



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“PÉPTIDOS RECOMBINANTES DE *Trypanosoma cruzi*
Y SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL ESTADO DE
GUERRERO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ANA LILIA RAMIREZ TAPIA

DIRECTOR DE TESIS: M. en S.P. Eduardo Martínez Sandoval.

CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE DE 2008.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 9 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Campus Zacatenco, México D.F.

Bajo la dirección de:

M. en S.P. Eduardo Martínez Sandoval

Dr. José Luis Rosales Encina

La tutoría de:

Dr. Donaciano Flores Robles

La asesoría de:

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Pavel Sierra Martínez

Esta investigación se desarrollo con el financiamiento de CONACYT No. 47437 "Proteínas de choque térmico como vehículo inmunoproláctico contra la infección por parásitos protozoarios" cuyo responsable es el Dr. José Luis Rosales Encina.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Ana Lilia Ramírez Tapia recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por tu gran misericordia y amor, por haberme dado la vida y llenarla de instantes hermosos.

A mi padre Germán Ramírez Sánchez: Por ser el pilar de mi educación, por darme el orgullo y coraje para lograr mis metas y enseñarme a ser autosuficiente.

A mi madre Lilia Tapia Ávila: Por todas tus oraciones y consejos, por que por ti estoy aquí y por ti seguiré adelante. Te quiero mucho.

A mis primos Carlos y Gustavo: Por su apoyo en mis momentos de inseguridad y por que juntos formamos un hogar durante 7 años.

A mis grandes amigos Claudia, Paola y Juan Antonio: Gracias por su amistad y por sus enseñanzas. Honestidad, disciplina y compañerismo son los valores que me fomentaron.

A mi generación 2006-2008: Gracias por cada momento que compartimos, por el trabajo y el llanto, pero sobre todo por tantas alegrías. Así fueron para mí, una luz en mí caminar. No lo olviden tienen una amiga incondicional en Jojutla, Morelos.

Al Dr. José Luis Rosales Encina: Le agradezco profundamente por confiar en mi y poner este proyecto en mis manos, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y orientarme con sus conocimientos.

Al Dr. Donaciano Flores Robles: Gracias por ver en mi algo bueno, por su amistad y sus regaños. Se acuerda que no me caía bien, ahora le agradezco a Dios por ponerlo en mi camino.

A la bióloga Lidia Baylón: Gracias Lid por tu paciencia y por tu disponibilidad para ayudarme en el trabajo de laboratorio.

ÍNDICE

	PÁGINA
Resumen	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
I. Introducción	1
II. Material y Métodos	5
III. Resultados	10
IV. Discusión y Conclusión	23
V. Referencias	28

RESUMEN

Antecedentes. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas está basado en métodos serológicos con alta ocurrencia de resultados falsos positivos. Se recomienda el uso de antígenos recombinantes para incrementar la sensibilidad y especificidad de pruebas serológicas. La proteína Hsp70 de *Trypanosoma cruzi* es el principal blanco de la inmunidad humoral, los epítopes inmunodominantes están concentrados en la porción carboxilo terminal de la molécula. La proteína SPA es una proteína de superficie de *Trypanosoma cruzi* que es reconocida por sueros de pacientes chagásicos. **Objetivo.** Detectar la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* utilizando antígenos recombinantes del parásito en personas del estado de Guerrero, México. **Material y métodos.** Expresadas como productos de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP), antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp fueron evaluados por ELISA y Western blot; se incluyó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando epimastigotes fijados. El estudio se llevó a cabo con 47 muestras de suero de personas con la enfermedad de Chagas confirmada (n=23) diagnosticados como seropositivos con HAI e IFI y de personas no chagásicas (n=24) del estado de Guerrero, México. **Resultados.** Cuando las dos proteínas recombinantes fueron evaluadas independientemente por ELISA y WB y se combinaron los resultados obtenidos, junto con la prueba de IFI, la sensibilidad y especificidad para los sueros analizados, fue de 96% y 92% respectivamente. Los resultados obtenidos con los antígenos recombinantes MBP::TcHsp70-Chp o MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp mostraron una sensibilidad de 85.1% y 95.8% y una especificidad de 100% y 88.8% respectivamente. **Conclusiones.** Los sueros de personas chagásicas del estado de Guerrero, reconocen antigénicamente a los péptidos recombinantes MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp de *Trypanosoma cruzi*. Los inmunoensayos de ELISA y WB utilizando estos antígenos, son altamente sensibles y específicos. Proponemos el uso de estos antígenos en dos ensayos secuenciales para optimizar el diagnóstico serológico de *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Péptidos recombinantes, Diagnóstico.

