

células eucariote (Lederkremer *et al*, Biochem. Biophys. Res. Commun. , (1978), 85, 1268-1274; Eur. J. Biochem. , (1990), 192, 337-345; J. Biol. Chem. 266 (1991), 23670-23675.

Es interesante señalar la presencia de galactosa en configuración furanósica en el LPPG. No obstante que la galactosa está extensamente distribuida en la naturaleza, sólo se encuentra en configuración piranósica en células de mamífero, por esta razón el huésped produce anticuerpos contra galactosa furanósica. El diseño de inhibidores de su biosíntesis es un área de investigación atractiva en progreso en nuestro laboratorio.

MR10. Trans-sialidasa y mucinas de *Trypanosoma cruzi* GUIDO D. POLLEVICK, MARIA L. CREMONA, JAVIER M. DI NOIA, CARLOS A. BUSCAGLIA, ALEJANDRO BUSCHIAZZO, DANIEL O. SANCHEZ, OSCAR CAMPETELLA Y ALBERTO C. C. FRASCH.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín. C.C. 30, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina. gpollevi@inti.edu.ar

Entre las moléculas involucradas en la adhesión y penetración del parásito *Trypanosoma cruzi* a células de mamífero, se ha identificado a la trans-sialidasa (TS), una enzima capaz de transferir ácido siálico de una molécula dadora a una aceptora. La presencia de ácido siálico es necesaria para la infección del parásito a la célula hospedadora, *T. cruzi* no puede sintetizar ácido siálico, sin embargo lo adquiere en su superficie por acción de la TS. La secuencia de aminoácidos deducida del gen que codifica para la TS de la forma tripomastigote muestra que está compuesta por dos dominios. La región C-terminal innumodominante que contiene unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una, llamada SAPA (Shed Acute Phase Antigen) que induce una fuerte respuesta humoral detectable en humanos y ratones poco tiempo después de la infección. La región NH₂-terminal, donde se localiza la actividad enzimática contiene cuatro secuencias parcial o totalmente conservadas de la secuencia consenso SXXGX₂W presente en neuraminidasas bacterianas. Actualmente hemos identificado una familia de varios genes homólogos de la TS. Algunos de ellos codifican para proteínas con actividad enzimática y otros para productos inactivos. En estos últimos, el cambio de una tirosina en la posición 342 por una histidina es suficiente para inactivar a la trans-sialidasa. Por experimentos de hibridización se detectaron en las cepas RA y CL Brenner aproximadamente 60 genes codificantes para proteínas inactivas y similar cantidad para TS activa. A nivel de ARN mensajero se detectó la presencia de transcritos codificantes para productos activos e inactivos.

En tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes el ácido siálico es incorporado por acción de la TS, mayoritariamente en proteínas de 35/50 kDa ricas en Thr y Ser, que son altamente O-glicosiladas constituyendo moléculas del tipo de las mucinas de mamíferos. En tripomastigotes de cultivo se han descrito este mis-

mo tipo de moléculas pero con un peso molecular aparente entre 60 y 200 kDa. Todas estas moléculas son las principalesceptoras de ácido siálico del parásito, hecho que las relaciona fuertemente con la invasión celular. En nuestro laboratorio hemos clonado el primer gen codificante para una proteína del tipo mucinas de *T. cruzi*. La proteína deducida presentó cuatro unidades repetidas con la secuencia T(8)KP(2), flanqueadas por un N-terminal con un probable péptido señal y en el C-terminal con una región compatible con un anclaje del tipo GPI como está descrito en la mucinas del parásito. A partir de este dato se describió una compleja familia de genes del tipo mucina, todos ellos con un pequeño tamaño entre 350 y 650 pb. Todas las proteínas deducidas a partir de estos genes, presentan en los primeros 24-28 aminoácidos y en los últimos 50 aminoácidos un alta identidad (entre 70 y 100 %), variando las regiones centrales tanto en secuencia como en tamaño. Se han podido establecer entonces dos grupos: uno con una región central compuesta por elementos repetitivos en tandem con la región consenso T(8)KP(2), variando en el número de estas repeticiones y el otro sin elementos repetitivos pero con una región central enriquecida en residuos de Thr, Ser y Pro. Análisis de northern blots presentan una gruesa banda de un tamaño de 1000 bases, tanto en epimastigotes como tripomastigotes.

