



Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* por la técnica de Western Blot en población canina del Departamento del Tolima, Colombia

Marlyn Hellen Romero-Peñuela¹, Jorge Alberto Sánchez-Valencia¹

¹Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

marlyn.romero@ucaldas.com

(Recibido: 23 junio, 2008; aprobado: 26 agosto, 2008)

RESUMEN: La Enfermedad de Chagas es una zoonosis de evolución crónica, causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, que afecta al hombre y a los caninos; es transmitida por la picadura de vectores triatomíneos hematófagos de los géneros *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* principalmente, en el ciclo doméstico de transmisión en Colombia. Un estudio serológico fue desarrollado con 211 caninos criollos procedentes de seis municipios del departamento del Tolima. Las muestras de suero fueron analizadas por la técnica Western Blot, usando epitopes específicos de *Trypanosoma cruzi* denominados antígenos TESA. Se obtuvo una seroprevalencia del 1,42% (3/211 sueros) en el grupo evaluado. Los resultados muestran una baja prevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma* en esta población canina. El estudio sugiere que los caninos juegan un papel limitado en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en esta área endémica de Colombia.

Palabras clave: antígenos TESA, enfermedad de Chagas, TESA-Blot, zoonosis

Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* by the Western Blot technique in canine population in the State of Tolima, Colombia

ABSTRACT: The Chagas disease is a zoonosis of chronic evolution caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects man and canines. It is transmitted mainly by the vectors *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, in a domestic transmission cycle in Colombia. A serological survey was carried out with 211 mongrel canines from six municipalities of the department of Tolima. The serum was analyzed by Western blot technique, using specific epitopes named TESA antigens. A seroprevalence of 1.42% (3/211 serums) was obtained in the evaluated group. These results show the low prevalence of anti-*Trypanosoma* antibodies in these canine populations. The study suggests that canines play a non important role in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in this endemic area in Colombia.

Key words: TESA antigens, Chagas disease, TESA-Blot, zoonosis.

Introducción

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica causada por un parásito protozoo llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por insectos triatomíneos hematófagos (Corredor et al., 1999; Brutus et al., 2008; Rosypal et al., 2007). El parásito es transmitido cuando las heces del vector contaminadas con trypomastigotes metacíclicos, son inoculados a los hospederos a través del proceso de rascado (Corredor et al., 1999). En los animales, la transmisión puede ocurrir por ingestión de insectos infectados, aspecto que experimentalmente ha sido confirmado, y puede ser considerado de gran importancia epidemiológica. En Texas, Estados Unidos, este último aspecto ha permitido explicar la infección probable de caninos con insectos silvestres, en lugares donde la infección humana es rara o no existe (Montenegro et al., 2002; Shadomy et al., 2004).

Los caninos son considerados importantes reservorios en la transmisión doméstica de *Trypanosoma cruzi* en América Latina y en algunos estados del sur de Estados Unidos como Texas, Oklahoma, Louisiana, Virginia, Georgia y el Sur de Carolina (Kjos et al., 2008). Así mismo, los caninos se han usado como centinelas de la infección humana en la vigilancia natural del parásito en regiones endémicas de América Latina, por su alta capacidad infectiva para los vectores triatomíneos, debido a su persistente parasitemia (Castanera et al., 1998; Kjos et al., 2008), y porque ofrecen mecanismos más efectivos para adquirir la enfermedad, antes que la transmisión se establezca entre los humanos. (Castanera et al., 1998; Lauricella et al., 1998; Montenegro et al., 2002; Shadomy et al., 2004).

La enfermedad en los caninos presenta un amplio espectro clínico, con una fase aguda que puede ser fatal en animales jóvenes y una fase crónica con cardiopatía, que en muchas ocasiones puede producir la muerte repentinamente (Montenegro et al., 2002). La fase aguda puede ser sintomática o no, aproximadamente con una duración de dos

meses, evolucionando a una fase crónica que persiste por el resto de la vida del hospedero (Caliari et al., 2002; Machado et al., 2001).

Dada la importancia epidemiológica de los caninos en la transmisión de la enfermedad de Chagas, como reservorios del parásito en las zonas endémicas, es fundamental conocer la prevalencia de la infección, como medida de vigilancia epidemiológica activa, para identificar la circulación del parásito antes que éste infecte a la población humana susceptible, en especial en zonas donde se ha comprobado la existencia de los vectores responsables de la transmisión de la enfermedad de Chagas.

El presente artículo tiene como objetivo conocer la seroreactividad de sueros caninos ante antígenos específicos de *Trypanosoma cruzi*, en una zona endémica del departamento del Tolima (Colombia).

Materiales y Métodos

Área geográfica: El área de estudio se localiza en el sur del departamento del Tolima y está conformada por los municipios de Coyaima, Natagaima, Purificación, Ataco, Coello y Ortega, zona endémica a la enfermedad de Chagas. Se caracterizan por ser zonas climáticas variadas, donde hay bosque seco tropical, bosque húmedo premontano y bosque muy húmedo montano bajo. Los municipios se encuentran a una altitud que fluctúa entre 323 y 1.445 m.s.n.m (Instituto Colombiano Agustín Codazzi, 1996).

