

Evaluación de ELISA FRA como marcador de infección activa en la enfermedad de Chagas crónica

Edith Felli

Centro de Investigación sobre Endemias Nacionales. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Ciencias biológicas – Bioquímica

Introducción

La enfermedad de Chagas es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, y se estima que se encuentran infectados de 8 a 10 millones de personas, solo en el continente americano (OPS).

Las recomendaciones para el tratamiento tripanocida (Nifurtimox y Beznidazol) indican que debe ser administrado en fase aguda, adquirida por cualquiera de las vías e independiente de la edad, y en la fase crónica de niños y adolescentes menores a 19 años.

Por otro lado, numerosas investigaciones demostraron efectividad del tratamiento en un porcentaje de infectados crónicos adultos, después de décadas de su finalización (Fabbro y col. 2000, 2001, 2007. Viotti y col. 2006).

La evaluación de tratamiento en esta etapa de la infección requiere estudios de seguimiento prolongado, debido a la lenta progresión de la enfermedad, con persistencia de serología convencional reactiva, incluso mucho tiempo después de realizado el tratamiento, siendo su negativización el criterio aceptado de cura.

Estas dificultades muestran la necesidad de contar con otras formas de evaluar el tratamiento en menor tiempo.

El antígeno flagelar repetitivo de *T cruzi* (FRA), corresponde al extremo aminoterminal de la proteína calpain cistein peptidasa de *T cruzi* de 1342 aminoácidos, que posee 6 repeticiones de 68 aminoácidos, y es uno de los péptidos más antigénicos de *T cruzi*, además de mostrar alta especificidad y sensibilidad en su utilización el ensayos de ELISA para diagnóstico de la enfermedad (Peralta y col, 2007).

Objetivo

Evaluar si ELISA FRA se anticipa a la serología convencional en la negativización postterapéuticas en adultos infectados crónicos.

Materiales y métodos

Diseño: estudio de cohorte retrospectivo.

Población en estudio: pacientes en seguimiento que concurren al CIEN para la realización de controles clínicos-serológicos-parasitológicos de la enfermedad de Chagas. Se analizaron 277 muestras de suero correspondientes a grupo A: 46 personas infectadas por *T cruzi* sin patología demostrable, no tratadas, con un seguimiento promedio de 14,5 ($\pm 6,6$) años; grupo B: 38 personas infectadas con *T cruzi* sin patología demostrable que realizaron el tratamiento antiparasitario específico con un seguimiento promedio de 18,0 ($\pm 8,23$) años. La edad promedio en la que fue administrado el tratamiento fue de 30,6 ($\pm 10,7$) años.

Los grupos fueron comparables en edad y sexo (Tabla 1). Como grupo control negativo se procesaron 17 muestras de sueros de personas no infectadas.

Tabla 1

Grupo	Sexo (F/M)	Edad	Seguimiento
A	12/34	38,56 (\pm 13,2) años	14,5 (\pm 6,6) años
B	9/29	37,26 (\pm 14,6) años	18,0 (\pm 8,2) años
Tests	Pearson $p=0,8000$	Student $p=0,6699$	

Tratamiento: Según Normas Nacionales al momento de su administración. Nifurtimox (Nx) 8-10 mg/kg/día, durante 45-60 días; Benznidazol (Bz): 5 mg/kg/día por 30 días.

Serología: La serología convencional realizada a todas las muestras fue hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmuno ensayo (ELISA).

Conservación de las muestras: Los sueros puros fueron conservados a -20°C y los sueros glicerizados a 4°C (igual volumen de muestra y de glicerina bufferada). Se utilizaron las muestras que presentaron reactividad similar al momento del chequeo.

Determinación del anticuerpo específico: Se utilizó una técnica de ELISA usando como antígeno la proteína FRA.

Análisis estadístico: Se utilizaron los test Shapiro-Swilk, de Wilcoxon, Mann Whitney, ANOVA y GEE, para todas las pruebas se fijó un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

Resultados

Se comparó el nivel de respuesta de Ac anti-FRA – iniciales y finales- en cada grupo. Para los pacientes no tratados (grupo A), los valores se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo (Wilcoxon, $p=0,2468$). Figura 1.

En el grupo de pacientes tratados (B), las lecturas finales fueron menores a las iniciales, siendo esta diferencia significativa (Wilcoxon, $p=0,0001$). Figura 2.

De los 46 pacientes del Grupo A no tratados, 45 fueron siempre reactivos para FRA y para serología convencional (SC). El restante no presentó reactividad para FRA y su SC fue fluctuante (valores en el límite de corte para algunas reacciones y para otras negativas).

En el Grupo B (tratados), fueron positivos para FRA al inicio 31/38 pacientes. De los 7 restantes que no presentaron reactividad en la muestra inicial analizada en esta experiencia, correspondían a muestras post-tratamiento (mediana de 9 años). Los sueros pre tratamiento u obtenidos muy próximos a su finalización se encontraban en mal estado de conservación. Los 38 pacientes presentaron SC reactiva al inicio del seguimiento.

Al final de seguimiento 10/31 pacientes tratados, reactivos al inicio, fueron negativos para FRA y de ellos 9 negativizaron también la SC. Disminuyeron los niveles de Ac anti-FRA en un 50% al menos, 11/31 pacientes tratados que no presentaron cambios en SC. Un paciente no modificó los valores de FRA pero tenía solo un año de seguimiento post tratamiento.

