

REACTIVIDAD DEL ANTIGENO GST-SAPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* FRENTE A SUEROS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS Y LEISHMANIASIS

JOSE GIL^{1, 2, 4}, RUBEN CIMINO¹, INES LOPEZ QUIROGA¹, SILVANA CAJAL², NORMA ACOSTA², MARISA JUAREZ², ROSA ZACCA³, VIVIANA ORELLANA², ALEJANDRO KROLEWIECKI^{2, 4}, PATRICIO DIOSQUE⁴, JULIO NASSER^{1, 2}

¹Laboratorio de Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta (LQByBM), ²Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Sede Regional Orán, Universidad Nacional de Salta (IET), ³Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, ⁴Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud (IPE-CONICET), Universidad Nacional de Salta

Resumen El diagnóstico serológico de la infección producida por *Trypanosoma cruzi* es de especial relevancia dado que los métodos parasitológicos tienen, en las fases indeterminada y crónica, una sensibilidad limitada. El antígeno SAPA fue usado en diversos estudios y demostró ser un buen candidato para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis son endémicas en el norte de Salta, con posibles zonas de solapamiento. Este hecho suele dar lugar a infecciones mixtas *T. cruzi*-*Leishmania* spp., con la consecuente probabilidad de diagnóstico cruzado cuando se usan antígenos no específicos. Se evaluó la reactividad del antígeno GST-SAPA en la prueba de ELISA (ELISA-SAPA) frente a sueros de personas infectadas por *T. cruzi* (n = 154), con leishmaniasis (n = 66), infecciones mixtas (n = 29) y controles negativos (n = 28), usando como pruebas de referencia para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* kits comerciales de ELISA y IHA. Se calculó la sensibilidad, especificidad e índice de concordancia kappa de la prueba de ELISA-SAPA, para la detección de infección por *T. cruzi*. Entre los sueros de pacientes con leishmaniasis estudiados se detectó un 30.5% de infecciones mixtas. Para la detección de infección por *T. cruzi*, ELISA-SAPA mostró una sensibilidad del 97.1% (intervalo de confianza del 95%: 94.5-99.9), una especificidad del 100% (intervalo de confianza del 95%: 99.5-100) y un índice de concordancia kappa de 96 (intervalo de confianza del 95%: 93-99%), comparado con las pruebas serológicas comerciales. Los valores de sensibilidad, especificidad y concordancia calculados muestran una alta eficiencia de ELISA-SAPA.

Palabras clave: ELISA, SAPA, Chagas, leishmaniasis

Abstract *Reactivity of GST-SAPA antigen of Trypanosoma cruzi against sera from patients with Chagas disease and leishmaniasis.* Serologic diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection is important due

to the limited sensitivity of direct parasitologic methods for diagnosis in the indeterminate and chronic phases of disease. SAPA antigen has been used in several studies and has been shown to be a good marker for use in the diagnosis of *T. cruzi* infection. Chagas disease and leishmaniasis are endemic in northern Salta with overlapping zones of transmission, which frequently leads to *T. cruzi*-*Leishmania* spp. mixed infections. Diagnosis is complicated by the fact that there is significant cross-reactivity when non-specific antigens are used. We evaluated the reactivity of GST-SAPA antigen in the ELISA test (ELISA-SAPA) against sera from persons infected with *T. cruzi* (n = 154), leishmaniasis (n = 66), mixed infections (29), and healthy controls (n = 28) using commercial ELISA and IHA kits as reference tests. For ELISA-SAPA the sensitivity, specificity and kappa index were calculated for detection of *T. cruzi* infection. Among sera from patients infected with leishmaniasis, 30.5% of co-infections were detected. ELISA-SAPA sensitivity was 97.1% (confidence interval 95%: 94.5-99.9), specificity was 100% (confidence interval 95%: 99.4-100), and kappa index was 96% (confidence interval 95%: 93-99%), for detection of *T. cruzi* infection. Sensitivity, specificity and kappa indices have shown a high efficiency of ELISA-SAPA.

