsecuentes pasos de la reacción, lo que simplifica aún más la técnica. Algunos autores (Pappas et al., 1984) estabilizan el antígeno sobre la nitrocelulosa antes del bloqueo a temperatura de 56°C y otros (Araujo, 1985) a temperatura ambiente, nosotros preferimos dejarlo a 4°C durante 16-18 horas tratando de evitar de esta manera cualquier deterioro de la actividad antigénica. En la ejecución de la prueba se prefirió usar tubos de vidrio o placas con excavaciones de amplio diámetro, para contener los cuadrados de nitrocelulosa, en vez de las policubetas de 96 pocillos, por su bajo costo y por que al tener mayor capacidad permite usar mayores volúmenes de solución de lavado, lo que es muy importante pues el lavado es mejor mientras mayor volumen de solución se use.

La estrecha coincidencia entre el título diagnóstico calculado matemáticamente ($X + 2DE$) y gráficamente da una nueva opción para la determinación de los títulos diagnósticos en la serología convencional.

Al observar la distribución de frecuencia de los títulos (Tablas I y II) es notorio que la prueba de Dot-ELISA con la suspensión de epimastigotes como antígeno hace una mejor discriminación entre la población de sueros positivos y negativos (Tabla II) que la misma prueba, pero empleando el antígeno citoplasmático, lo cual sugiere que hay una mayor reactividad cruzada de los diferentes sueros frente a este último antígeno (Tabla I). Sin embargo, las muestras de suero de pacientes con leishmaniasis exhibieron reactividad a títulos superiores del considerado diagnóstico, independientemente del preparado antigénico utilizado. Al incluir este grupo de pacientes con leishmaniasis, la especificidad global de la prueba Dot-Elisa disminuye a 90% al usar antígeno citoplasmático y a 94% al utilizar el anti-

geno integral. Esta observación es importante a ser tomada en cuenta en aquellas áreas donde ambas enfermedades coexisten en forma endémica. La reactividad cruzada de los sueros de pacientes con leishmaniasis se explica por la presencia de antígenos comunes en los individuos de la familia Trypanosomatidae (Afchain et al., 1979).

En el estudio de la muestra de 147 sueros seleccionados al azar en el laboratorio de diagnóstico de Chagas de la Dirección de Malariología (Maracay Edo. Aragua) al que concurren personas residentes del área urbana remitidas al laboratorio por los centros asistenciales locales, al comparar las dos pruebas de Dot-ELISA con la serología convencional se puede ver que los índices de co-positividad, co-negatividad y de eficiencia son muy buenos para ambas pruebas indicando la bondad de la técnica.

Teniendo en cuenta que las pruebas serológicas más empleadas actualmente en el diagnóstico de Enfermedad de Chagas como: RFC, RII, RHI y ELISA, usan también antígenos crudos (Maekelt, 1960; Camargo, 1966; Kagan & Norman, 1970; Voller et al., 1975) con la consecuente posibilidad de reactividad cruzada, podríamos decir que la prueba Dot-ELISA las aventaja por la fácil ejecución y alta reproducibilidad, pudiendo realizarse además en un tiempo de 6 horas. En cuanto a costo, esta prueba permite gran ahorro de reactivos y el uso de antígenos muy simples como una suspensión de formas epimastigotas simplifica los procedimientos de laboratorio. Este antígeno ha demostrado además mayor estabilidad sobre la nitrocelulosa, a temperatura de 4°C, que el antígeno citoplasmático, lo que permitiría la preparación de reactivos en un laboratorio central distribuyéndolos luego a los periféricos. Con relación a ELISA en placa, la ventaja radica en que la prueba puede realizarse en pequeños tubos de vidrio o en cualquier placa de plástico que tengan excavaciones con una capacidad de 0,5 ml ya que el soporte de el antígeno es el papel de nitrocelulosa y no la superficie de la placa, esto realmente es importante porque en nuestro país las policubetas tienen un costo muy elevado por ser importadas y no pueden reusarse, la otra ventaja es que no necesita de aparato para lectura lo que también es valioso con respecto a la RII.

Esta técnica por lo económica en el consumo de antígeno podría ser la prueba de elección

para el uso de fracciones antigénicas purificadas y altamente específicas de *T. cruzi* (Schechter et al., 1983; Snary et al., 1983; Lemestre et al., 1986). El elevado costo de producción de estas biomoléculas purificadas podría ser reducido mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, mientras no podamos obtener fracciones antigénicas altamente específicas y de bajo costo, tendremos que seguir utilizando antígenos de especificidad limitada pero empleando técnicas sencillas de una reproductibilidad y sensibilidad adecuadas, y que puedan ser usadas en laboratorios de pocos recursos. Los resultados de este trabajo demuestran que la prueba Dot-ELISA con antígeno integral (epimastigotes intactos) permite detectar y cuantificar anticuerpos séricos contra antígenos de *T. cruzi* con una alta sensibilidad y una aceptable especificidad. Por lo tanto dicha prueba podría sustituir a las técnicas convencionales en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas y ser usada para el despistaje de Chagas en los Bancos de Sangre.