Sueros caninos: El estudio se desarrolló usando doscientos once sueros caninos que fueron recolectados aleatoriamente durante el año 2005. Se obtuvo el consentimiento informado de los propietarios de los caninos para realizar la toma de muestras de sangre, siguiendo las normas éticas para el manejo de animales establecidas en la Ley 84 de 1989 y las normas éticas para investigación sin riesgos en comunidades, descritas en la resolución del Ministerio de Salud No. 008430 de 1993. Se recolectó sangre completa por venopunción para la obtención de suero y posterior análisis.

TESA-BLOT: El procesamiento de los sueros se hizo por medio de la prueba Western Blot (WB), usando los antígenos recombinantes TESA de *Trypanosoma cruzi*, los cuales son reconocidos exclusivamente por sueros que han estado en contacto con este parásito (Umezawa, et al., 1996). Esta prueba se desarrolló por medio de un trabajo colaborativo con la Dra. Eufrosina S. Umezawa, investigadora del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Análisis Estadístico: Con los resultados se elaboró una base de datos y el análisis estadístico de los mismos se realizó mediante estadística descriptiva, usando el programa WIN EPISCOPE 2.0.

Resultados y Discusión

Mediante la técnica de Western Blot, y usando los antígenos recombinantes TESA de *Trypanosoma cruzi*, se obtuvo una prevalencia muy baja del 1,42% (3/211) del parásito en el grupo evaluado. Dos caninos provenían del municipio de Coyaima y uno de Ataco (Tabla 1).

Con la finalidad de conocer la seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en población canina localizada en una zona endémica para la enfermedad de Chagas en el departamento del Tolima, se realizó una prueba de Western Blot (WB) denominada TESA blot, que contiene antígenos específicos de trypomastigotes, que muestran una alta sensibilidad no sólo en los casos de enfermedad de Chagas crónica, sino también en la enfermedad

aguda y congénita (Umezawa et al., 1996). Esta técnica permite detectar los caninos que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, porque las inmunoglobulinas G presentes en los sueros, reaccionan con antígenos de 150 – 160 Kda, mientras que los pacientes en la fase aguda y en la enfermedad congénita, las IgGs y las IgMs reaccionan con los componentes que presentan un peso entre 130 - 200 Kda (Umezawa et al., 1996; Umezawa et al., 2004; Nakazawa et al., 2001).

La prueba detectó sólo 3 caninos infectados, que corresponde a una seroprevalencia en el grupo evaluado del 1,42% (3/211 caninos), similar a la reportada por Rosypal et al. (2007) en Colombia (1,6% por IFAT). Comparando los resultados con estudios realizados en diferentes países, la seroprevalencia hallada en el presente trabajo (1,42%) fue más baja que la reportada por Kjos et al. (2008) en Texas (20,3% por ELISA), Montenegro et al. (2002) en Costa Rica (27,7% mediante ELISA), Gurtler et al. (1998) y Diosque et al. (2005) en Argentina (41,2% por xenodiagnóstico y 15,09% por serología y examen parasitológico, respectivamente) y Estrada-Franco et al. (2006) en Mexico (17,5% usando cinco pruebas serológicas); pero similar a la establecida en Texas (2,6% usando diferentes técnicas diagnósticas) por Shadomy et al. (2004) y por Barr et al. (1991) (4,7% por ELISA) en Louisiana.

Los antígenos TESA evaluados en el presente trabajo son excretados espontáneamente y continuamente en la superficie de los trypomastigotes de

Tabla 1. Caninos positivos a la prueba Western Blot usando los antígenos recombinantes TESA de *Trypanosoma cruzi*.

Características	Caninos		
	1	2	3
Municipio	Coyaima	Ataco	Coyaima
Vereda	Agua Fría	Balsilla San Roque	Totarco Tamarindo

Trypanosoma cruzi y están conformados por polipéptidos de diferentes pesos moleculares, principalmente glicosidasas, glicotransferasas y proteasas; los cuales son reconocidos por los sueros de pacientes chagásicos y han sido denominados antígenos excretados-secretados por trypomastigotes (TESA) en cultivos de *Trypanosoma cruzi*. Fueron colectados en los sobrenadantes de cultivos de células mamíferas como la LLC-MK2, los polipéptidos se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. La prueba fue desarrollada por inmunoblotting y se denominó TESA-Blot (Umezawa et al., 1996; Umezawa et al., 1999).

Las moléculas excretadas TESA pertenecen a la familia de las Transialidasas. Durante los estadios tempranos de la infección se presenta una secreción intensa de moléculas TESA denominadas “antígenos secretados en la fase aguda” (SAPA), que generan la producción de anticuerpos, que funcionan como marcadores de la infección aguda (Umezawa et al., 2004). Publicaciones recientes han soportado la hipótesis de que los antígenos de la familia de las transialidasas están asociados con la invasión celular, debido a su capacidad de unirse a receptores celulares y a la matriz de proteínas extracelulares. Así mismo, las proteínas TESA han sido implicadas en la modulación de la respuesta inmune permitiendo la regulación de la actividad de las células T (Gomes-Silva et al., 2004).