Key words: ELISA, SAPA, Chagas, leishmaniasis

Según la Organización Panamericana de la Salud, existen aproximadamente 8-10 millones de personas

infectadas por el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, distribuidas en Latinoamérica¹. El diagnóstico serológico de la infección producida por este parásito, es de especial relevancia dado que los métodos parasitológicos tienen una sensibilidad limitada en las fases indeterminada y crónica². Asimismo, el uso de proteínas recombinantes y/o sintéticas en las pruebas inmunológicas ha permitido mejorar la sensibili-

Recibido: 7-VI-2010

Aceptado: 4-III-2011

Dirección postal: Lic. José Fernando Gil, Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IET), Alvarado 751, 4530 San Ramón de la Nueva Orán, Salta, Argentina
Fax: (54-3878) 42-1924

e-mail: jgil@conicet.gov.ar

dad y la especificidad de las pruebas diagnósticas, medio por el cual se puede evitar resultados falsos-positivos o falsos-negativos³⁻⁵. Por su parte, el antígeno SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*) fue propuesto como marcador de fase aguda de la infección, el diagnóstico de la infección congénita y el seguimiento del tratamiento etiológico específico⁶⁻⁹. Diversos estudios evidenciaron diferentes resultados en cuanto a la proporción de reactividad de SAPA frente a sueros de pacientes chagásicos en las fases indeterminada y crónica de la infección⁹⁻¹².

La proteína TS-SAPA (*trans-Sialidase-SAPA*) se encuentra en la superficie de los trypomastigotes y cumple un rol importante en la invasión a la célula huésped. Esta proteína cuenta con dos dominios: uno enzimático (TS) y otro repetitivo (SAPA). El dominio repetitivo induce una acentuada y permanente respuesta inmunológica tanto humoral como celular^{6, 14, 15}.

Las áreas endémicas en Latinoamérica para la infección de *T. cruzi* y *Leishmania* spp. se superponen en algunas regiones¹⁴. Es el caso de Bolivia, Brasil y principalmente el norte argentino, en donde existen áreas de solapamiento de las dos infecciones¹⁶⁻¹⁸. Como los agentes etiológicos de estas enfermedades poseen una filogenia común muy cercana, es de esperar que compartan una significativa cantidad de características antigénicas. Por ello, pacientes con alguna de las dos infecciones o con infección mixta, pueden resultar mal diagnosticados debido a las reacciones serológicas cruzadas cuando se usan mezclas de antígenos no car-

acterizados^{19, 20}. Existe la necesidad de poder discriminar entre ambas parasitosis debido a que las estrategias de tratamiento para la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis tienen importantes diferencias, y que estudios sero-epidemiológicos pueden sub o sobre estimar la prevalencia de estas parasitosis¹⁹.

Los resultados de un trabajo previo de nuestro grupo sugerían que el antígeno SAPA está presente en *T. cruzi* no en *Leishmania* spp²¹. Por otro lado, no se encontraron reacciones serológicas cruzadas al analizar sueros de ratones infectados experimentalmente por *Trypanosoma rangeli*. Estos resultados muestran una potencial especificidad del antígeno SAPA para diagnóstico de la infección por *T. cruzi*²².

El objetivo de este trabajo fue evaluar la reactividad de sueros de personas con infección por *T. cruzi*, no infectadas y pacientes con leishmaniasis en un ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) con el antígeno recombinante GST-SAPA.

Materiales y métodos

Se estudiaron 154 sueros pertenecientes a personas infectadas por *T. cruzi* residentes en un área endémica para la enfermedad de Chagas, de la Provincia de Chaco, en la que no se han informado casos de leishmaniasis (Fig.1)²³. Estas muestras se evaluaron con los kits comerciales ELISA *Chagatest*, ELISA recombinante v.3.0 y Hemoaglutinación Indirecta (HAI) todos de Wiener Labs (Rosario, Argentina), para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.



Fig. 1.— Área de estudio. En círculo se representa la zona de la que provienen los sueros de pacientes con leishmaniasis, en cuadrado el área de la que proceden los sueros de pacientes sin infección por *T. cruzi*, ni por *Leishmania* spp. y en triángulo puede observarse la región en la cual se muestrearon los sueros de pacientes chagásicos.

Las pruebas de ELISA se realizaron usando muestras de suero en dilución 1:20. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de cabra conjugada con peroxidasa; la reacción fue revelada con tetrametilbenzidina (TMB) en presencia del sustrato específico (H_2O_2) y se detuvo con SO_4H_2 (2N). En particular, ELISA *recombinante* v.3.0 posee seis antígenos recombinantes específicos (entre los que está incluido SAPA) de los estadios epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, los cuales corresponden a zonas altamente conservadas del genoma para las distintas cepas del parásito.