Figura 1. Grupo A

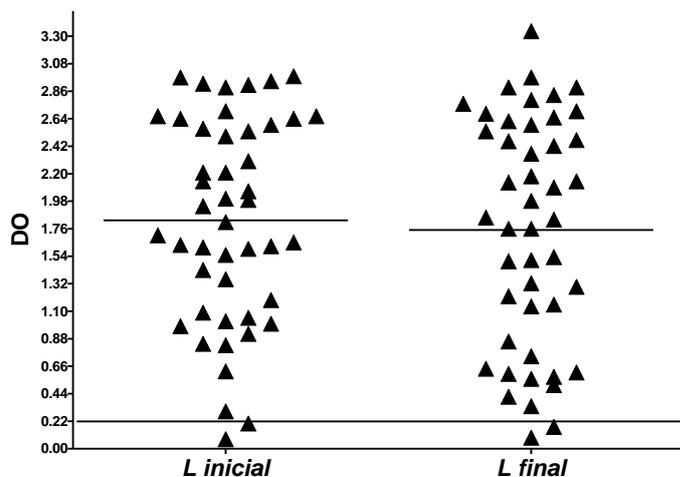


Figura 1. Lecturas iniciales y finales de Ac anti-FRA del grupo A, infectados chagasicos crónicos sin patología demostrada no tratados. No se observaron diferencias a lo largo del seguimiento (test de Wilcoxon, $p=0.2468$).

Figura 2. Grupo B

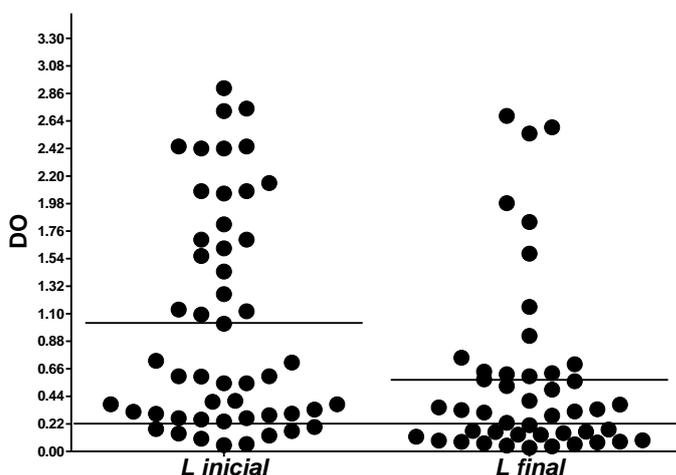


Figura 2. Lecturas iniciales y finales de Ac anti-FRA del grupo B, infectados chagasicos crónicos sin patología demostrada que recibieron tratamiento tripanocida. Las diferencias a lo largo del seguimiento son significativas (test de Wilcoxon, $p < 0.005$).

Se usó el modelo ANOVA para medidas repetidas, a fin de contemplar todas las muestras estudiadas por paciente. Se encontró que los niveles de Ac anti-FRA disminuyen a medida que aumentan los años desde el momento de finalización del tratamiento, siendo esta disminución significativa. ($p < 0,05$).

Se observó que los niveles de Ac anti-FRA caen 1.05 DO, por efecto del tratamiento, con un Intervalo de confianza de (1,41-069) $p < 0.05$. Para hacer este análisis se utilizó el test GEE que contempla la interacción del tratamiento y el orden de las muestras de cada paciente.

Comparación entre el nivel de respuesta ELISA-FRA y SC

Finalmente se restringió la observación a 9 pacientes del Grupo B que negativizaron tanto la serología convencional como ELISA FRA. Se analizaron los tiempo de negativización promedio, obteniéndose para la serología convencional un tiempo de negativización de 25,5 ($\pm 3,4$) años, y para ELISA FRA 20,2 ($\pm 5,1$) años.

También se analizó la diferencia entre los tiempos de negativización de cada prueba, observándose que FRA se adelanta una media de 5,3 ($\pm 1,9$) años respecto de la serología convencional ($p < 0,05$).

Conclusión.

Se observó una alta sensibilidad del ELISA FRA similar a la SC, ya que todos los pacientes que no recibieron tratamiento fueron siempre reactivos para ambos test.

En los pacientes tratados que no presentaron reactividad en la primera muestra disponible para este estudio, todas ellas post-tratamiento, se podría inferir que la ausencia de estos anticuerpos fue por efecto del mismo.

Además en los sueros que fueron reactivos para ELISA FRA en la primera muestra, se observó la seroconversión negativa y un significativo descenso de estos anticuerpos en quienes no negativizaron.

La seroconversión negativa de ELISA FRA se anticipó a la serología convencional en 5,3 ($\pm 1,9$) años.

Estos resultados indican que la prueba ELISA FRA podría ser de utilidad como marcador de infección activa y por tanto un test válido tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y evaluación post-terapéutica complementando a la serología convencional.

Bibliografía

Fabbro de Suasnábar, D., Arias, E., Streiger, M., Piacenza, M., Ingaramo, M., Del Barco, M., & Amicone, N. (2000). Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42(2), 99-109.

Fabbro, D., Arias, E., Streiger, M., Del Barco, M., Amicone, N., & Miglietta H. (2001). Evaluación de la quimioterapia específica en infectados chagásicos adultos en fase indeterminada con más de quince años de seguimiento. *Rev Fed Arg Cardiol*, 30, 496-505.

Fabbro, D. L. (2007). Evaluación del tratamiento etiológico en adultos con Chagas crónico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 40, 1-10.

Organización Panamericana de la Salud, 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas, Montevideo, 28p.

Peralta, J. M., Marcipar, I., & Sferco, S. J. (2007). Modelado molecular de péptidos que contienen secuencias repetitivas (FRA) de la proteína calpain cisteín peptidasa putativa de *Trypanosoma cruzi*. *FABICIB*, 11(1), 103-126.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M. G., & Armenti, A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of internal medicine*, 144(10), 724-734.