RESUMEN

El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi* – Se estudia el Ensayo Inmunoenzimático en Microgotas sobre Nitrocelulosa (Dot-ELISA) comparando dos preparaciones antigénicas de formas epimastigotas de cultivo de *T. cruzi*: 1) la fracción citoplasmática (antígeno citoplasmático) y 2) el parásito total fijado previamente con formaldehído (antígeno integral). Se usaron sueros de: 95 pacientes chagásicos con serología convencional positiva, cardiopatía crónica y algunos con xenodiagnóstico positivo; 42 personas sanas y 32 con miocardiopatía crónica con serología negativa y 74 pacientes con diferentes patologías incluyendo: sífilis, toxoplasmosis, lupus eritematoso diseminado, con factor reumatoide, leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea. Definidos los títulos diagnósticos (cut-off) de 1:512 con antígeno citoplasmático y de 1:128 con antígeno integral, la especificidad fue 96% para el primero y de 100% para el segundo; mientras que la sensibilidad fue de 100% para ambas. En el estudio comparativo con las pruebas serológicas convencionales examinando 147 sueros tomados de personas referidas al laboratorio, Dot-ELISA con antígeno citoplasmático presentó índices de co-positividad de

1,0, co-negatividad de 0,989 y eficiencia 0,993. Dot-ELISA con antígeno integral dió 1,0, 0,979 y 0,986 respectivamente. De acuerdo con esta evaluación, la técnica Dot-ELISA con antígeno integral se presenta como una alternativa práctica para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas.

Palabras Claves: inmunoserología – Dot-ELISA – preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. Alba Bravo de Mejias de el Laboratorio de Inmunodiagnóstico de la Asignatura de Parasitología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua y a las Licenciadas Meudy Medina y Elena Vaccari del Laboratorio de Diagnóstico de Chagas, Dirección de Malariología M.S.A.S., su valiosa colaboración técnica. Al Prof. Juan Luis L., por su ayuda en la corrección y redacción del manuscrito.

REFERENCIAS

- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT J. & CAPRON, A., 1979. Antigenic make up of *Trypanosoma cruzi* culture forms, identification of a specific component. *J. Parasitol.*, 65: 507-514.
- ANTHONY, R. L.; JOHSON C. M. & SOUSA O. E., 1979. Use of micro Elisa for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 969-973.
- ARAUJO, F., 1985. A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigen-coated nitrocellulose strips. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 242-245.
- BATTEIGER, B.; NEWHALL, W. J. & JONES, R. B., 1982. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Meth.*, 55: 297-307.
- CAMARGO, M. E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 8: 227-234.
- CAMARGO, M. E.; HOSHIMO-SHIMIZU S.; MACEDO, V.; PÉREZ BENEDITO, A. & CASTRO CLEUDSON, 1977. Diagnóstico sorológico da infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de testes de Fixação do Complemento, Imunofluorescência, Hemaglutinação, e Floclulação em 3.624 soros. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 19: 254-260.
- FLINT, J. E.; SCHECHTER, M.; CHAPMAN, M. D. & MILES, M. A., 1984. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78: 193-202.
- FREITAS, J. L. P., 1951. Reação da Fixação do Complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela Técnica quantitativa. *Arq. Hig.*, 16: 55-94.

- GART, J. J. & BUCK, A. A., 1966. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83: 593-602.
- HAWKES, R.; NIDAY, E. & GORDON, J. A., 1982. Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry*, 119: 142-147.
- HEBERT, A.; PITTMAN, B.; MCKINNEY, R. & CHERRY, W., 1972. *The preparation and physico-chemical characterization of fluorescent antibody reagents*. U. S. Department of Health Education and Welfare. Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia.
- KAFATOS, F. C.; JONES, C. W. & EFSTRADIADIS, F. C., 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentration by a Dot-hybridization procedure. *Nucl. Acids. Res.*, 7: 1541-1552.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L., 1970. Serodiagnosis of parasitic diseases, p. 453-486 In J. E. Blair, E. H. Lennebe & J. P. Traunt (Ed) *Manual of Clinical Microbiology*, Bethesda, Med. Academic Press.
- LEMESTRE, J. L.; AFCHAIN, D.; OROSCO, O.; LOYENS, M.; BRENIERE, F. S.; DESJEUX, P.; CARLIER, Y.; MARTIN, U.; NOGUEIRA-QUIROZ, J. A.; LE RAY, D. & CAPRON, A., 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi* - specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35: 86-93.
- MAEKELT, G. A., 1980. Die komplement bindungsreaktion das Chagas krankheit. 2. *Tropnmed. Parasitol.*, 11: 152-186.
- MORIEARTY, P. L., 1984. Characterization of antigens by Western blotting. In: C. M. Morel Ed. *Genes and Antigens of Parasites*, 2nd. ed. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.
- PAPPAS, M. G.; HAJKOSKI, R. & HOCHMEYER, W. T., 1984. Standardization of the Dot-Enzyme-Linked immunosorbent assay (Dot-Elisa) for human visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 1105-1111.
- REMINGTON, R. D. & SCHORCK, M. A., 1970. Section 9-4. p. 242-245. In: R. D. Remington & M. A. Schorck (Ed). *Statistics with applications to the biological and health sciences*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- SCHECHTER, M.; VOLLER, A.; MARINKELLE, C. J.; FLINT, J. E.; GUHL, F. & MILES, M. A., 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *The Lancet*, 22: 939-941.
- SNARY, D., 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*; protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 126-129.
- SPENCER, H. C.; ALLAIN, D. S.; SULZER, A. J. & COLLINS, W. E., 1980. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 170-182.
- TOWBIN, H.; STEAHELIN, T. & GORDON, I., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. sci.*, USA, 76: 4350-4354.
- VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D. E. & BARTLETT, A., 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *The Lancet*, 1: 426-428.