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* fue considerado como positivo cuando los sueros presentaron reacción positiva por HAI y ELISA recombinante o ELISA *Chagatest*. Los sueros controles sin infección chagásica provinieron de personas residentes en Salta-Capital (n = 45), los cuales fueron evaluados por HAI, ELISA recombinante y ELISA *Chagatest* (Fig. 1). Se analizaron además 95 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea americana, determinada por la identificación de amastigotes en frotis de las lesiones e intradermorreacción de Montenegro¹⁷. Estos sueros procedieron de áreas endémicas para leishmaniasis cutánea, como son las localidades de San Ramón de la Nueva Orán, Hipólito Irigoyen, Pichanal, Embarcación y Tartagal, en la Provincia de Salta²⁴. Usando la prueba ELISA recombinante (100% de especificidad para enfermedad de Chagas frente a sueros de pacientes con leishmaniasis) se identificaron las infecciones mixtas por *T. cruzi* y *Leishmania* spp. en este panel de sueros²⁵.

El antígeno GST-SAPA fue producido usando bacterias *Escherichia coli* transformadas con el plásmido pGEX-1. El desarrollo de bacterias transformadas fue llevado a cabo en medio Luria Bertani (LB) estéril, y se destinaron a la inducción para la expresión del gen pGEX-1-SAPA. Para la posterior purificación de dicho antígeno recombinante se utilizó una columna de afinidad glutation-agarosa. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (12%) para evaluar la producción del antígeno recombinante GST-SAPA y luego se cuantificó por medio del método de Bradford. El antígeno se conservó a -20 °C hasta su uso^{4, 26}.

La técnica de ELISA, utilizando el antígeno recombinante GST-SAPA (de *T. cruzi*) como sensibilizante de placa, se realizó plaqueando 1 µg/pocillo y se dejó toda la noche a 4 °C. Luego del bloqueo con leche descremada-PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*) al 5% durante una hora, se lavó con *buffer* de lavado y se utilizaron los reactivos de revelado de ELISA *recombinante*, respetándose su protocolo. Los sueros se utilizaron en dilución 1:20 (anticuerpo primario) y se agregó luego 50 µl de anti-IgG de cabra conjugada con peroxidasa. Para todos los sueros se realizaron determinaciones dobles. La reacción fue revelada con TMB en presencia de H_2O_2 y se detuvo con SO_4H_2 (2N). La lectura de las densidades ópticas (DO) se realizó mediante un lector de microplacas *Metrolab* a 450 nm. La línea de corte fue calculada como $cut\ off = PNC + 0.300\ DO$, donde PNC es el promedio de las DO de los controles negativos. La zona de indeterminación se calculó como $cut\ off \pm 10\%$ (Wiener Labs, 2000).

Los resultados serológicos se analizaron utilizando pruebas de comparación de proporciones, cálculo de sensibilidad, especificidad e índice de concordancia kappa, usando el software EPIDAT 3.1²⁷. La sensibilidad y especificidad de ELISA-SAPA fue calculada considerando como pruebas de referencia los kits ELISA recombinante, ELISA *Chagatest* y HAI. Sin embargo, para definir una infección mixta entre *Leishmania* spp. y *T. cruzi* se consideró la positividad por ELISA *recombinante* de los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea. Así, para el cálculo de la sensibilidad y la especificidad, los controles positivos corresponden a los sueros de pacientes chagásicos y con infecciones mixtas, mientras que los controles negativos están constituidos por los sueros de personas "sanas" y aquellos de pacientes que sólo padecían

leishmaniasis. Mediante el programa *InfoStat/Profesional Versión: 2006p.1*, se compararon las medias de DO/*cut off* a través de la construcción, de forma no paramétrica (*Bootstrap*; nivel de confianza del 95%), de intervalos de confianza, observándose luego si existieron solapamientos para definir la presencia o ausencia de diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

Del total de los sueros pertenecientes a personas infectadas por *T. cruzi* analizados por las pruebas de referencia para el diagnóstico de Chagas, el 98.1% (151/154) fueron reactivas para dos de las tres técnicas. El 100% de ellos resultaron reactivos por ELISA *recombinante* y el 91.6% (141/154) por HAI. De las 85 muestras analizadas por ELISA *Chagatest* un 96% (82/85) mostró reacción positiva (Tabla 1).