ABSTRACT

Background: Diagnosis of Chagas disease is based on serological methods with high occurrence of false positive. The use of recombinant antigens is recommended to increase the sensitivity and specificity of serological tests. The protein Hsp70 of *Trypanosoma cruzi* is the main target of humoral immunity, the epitopes immunodominants are concentrated in the carboxyl terminal portion of the molecule. The SPA is a protein surface of *Trypanosoma cruzi*, which is recognized by serum of patients Chagasics. **Objective.** To screen for serum antibodies against *Trypanosoma cruzi* by using parasite recombinant antigens in people from state of Guerrero, México. **Material and methods.** Expressed as products of the fusion to maltose-binding protein (MBP), recombinant antigens MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp of *Trypanosoma cruzi* were evaluated by Western blot and ELISA; and for the IFI assay fixed epimastigotes were used. The study was carried out with 47 serum samples from subjects with confirmed Chaga's disease (n=23) diagnosed as seropositive with HAI and IFI, and nonchagasic patients (n=24) from state of Guerrero, México. **Results.** When the two recombinante proteins were assayed separately by ELISA and WB, and the obtained results combined, along with the IFI test, the sensibility and specificity for the assayed sera samples, were 96 % and 92 % respectively. Results obtained with the MBP::TcHsp70-Chp or MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp recombinant antigens showed a sensitivity of 85.1% or 95.8% , and a specificity of 100% or 88.8% respectively. **Conclusion.** Sera of chagasic people of the state of Guerrero, México antigenically to recognize the recombinant peptides MBP: TcHsp70-Chp and MBP: TcSPA: TcHsp70-Chp. Immunoassay as ELISA and WB whit these antigens are highly sensitive and specific. We propose the use of these antigens in two sequential trials to optimize the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Recombinant antigens, Diagnosis.

I. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa crónica que se distribuye desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta la Patagonia; fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1906 en Minas Geiras, Brasil; quien además identificó como agente etiológico al parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*.¹ La OMS y el Banco Mundial reportan que la enfermedad de Chagas es el tercer padecimiento infeccioso/parasitario más frecuente en la región, después del SIDA y la tuberculosis. Las estimaciones de la OMS indican que entre 16 – 18 millones de personas están infectadas por *T. cruzi*; y que 12 millones de personas están en riesgo de infección.²⁻⁴ En México, la tripanosomiasis es conocida desde 1936; resultados de la Encuesta Serológica (ENSE) realizada en 1989 mostraron que 1.6% del total de la población estaba infectada.⁵

En el ciclo biológico de *T. cruzi*, están involucrados el hombre, el artrópodo transmisor (triatomino) y un gran número de reservorios mamíferos como roedores naturalmente infectados.⁶ Aunque el 90% de la enfermedad es transmitida vectorialmente mediante el insecto hematófago, la transmisión entre humanos también es significativa ya que un 8% de las infecciones se ha dado mediante transfusiones de sangre contaminada con el parásito.^{5, 7, 8} Dado que el control de la transmisión vectorial ha comenzado a practicarse en varios países, una de las herramientas más importantes para controlar la infección intrahumanos es el diagnóstico correcto en donadores de sangre crónicos asintomáticos.³