Los parámetros específicos de IgM producidos durante la infección aguda temprana sugiere que estos anticuerpos están dirigidos contra las repeticiones de antígenos TESA incluidos en el complejo SAPA. Durante la fase aguda temprana, las muestras que contienen IgG reconocen antígenos débilmente por debajo de los 100 Kda. En la fase aguda tardía, las inmunoglobulinas IgM y IgG revelan bandas fuertes de aproximadamente 150 – 160 Kda (Gomes silva et al., 2004). Varios autores han demostrado que la banda que se presenta en los geles con un peso entre 150 y 160 Kda, es una molécula muy poco polimórfica entre los aislados de *Trypanosoma*

cruzi y contiene epitopes conservados que son altamente inmunogénicos en la fase crónica de la tripanosomiasis americana (Nakazawa et al., 2001). De forma complementaria, esta proteína puede discriminar entre pacientes tratados curados y no curados, siendo usado para el seguimiento de pacientes chagásicos post-tratamiento (Umezawa et al., 1999).

De acuerdo con lo anteriormente descrito, uno de los caninos evaluados presentó reactividad con bandas localizadas entre los 150 y 160 Kda, que sugiere un estadio crónico de la infección y dos caninos presentaron bandas entre los 130 y 200 Kda, que corresponden a infección aguda.

Conclusiones

Los resultados de la investigación no permiten concluir un diagnóstico definitivo de tripanosomiasis canina. Sin embargo, dada la alta especificidad de los epitopes usados, se afirma que el parásito está circulando en la población animal.

Teniendo en cuenta la baja seroprevalencia en el grupo evaluado, este hallazgo sugiere que los caninos juegan un papel limitado en la transmisión del parásito en esta área endémica del departamento del Tolima.

Referencias bibliográficas

- Barr, S.C.; Dennis, V.A. ; Klei, T.R. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine population of southern Louisiana. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.113–120, 1991.
- Brutus, L.; Shneider, D.; Postigo, J.; et al. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. **Acta Tropica** (2008). doi:10.1016/j.actatropica.2008.03.009. In press.
- Caliari, M; Machado, R.; Lana, M.; et al. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.5, p.273–278, 2002.

- Castanera, M.B.; Lauricella, M.A.; Chuit, R.; et al. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.92, n.6, p.671–683, 1998.
- Corredor, A.; Alvarez, C.A.; Agudelo C.A.; et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.41, n.4, p.229–234, 1999.
- Diosque, P.; Padilla, A.; Cimino, R.; et al. Chagas disease in rural areas of Chaco province Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.71, n.5, p.590-593, 2004.
- Estrada-Franco, J.G.; Bathia, V.; Díaz-Albiter, H.; et al. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. **Emerging Infection Disease**. v.21, n.4, p.624- 630, 2006.
- Gomes-Silva, A.; Silveira-Lacerda, P.; Pereira, J., et al. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.37, n.6, p.454- 459, 2004.
- Guhl, S. & Nicholls, S. **Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas**. 1.ed. Bogotá, Colombia: Organización Mundial de la Salud, Ministerio de Salud de Colombia, Instituto Nacional de Salud y Universidad de los Andes, 2001. p.98.
- Gurtler, R.; Cohen, J.; Cecere, M.; et al. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.58, n.6, p.748-758, 1998.
- Instituto Colombiano Agustín Codazzi. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. **Diccionario geográfico de Colombia**. Bogotá D.C., 1996.
- Kjos, S.A.; Snowden, T.M.; Craig, T.M.; et al. Distribution and characterization of canine Chagas Disease in Texas. **Veterinary Parasitology**, v.152, p.249–256, 2008.
- Lauricella, M.A.; Castanera, M.B.; Gürtler, R.E.; et al. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) Infection in Naturally Infected Dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.4, p.501–507, 1998.
- Machado, E.; Fernandes, A.; Murta, S.; et al. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.6, p.958–965, 2001.
- Montenegro, V.; Jiménez, M.; Pinto Dias, J.C.; et al. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.4, p.491-494, 2002.
- Nakazawa, M.; Pereira, D.; Moura M.; et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of Chronic Chagas disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.5, p.1024-1027, 2001.
- Neto, V.A.; De Marchi, C.; Ferreira, A. Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n.6, p.534-535, 2005.
- Rosypal, A.C.; Cortés-Vecino, J.A. ; Gennari, S.M.; et al. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.172-177, 2007.
- Shadomy, S.; Waring, S.C.; Chappell, C. Combined use of Enzyme-linked Immunoabsorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.3, p.313-319, 2004.
- Umezawa, E.; Bastos, S.; Camargo, M.; et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1554-1560, 1996.
- Umezawa, E.; Bastos, S.; Camargo, M.E.; et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1554-1560, 1999.
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.449-452, 2004.