El 98% (148/151) de los sueros de pacientes con infección por *T. cruzi* mostraron anticuerpos anti-SAPA, y sólo seis (n = 6) del total no reaccionaron contra este antígeno. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de reactividad de ELISA-SAPA y la prueba de referencia ELISA *Chagatest* (p = 0.831) ni frente a HAI (p = 0.814). Sin embargo, al comparar los resultados de ELISA recombinante con ELISA-SAPA se observaron diferencias significativas (p = 0.038) para un $\alpha = 0.05$, con una mayor sensibilidad del primer test.

De los 95 sueros de pacientes con leishmaniasis, 28 resultaron positivos para ambas ELISAs comerciales, las que entre ellas obtuvieron para estos sueros, un índice de concordancia kappa de 97% (intervalo de confianza = 92-100%; error estándar: 0.024). El 27.4% (26/95) de estos sueros fueron reactivos para ELISA-SAPA (Tabla 1). Al comparar la proporción de positivos para ELISA-SAPA y ELISA recombinante no existen diferencias estadísticamente significativas (p = 0.749) ni con ELISA *Chagatest* (p = 0.872). Los resultados de la prueba de HAI no pudieron ser interpretados dada la presencia de heterofilia acentuada que se obtuvo para estas muestras.

Los sueros provenientes de personas residentes en la capital de Salta (zona sin transmisión vectorial de *T. cruzi*, ni *Leishmania* spp.), evidenciaron negatividad para las pruebas de referencia, obteniéndose el mismo resultado de ausencia de reactividad frente al antígeno SAPA (0/28) (Tabla 1).

La sensibilidad y especificidad para ELISA-SAPA fue del 97.1% (intervalo de confianza del 95%: 94.5-99,9) y del 100% (intervalo de confianza del 95%: 99.4-100) respectivamente. Mientras tanto, el índice de concordancia kappa al comparar ELISA-SAPA con los resultados de las pruebas de referencia fue de 96% (Intervalo de Confianza = 93-99%; error estándar: 0.017) para un nivel de confianza del 99%.

El intervalo de confianza del promedio de las DO de los sueros de pacientes con infección por *T. cruzi* frente a

TABLA 1.– Valores absolutos y porcentajes de reactividad para ELISA-SAPA y las pruebas comerciales, enfrentadas a los distintos grupos de sueros.

Grupos de sueros		ELISA-SAPA	ELISA <i>recombinante</i>	ELISA <i>Chagatest</i>	HAI
Pacientes con infección por <i>T. cruzi</i>	+	148	154	82	141
	-	6	0	3	13
	Total	154	154	85	154
	% +	96.10	100.00	96.47	91.56
	% -	3.90	0.00	3.53	8.44
Pacientes con leishmaniasis	+	0	0	0	nd
	-	66	66	66	nd
	Total	66	66	66	nd
	% +	0.00	0.00	0.00	nd
	% -	100.00	100.00	100.00	nd
Pacientes con Infecciones mixtas	+	26	29	28	nd
	-	3	0	1	nd
	Total	29	29	29	nd
	% +	89.65	100	96.55	nd
	% -	10.34	0	3.44	nd
Controles negativos	+	0	0	0	0
	-	28	45	45	45
	Total	28	45	45	45
	% +	0.00	0.00	0.00	0.00
	% -	100.00	100.00	100.00	100.00

nd: No determinado

TABLA 2.– Promedio de las DO relativas al cut off (DO/cut off) y sus intervalos de confianza del 95% para ELISA-SAPA frente a los distintos grupos de sueros

Grupos de sueros	Promedio (DO/cut off)	LI(95%)	LS(95%)
Pacientes con infección por <i>T. cruzi</i>	6.105	5.748	6.408
Pacientes con leishmaniasis	0.282	0.217	0.338
Pacientes con infecciones mixtas	4.630	3.643	5.460
Controles negativos	0.370	0.207	0.542

LI: Limite inferior del intervalo de confianza.

LS: Limite superior del intervalo de confianza.

ELISA-SAPA se solapa con el intervalo de confianza del promedio de DO de los sueros de pacientes con posibles infecciones mixtas *T. cruzi*-*Leishmania* spp. Asimismo, los intervalos para las DO promedio de los controles negativos se solapan con el intervalo del grupo de sueros de pacientes con leishmaniasis, mostrando también valores medios y dispersión similar (Tabla 2).