Después de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, los parásitos raramente son encontrados en sangre, el diagnóstico principal está basado en métodos serológicos tales como hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos inmunoabsorbentes asociado a enzimas (ELISA); sin embargo, la gran mayoría de los “kits” de diagnóstico disponibles comercialmente utilizan extractos completos o fracciones semipurificadas de epimastigotes de *T. cruzi* que es la forma no infectiva del parásito (este es un estadio económico y factible en términos de cultivo), esta metodología proporciona una sensibilidad de 75%-100%⁹ y a pesar de que el uso de esta mezcla compleja de antígenos (Ag) ha sido aceptada

para el cribaje, frecuentemente muestra baja especificidad (82-99%¹⁰) debido a la reacción cruzada de algunos componentes con proteínas de otros protozoarios filogenéticamente relacionados, como los del género *Leishmania* o *Trypanosoma rangelli* dando lugar a resultados falsos-positivos.¹⁰⁻¹² Este escenario indica claramente la necesidad de identificar y evaluar antígenos que permitan aumentar la especificidad y sensibilidad en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.

En años recientes y gracias a tecnologías moleculares, tales como la clonación de genes y expresión de los péptidos correspondientes, se han podido identificar y evaluar antígenos que pueden ser útiles en el diagnóstico.¹³⁻¹⁵ En esta dirección, muchos autores han propuesto el uso de antígenos nativos purificados o recombinantes para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la principal desventaja de utilizar antígenos nativos es la dificultad para purificar estas proteínas de extracto total del parásito debido a las bajas cantidades obtenidas; por otro lado, muchos de los antígenos recombinantes no han sido completamente sensibles y específicos como para sustituir definitivamente a antígenos nativos, esto es explicado por el hecho de que las proteínas nativas no fueron capaces de inducir una respuesta inmune eficiente. Para resolver esta problemática, se plantea el uso de una combinación de más de una proteína recombinante para alcanzar la sensibilidad de la serología convencional. Varios genes de *T. cruzi* han sido clonados y algunos de los antígenos recombinantes han sido ensayados para uso en el diagnóstico.^{11, 16-21}

Otro aspecto importante es que los antígenos recombinantes pueden fallar en especificidad cuando algunos fragmentos de su secuencia de aminoácidos son compartidos con sus ortólogos en otros organismos. En estos casos, el fragmento de DNA que codifica para la región no específica puede ser removido, produciendo un antígeno recombinante optimizado en términos de especificidad.²¹ Como es el caso de la calflagina de *T. cruzi* de la cual, se ha identificado y removido el fragmento responsable de la reacción cruzada con *Leishmania spp* y se ha obtenido un antígeno optimizado para el diagnóstico.²²⁻²⁴

Debido a que el curso del ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre un insecto vector y un huésped mamífero, un "shock" térmico (de 26 a 37° C o más) se produce

naturalmente, y el parásito responde a este “shock” sintetizando un grupo de proteínas que tienen pesos moleculares de 100, 90, 70 y 60 KDa. Estas proteínas de choque térmico (Hsp) están involucradas en la tolerancia térmica y estrés químico y han sido observadas en los tres estadios principales de *T. cruzi*.²⁵ De las 4 familias de genes *hsp*, la familia de genes *hsp70* ha sido la más estudiada, esta familia está organizada en arreglos en tandem de 10 miembros que es transcrito como un pre-mRNA policistrónico.²⁶

Miembros de esta familia proteica en tripanosomatidaes están localizadas en el citoplasma (cy-Hsp70), mitocondria (mt-Hsp70) y retículo endoplásmico (grp78)²⁵.²⁷ Se ha descrito la distribución celular de las proteínas Hsp70 y Hsp60 de *T. cruzi*, mostrando que estas familias están compuestas de varias isoformas expresadas en condiciones fisiológicas y que algunas son mayormente inducidas por calor, estableciendo que después del “shock” térmico Hsp70 está asociada, entre otros organelos subcelulares a la membrana celular tanto en amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos.²⁸