Finalmente utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente los epitopes de carbohidratos de las mucinas de *T. cruzi* y un suero dirigido contra la proteína recombinante expresada a partir de uno de los genes clonados en un sistema bacteriano, por experimentos de inmunoprecipitación y western blot se correlacionó a esta familia de genes de mucinas como los codificantes de las mucinas descritas en el parásito. También se demostró que cuando estos genes son expresados en sistemas eucariotes el producto obtenido se comporta como una mucina de mamífero. Financiado por SAREC (Suecia), el TDR/WHO y la Universidad de Buenos Aires.

Evaluación terapéutica y pronóstico de protozoosis

MR11. A chemiluminescence-based assay for the precise diagnosis and monitoring of the chemotherapy of chronic Chagas' disease. IGOR C. ALMEIDA¹, DIMAS COVAS², LEA M.T. SOUSSUMI², VERA L. PEREIRA-CHIOCCOLA³ AND LUIZ R. TRAVASSOS⁴.

¹Carbohydrate Research Centre, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK (icalmeida@bad.dundee.ac.uk); ²Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ³Instituto Dante Pazzanese and ⁴Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil.

A chemiluminescent (CL)-ELISA method, using a purified tripomastigote glycoconjugate (A&T antigen)(1) and an epimastigote preparation (EpEx antigen)(1), was developed aiming at a precise diagnosis of Chagas' dis-

ease in blood banks. Using a panel of 100 Chagasic sera (ChS) and 1,000 normal human sera (NHS), both antigens remarkable sensitivity, with the lowest reactive ChS giving a response about two times as high as that of the average reactivity of NHS + 10 standard deviations (SDs) (CL-ELISA cutoff). No reactivity with both antigens was found with sera from patients with other infections or autoimmune diseases. In contrast to EpEx, however, A&T showed to be highly specific since no cross-reactivity was observed with sera from patients with visceral and cutaneous leishmaniasis, and systemic mycoses. Also, a panel of 115 sera with inconclusive primary (IHA and ELISA) conventional serology (CS) for Chagas' disease was simultaneously tested in CL-ELISA with both A&T and EpEx. One hundred and one sera (87.8%) were negative with A&T; 95 sera (82.6%) were negative with EpEx. Fourteen sera (12.2%) gave positive reaction with A&T; 20 sera (17.4%) were negative for EpEx. None of the sera gave inconclusive result with both CL-ELISA tests. This panel was also tested with 8 conventional serology tests (1 HA, 1 IIF, 5 ELISAs and 1 Western-blotting), all based on epimastigote antigenic preparations. In this case, the number of inconclusive reactions varied from 7 (9%) to 68 sera (79.1%). We had previously reported (2) that nonspecific reactions are responsible for most of the discrepancy between CS and CL-ELISA. Indeed, the majority of inconclusive reactions in CS tests are due to either nonparasitic antigens, added as assay reagents (i.e. skim milk), or to nonspecific polyclonal B cell activation (2).