La Fig. 2 muestra, para ELISA-SAPA, que las DO de los controles negativos tienen una dispersión, y posición de tendencia central, similar al grupo de sueros de pa-

cientes con leishmaniasis que no mostraron reacción para ELISA recombinante. En cuanto a los valores relativos de DO en los sueros de pacientes con infección por *T. cruzi*, ellos muestran una amplia dispersión, mayor que la observada para las infecciones mixtas. Los valores máximos para los sueros de pacientes con infección por *T. cruzi* son de 9.9 DO/cut off, mientras que los de los pacientes con infecciones mixtas son de 7 DO/cut off y; consecuentemente, la media de este último grupo es menor (Fig. 2).

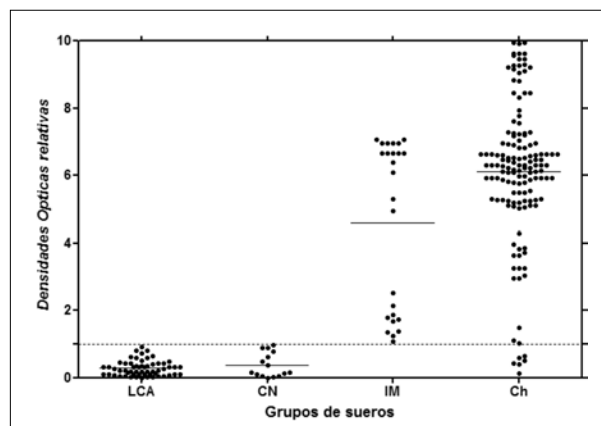


Fig. 2.- Se muestran las densidades ópticas relativas al *cut off* (DO/*cut off*) para ELISA-SAPA frente a sueros de personas sin infección (CN), pacientes con leishmaniasis (LCA), chagásicos (Ch) y con infecciones mixtas (IM). La línea horizontal de valor 1, representa al *cut off*.

Discusión

El antígeno SAPA ha sido utilizado para el diagnóstico de neonatos con transmisión congénita y para el seguimiento serológico del tratamiento con beznidazol de la infección chagásica^{6, 9, 28}. En nuestro estudio, la sensibilidad calculada para ELISA-SAPA fue elevada (97.1%) y algunos trabajos publicados por diferentes autores evidencian resultados heterogéneos respecto a la reactividad del antígeno SAPA frente a sueros de personas en fase crónica (32% y 38%) o indeterminada (81% y 88%)⁹⁻¹².

Algunas de las razones a las que pueden deberse las disparidades en los resultados son las diferencias metodológicas entre laboratorios, aunque también podría estar actuando la diversidad genética del parásito y del huésped, evidenciándose la importancia de llevar a cabo estudios de tipo multicéntricos como se ha realizado para otros antígenos^{29, 33}.

Los sueros analizados en nuestro trabajo, provenientes de la provincia de Chaco, pertenecen a personas de un rango de edad comprendido entre 1-82 años, por lo que no se podría asumir que todos se encontraban cursando la fase aguda de la infección en el momento de la toma de muestra. Estos resultados dan evidencia de que en la fase indeterminada y crónica de la infección por *T. cruzi* siguen existiendo niveles detectables de IgG anti-SAPA. Una hipótesis que explicaría estos hallazgos es la existencia de ciclos de recirculación a partir de los tejidos infectados, hacia nuevos tejidos. Durante estos ciclos de recirculación existirían reducidas e intermitentes parasitemias generando una respuesta ininterrumpida y variable de anticuerpos anti-SAPA¹⁰. Además, puede haber existido transmisión activa al momento de la toma de muestras, pudiendo ser esto también causa de la presencia de niveles detectables

de anticuerpos anti-SAPA. Un estudio en perros muestra cómo las reinfecciones generan nuevas parasitemias detectables por métodos convencionales³¹.

La presencia de infecciones mixtas (*Leishmania* spp. y *T. cruzi*) en nuestro panel de sueros fue de un 30.5%, (29/95) y es consistente con los resultados obtenidos en un estudio donde se analizaron 330 sueros de pacientes con leishmaniasis procedentes del norte de Salta (la misma zona de muestreo del presente trabajo), que reveló un 41% de infecciones mixtas utilizando el antígeno Ag163B6 en pruebas de ELISA y/o *immunoblotting* como técnicas de *screening* ($p = 0.086$)¹⁷. Dado que la infección chagásica no es endémica en el departamento de Orán, los casos que aparecen se deben principalmente a migración desde la región chaqueña endémica para la enfermedad de Chagas.