Engman *et al.*, 1990²⁹, realizó ensayos de traducción *In vitro* del RNA de *T. cruzi*, seguido por inmunoprecipitación del producto de traducción con sueros chagásicos identificando a la proteína Hsp70 como el principal blanco de la inmunidad humoral, estableciendo que los anticuerpos son altamente específicos para la Hsp70 del parásito y que éstos no reaccionan con proteínas homólogas de humano. Hsp70 de *T. cruzi* y Hsp70 humana presentan una similitud de 73% en su secuencia de aminoácidos, la región carboxilo terminal de Hsp70 de *T. cruzi* contiene 12 repeticiones del tetrapéptido GMPG, un elemento no encontrado en la proteína humana. Esto es, los epítopes inmunodominantes están concentrados en la región variable de la porción carboxilo terminal de la molécula. Se han analizado sueros de pacientes con enfermedad chagásica crónica en países como Colombia, Brasil, Bolivia, México y Argentina y todas muestran patrones de precipitación similares a los mencionados anteriormente, por lo que se propone que dicha proteína tiene aplicaciones diagnósticas.

En México, se ha evaluado la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, utilizando la proteína recombinante MBP::TcHsp70 (MBP, proteínas de unión a

maltosa), en sueros de donadores de Orizaba, Veracruz y en Monterrey, Nuevo León, mostrando la utilidad diagnóstica de esta proteína.³⁰ Con el interés de mejorar este antígeno para el diagnóstico, en el presente trabajo, se optimizaron antígenos recombinantes de *T. cruzi* para la detección de la infección, utilizando la proteína TcHsp70, primero mediante la escisión del fragmento que disminuye la especificidad obteniendo el antígeno MBP::TcHsp70-Chp y posteriormente fusionando el fragmento C-terminal de TcHsp70 al dominio A de la proteína TcSP para originar el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp. La proteína TcSP se encuentra presente en los tres estadios de vida de *T. cruzi* y se ha demostrado que es reconocida por sueros de pacientes chagásicos. Se llevaron a cabo ensayos de protección donde se inmunizaron ratones BALB/c con el plásmido pBKCMV-TcSP, los resultados mostraron una protección del 100% en cuanto a mortalidad y una disminución del 72.9% de la parasitemia en comparación con los controles.³¹ El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de anticuerpos contra estas proteínas quiméricas en personas chagásicas y no chagásicas del estado de Guerrero, México y valorar su utilidad diagnóstica; de esta manera se puede proponer a las autoridades sanitarias una opción más para homogenizar un método de diagnóstico serológico específico y sensible basado en antígenos recombinantes.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Un total de 47 sueros humanos se emplearon en este estudio; 27 de las muestras fueron obtenidas de 2 comunidades rurales del estado de Guerrero. Los sueros fueron de sujetos sanos de uno u otro sexo de 30 años y más de edad, residentes de la localidad de Tierra blanca, municipio de Ometepec (n=16) y de la localidad de Coapango (n=11). Los sujetos se identificaron como casos y controles, los casos fueron diagnosticados como seropositivos con HAI e IFI en el laboratorio Multidisciplinario de la Unidad Académica de Medicina de la U.A.G. Los controles fueron sujetos vecinos o familiares de los seropositivos y de edades similares ± 5 años. Los 20 sueros restantes los proporcionó el Laboratorio Estatal de Salud Pública de la SSA de Acapulco, Gro., incluyendo sueros de personas chagásicas y personas sanas. Los 47 sueros se proporcionaron en condiciones ciegas para el analizador.

OBTENCIÓN DE SUEROS.

Muestras de sangre de los sujetos de estudio se colectaron de la vena periférica mediante el uso de jeringas y material estéril no reciclable; el suero se separó por centrifugación a 1,500 rpm (Beckman) durante 10 min, almacenado en tubos eppendorf y congelado a -20° C hasta su uso.