We have also been using the A&T CL-ELISA for monitoring the chemotherapy of patients with chronic Chagas' disease. In a recent study (3), we found that 58% of benznidazole-treated patients showed negative result with A&T CL-ELISA 36 months after the end of the treatment. In contrast, only 3 (5%) of the placebo-treated patients had a negative reaction with A&T. The CS (IIF, IHA and ELISA), however, was still positive for all patients despite a general decrease of the serum titres in the benznidazole-treated group. These results agree with our present observation that ca. 50% of a group of treated chronic patients had negative reactions with A&T CL-ELISA 3-5 years after the end of the chemotherapy. In contrast, the CS showed in all cases to be either inconclusive or positive. Whether the A&T-negative patients still have circulating parasites could only be assessed by xenodiagnosis and/or indirect hemoculture. So far no parasitemia has been detected in the A&T-negative patients. Therefore, we conclude that the A&T and EpEx CL-ELISA tests, assayed in parallel, can be introduced in blood banks for a reliable diagnosis of Chagas' disease. Moreover, the A&T CL-ELISA alone can also be used in monitoring the treatment of chronic Chagas' disease. Supported by WHO/TDR, Project no. 940244; and FAPESP (Brazil), Fellowship no. 96/4260-0.

1. Almeida, I.C., Covas, D.T., Soussumi, L.M.T. and Travassos, L.R. (1997) August issue, in press.
2. Almeida, I.C., Salles, Santos, M.L.P., Sabino, E.C., Saez-Alquezar, Oliveira, T.G. and Travassos, L.R. (1995) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90:72-74.

3. Andrade, A.L.S.S., Zicker, F., Oliveira, R.M., Silva, S.A., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., Andrade, S.S., Andrade, J.G. and Martelli, C.M. (1996) Lancet 348:1407-1413.

MR12. Avaliação da eficácia do tratamento da infecção chagásica: 15 anos de acompanhamento.
ANTONIANA U. KRETTLI, ZELIA M. P. LUZ & GREICE KRAUTZ.

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ & Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30190-002. FAX 55-31.295.3566; email <krettli@oraculo.lcc.ufmg.br>

O tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na fase aguda tem sido amplamente aceito e recomendado, inclusive como profilaxia nos casos de acidentes de laboratório, a ser feito o mais rápido possível. O tratamento de infecções crônicas recentes (crianças e adolescentes) é também preconizado, sendo eficaz em cerca de 60% dos casos, a julgar exames parasitológicos e de serologia convencional (SC) negativos. No entanto, tratar pacientes na fase crônica da infecção permanece tema controverso, por serem as drogas comercialmente disponíveis tóxicas e apenas parcialmente ativas. A resistência do clínico em tratar no ambulatório o chagásico crônico assintomático, se deve ainda a dificuldade em se avaliar a eficácia da conduta e os custos risco-benefício. Nós liberados pelo Food and Drug Administration na América do Norte, a necessidade desses medicamentos tem gerado transtornos e dificuldades no tratamento de infecções agudas acidentais (nos EUA e Europa). Na tentativa de desenvolver métodos complementares mais práticos e confiáveis para monitorar a terapêutica específica e diagnosticar infecções crônicas, temos estudado diferentes testes serológicos, em paralelo com hemoculturas repetidas. Testes de hemoculturas e xenodiagnóstico são em geral negativos após terapêutica na presença de persistente SC positiva, dado interpretado como fracasso terapêutico. No entanto, com base em estudos experimentais em camundongos imunizados com antígenos específicos, mas nunca infectados, e de pacientes tratados, demonstramos que SC persistentemente positiva pode ocorrer na ausência de infecção. Como método serológico alternativo mais adequado para monitorar terapêutica específica, inicialmente usamos como antígeno tripomastigotas vivos nos testes de lise mediada por complemento (LMCo), de imunofluorescência indireta, positivos apenas nos hospedeiros infectados (J. Immunology, 1982; Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg, 1982). Dificuldades técnicas na obtenção e manuseio de parasitas altamente virulentos e do teste de LMCo, resultaram em trabalhos para padronizar ELISA com antígenos de sobrenadante de culturas ishedadosi de tripomastigotas vivos, antígenos purificados inclusive a fração F2 (Rev. soc. Bras. med trop. 1993), além de antígenos recombinantes do *T. cruzi* (J. Clin. Microb., 1995) negativos em $\geq 30\%$ dos pacientes chagásicos tratados. Sua ausência é considerada indicativo de cura, mesmo se a SC permanece positiva. Para excluir possíveis parasitemias subpatentes