La especificidad del 100% para ELISA-SAPA respaldaría lo propuesto por Davies (1999) sobre la ausencia de reactividad cruzada del antígeno SAPA frente a sueros de huéspedes infectados por *Leishmania* spp., a partir de un estudio donde evaluó sueros de perros con leishmaniasis cutánea utilizando la técnica de ELISA²¹.

El elevado valor de índice de concordancia kappa (94%), considerado excelente dentro de la escala propuesta por Landis y Koch, indica una elevada eficiencia para este antígeno. Esta escala es ampliamente usada, principalmente en la validación de métodos y técnicas diagnósticas, como así también para el control de calidad de laboratorios³²⁻³⁵. ELISA recombinante está conformado por seis antígenos recombinantes, de los que uno de ellos es SAPA; por lo tanto, la *performance* de ELISA recombinante puede deberse en gran medida a la *performance* del antígeno SAPA³⁶.

Por otro lado, a nuestro criterio, la especificidad obtenida para ELISA-SAPA debe seguir siendo evaluada por medio de estudios confirmatorios de la infección por *T. cruzi* en los pacientes con leishmaniasis (infecciones mixtas) mediante métodos que demuestren la presencia del parásito.

Desde el punto de vista del tamizaje serológico, la utilización del ELISA-SAPA representaría una herramienta diagnóstica de alto valor. En cuanto a la investigación epidemiológica, ELISA-SAPA puede representar un medio para la detección de focos de transmisión activa realizando un *screening* en niños, dado que las reinfecciones mantendrían una respuesta humoral anti-SAPA³⁷. Además, se contará con la posibilidad de producir este antígeno en los laboratorios de las zonas endémicas del norte de Argentina, y el procesado de muestras de forma masiva.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), del IRD-DSF, del Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSA), la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación a través de un PICTo-2006 (Préstamo BID 1728 OC AR PICTo 36714) y

la European Union Seventh Framework Programme, contract number 223034 (ChagasEpiNet). Se agradece a Wiener labs por la donación de los kits de ELISA y HAI. Se agradece además al Dr. Daniel Sánchez (Investigaciones Biotecnológicas – Universidad General San Martín) por la donación de los clones de *Escherichia coli* transformadas. Nuestro profundo agradecimiento a Néstor Juan Taranto (fallecido el 19-IX-2007) por habernos abierto las puertas de su instituto, del cual ahora formamos parte, por su constante apoyo, y por la revisión y corrección de la primera versión de este trabajo.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés financieros o personales.