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MBP::TcHsp70, MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp.

A partir de una biblioteca de cDNA de amastigotes de *T. cruzi* creada en el vector λ gt11 se obtuvieron las clonas TcHsp70 y TcSP mediante el tamizaje con un "pool" de sueros de pacientes chagásicos.^{31, 32}

Para la obtención de la proteína recombinante MBP::TcHsp70 se clonó el fragmento de cDNA TcHsp70 en el sitio *EcoRI* del vector de expresión pMal-c2x (BioLabs New England) dando lugar al plásmido pMal-Hsp70.³³

Para obtener la proteína MBP::TcHsp70-Chp, el plásmido pMal-Hsp70 fue digerido con la enzima *Pst*I y el fragmento liberado de 350 pb fue subclonado en el sitio *Pst*I del vector pMal-c2x, denominando a este nuevo plásmido como pMal-Hsp70-350 que codifica para el fragmento C-terminal (Chp) de la proteína TcHsp70.³³

Para obtener la proteína recombinante MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp, el fragmento de 350 pb del plásmido pMal-Hsp70-350 se subclonó en el sitio *Pst*I del plásmido pMal-TcSPA para generar el plásmido pMal-TcSPA-TcHsp70-350. El gene TcSPA codifica para la parte amino terminal (dominio A) de la proteína de superficie *TcSP*.³¹

Estos plásmidos se utilizaron para transformar a *Escherichia coli* de la cepa DH5 α (GIBCO BRL), y expresar las proteínas recombinantes MBP::TcHsp70, MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp respectivamente.³⁴

Una sola colonia de *E.coli* conteniendo el plásmido correspondiente a cada una de las construcciones descritas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB)/Ampicilina (50 μ g/ml) por 24 hrs a 37° C en agitación (200 ciclos/min). Los cultivos fueron diluidos 1:10 en LB fresco e incubados hasta alcanzar 2X10⁸ células/ml (A_{600} =0.5). La expresión de las proteínas fue inducida a 30° C, adicionando isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Roche) a una concentración final de 0.3 mM, en agitación de 200 rpm durante una hora y media, después de la inducción, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4,000 rpm (centrífuga Beckman rotor JA10) durante 20 minutos a 4° C.

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A AMILOSA.

Las células inducidas se sometieron a “shock” osmótico en “buffer” de Tris-HCl 30 mM pH 8.0, sacarosa 20% y EDTA 1mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después del “shock” osmótico, se cosecharon por centrifugación a 8,000 rpm (centrífuga Beckman rotor JA10) durante 20 minutos a 4° C, estas células se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM pH 7.4, PMSF 1 mM, IA 3 mM, NEM 3 mM, TLCK 3 mM, NaCl 150 mM, 200 μ g/ml de lisozima y Tritón X-100 1%, posteriormente, las células se lisaron por sonicación (Ultrasonic Processor 100 watt); finalmente se

pusieron en contacto con DNasa (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 minutos a 37° C. El sobrenadante fue aclarado por centrifugación a 13,000 rpm (centrífuga Beckman rotor JS13.1) durante 20 minutos y fue pasado por una columna de 2 ml de resina de Amilasa (Biolabs). La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM y EDTA 1 mM. La proteína de fusión fue eluida adicionando cinco volúmenes de columna de “buffer” de elusión (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM). Se recuperaron 10 fracciones del eluido, la calidad de la proteína recombinante fue evaluada por SDS-PAGE.³⁵

SDS-PAGE 10%.

Se resuspendieron 10 μl de cada eluido en “buffer” de muestra 4X (Glicerol 2%, SDS 10%, Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol 0.2% y β -ME 200 mM) y se hirvieron durante 5 minutos. Se cargaron al gel, 10 μl de cada eluido. Para hacer la separación electroforética, se aplicaron 160 volts durante una hora aproximadamente. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie.

INMUNOENSAYO ABSORBENTE ASOCIADO A ENZIMA (ELISA).