Bibliografía

- OPS/OMS. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo, Uruguay. 2006.
- Sosa Estani S, Segura E. Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 166-70.
- Umezawa E, Nascimento M, Kesper N, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2143-47.
- Caballero Z, Sousa O, Marques W, Saez-Alquezar A, Umezawa E. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1045-49.
- da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001; 17: 286-91.
- Afranchino J, Ibáñez C, Luquetti A, et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the phase acute of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 34: 221-8.
- Reyes M, Lorca M, Muñoz P, Frash A. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2846-50.
- Umezawa E, Silveira F. Serological diagnosis of chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999; 94.
- Flores-Chavez M, Bosseno MF, Bastrenta B, et al. Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75: 497-01.
- Brenière S, Yaksic N, Telleria J, et al. Immune response to *Trypanosoma cruzi* shed acute phase antigen in children from an endemic area for Chagas disease Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1997; 92: 503-07.
- Lorca M, González A, Reyes V, Veloso C, Vergara U, Frash C. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica mediante antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med Chile* 1993; 121: 363-68.
- Vergara U, Lorca M, Veloso C, et al. Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2034-37.
- Nasser JR, Gomez LE, Sanchez D, Guerin M, Basombrio MA. Immunogenicity of the recombinant SAPA protein of *Trypanosoma cruzi* for mice. *J Parasitol* 1997; 83:76-1.
- Passos V, Volpini A, Braga E. Differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1997; 92: 791-93.
- Cazzulo JJ, Frash AC. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J* 1992; 6: 3259-64.
- Chiaromonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Heredia V, Taranto NJ, Malchiodi EL. Estudio de casos de leishmaniasis en la Provincia de Salta: evidencias de infección mixta por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 259-68.
- Frank FM, Fernandez MM, Taranto NJ, et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 2003; 126: 31-9.
- Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, et al. Human Mixed Infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian Area: Identification by Polymerase Chain Reaction/hybridization and Isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2003; 98: 255-64.
- Chiaromonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Malchiodi EL. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. human mixed infection. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 271-73.
- Malchiodi EL, Chiaromonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 417-23.
- Davies C, Cimino R, Marco J, Nasser J, Basombrio M. Reactividad del antígeno recombinante SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de perros de zonas endémicas para las enfermedades de Chagas y leishmaniasis. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 60:86.
- Barrio A, Nasser J, Sánchez D, Uncos A, Basombrio M. Ausencia de reacción cruzada para el antígeno SAPA de *Trypanosoma cruzi* en ratones infectados por *Trypanosoma rangeli*. Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias XVI Reunión Científica Anual. Córdoba, Argentina 1998; *Abstract* Nº 13.
- Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, et al. Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 590-93.
- Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, Juárez M, Acosta N, Cimino RO, Diosque P, Krolewiecki AJ. Urban transmission of american cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 433-40.
- Pastini A, Iglesias S, Carnicarte V, Guerin M, Sanchez D, Frash A. Immunoassay with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens potentially useful for screening donated blood and diagnosing Chagas disease. *Clin Chem* 1994; 40: 1893-97.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitative analysis of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *An Biochem* 1976: 248-54.
- Abraira V. El índice kappa. *Notas estadísticas* 2000; 27: 247-49.
- Mallimaci MC, Sosa-Estani S, Russomando G, et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 82: 55-9.
- Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frash AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule

- provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* 2002; 195: 401-13.
30. Umezawa E, Luquetti A, Levitus G, et al. 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: 449-52.
 31. Machado EM, Fernandes AJ, Murta SM, et al. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 958-65.
 32. Monteon V, Guzman-Bracho C, Florián-Verdugo J, Ramos-Hecheverria A, Velasco-Castrejon Reyes P. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas: autosuficiencia y concordancia interlaboratorios. *Salud Púb Mex* 1995; 37: 232-35.
 33. López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández S. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria* 1999; 6: 169-71.
 34. García M, Cabezas C, Martos L, Gonzáles A, Acosta R. Determinación de anticuerpos IgM contra el virus dengue a partir de sangre absorbida en papel de filtro: un método alternativo y sencillo. *Rev Med Exp* 2000; 17: 1-4.
 35. Sosa-Jurado F, Zumaquero-Ríos J, Reyes P. Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. *Salud Publ Méx* 2004; 46: 39-8.
 36. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-74.
 37. de Andrade A, Zicker F, Luquetti A, et al. Surveillance of *Trypanosoma cruzi* transmission by serological screening of schoolchildren. *Bull World Health Organ* 1992; 70: 625-29.

LA TAPA

Pablo Francisco Edelstein. **La familia**, 1990

Cerámica, 60 x 19 x 13 cm. Cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Predio TANDAR, Centro Atómico Constituyentes. Presidente de la Comisión Organizadora de la Exposición Permanente: Dr. A.J.G.Maroto.

Pablo F. Edelstein nació en Suiza, se naturalizó argentino y falleció en Buenos Aires a los 93 años, el 22 de octubre de 2010. Había estudiado pintura con J. Larco y Raul Soldi; escultura con Lucio Fontana. Enseñó muchos años en las Escuelas Nacionales de Bellas Artes y formó alumnos en su taller particular. Fue asesor de la Secretaría de Cultura de la Nación. Concurrió a numerosos salones obteniendo importantes premios. Realizó monumentos y esculturas por encargo y expuso sus obras en numerosas muestras individuales. Hay obras suyas en museos, instituciones y en colecciones particulares. Una fuente escultórica titulada "La Alborada" fue donada por él para la Fundación Favalaro y se encuentra en el patio de la institución. La Asociación Argentina de Artistas Escultores lo incorporó en 2007 como Miembro de su Tribunal de Honor^{1,2}.

¹Comisión Nacional de Energía Atómica. Artistas Plásticos con la CIENCIA, 102 Centro Atómico Constituyentes, Predio TANDAR, Buenos Aires, 1999; p 105.

²Periódico La Barra, diciembre 2007.