La concentración total de la proteína se determinó por el método de Bradford.³⁶ La concentración óptima del antígeno (1 $\mu\text{g/ml}$) fue determinada utilizando 0.5, 1, 1.5 y 2 $\mu\text{g/ml}$ por pozo de cada proteína, y analizados para obtener la mejor discriminación entre sueros negativos y positivos. Así, placas de fondo plano para microtitulación (Costar) fueron sensibilizadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de las proteínas recombinantes y de la proteína de fusión MBP en “buffer” de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 y se incubaron toda la noche a 4° C. Las placas se lavaron 5 veces con Tween-20 0.05% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.4 mM) para descartar el antígeno no unido. Las placas se bloquearon con 200 μl de PBST conteniendo leche baja en grasas al 5% (marca Svelty), durante 2 hrs a 37° C. Posteriormente se adicionaron a las placas 50 μl por duplicado de cada uno de los sueros de personas del estado de Guerrero, México para detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, a una dilución final de 1:100 en PBST-Leche 5%; se

incubaron a 4° C durante toda la noche. Se hicieron 5 lavados con PBST y se adicionaron 50 µl del anticuerpo de cabra anti IgG, IgA e IgM humano (Pierce) acoplado a peroxidasa a una dilución 1:2,500 en PBST y se incubó durante 1 hr a 37° C. Después de 5 lavados con PBST y uno adicional solo con PBS, se adicionaron 100 µl de la solución sustrato (Citrato de sodio 10 mM pH 4.2, H₂O₂ 0.03% conteniendo 1 mg/ml de ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenziazolina)-6-acido sulfónico]) (Zymed), se dejó desarrollar el color durante 10 minutos y las placas fueron leídas a 405 nm en un lector de ELISA (Multiscan Lab System).³⁰

El valor de corte (VC) para este ensayo se estableció mediante el promedio obtenido de 24 sueros de sujetos sanos más dos o tres desviaciones estándar. Para el caso de la proteína MBP::TcHsp70, no se logró obtener el valor de corte; mientras que para las proteínas MBP::TcHsp70-Chp el VC fue establecido en 0.263 unidades de densidad óptica (U de D.O.), y para MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp fue de 0.278 U de D.O., para la proteína MBP, el VC se estableció en 0.431 U de D.O. Además; se estandarizó en las mismas condiciones un ELISA utilizando una mezcla antigénica de las proteínas MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp a una concentración de 1 µg/ml de cada una; el VC para este ELISA fue establecida mediante la media de U. de D.O. del grupo de sujetos sanos, más dos desviaciones estándar, quedando como VC 0.408 U. de D.O.

WESTERN BLOT (WB).

Para su inmunodetección, 15 µg de la proteína MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp y 12 µg de la proteína MBP::TcHsp70-Chp se sometieron a SDS-PAGE al 10% en gel preparativo y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (BioRad) en una cámara de transferencia a 4° C durante una hora a 80 volts. Se verificó la transferencia de las proteínas utilizando el colorante rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon con TBST (Tween 20 0.05%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0) conteniendo leche baja en grasas al 5% (marca Svelty) durante una hora y posteriormente se lavaron con TBST.

Los sueros de cada individuo a una dilución 1:200 en TBST se pusieron en contacto con tiras de nitrocelulosa bloqueadas, la reacción se realizó durante 2 hrs a

temperatura ambiente en agitación. Se aplicaron 10 lavados con TBST. Los anticuerpos unidos a la membrana se detectaron utilizando como segundo anticuerpo IgG, IgA e IgM de cabra anti-humano conjugado a fosfatasa alcalina (Pierce) a una dilución 1:5,000 en TBST durante 1 hora en agitación suave, se aplicaron 10 lavados con TBST de 10 minutos cada uno. La reacción fue revelada con NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) y BCIP (azul de tetrazolium, Sigma) en buffer AP. Las muestras fueron consideradas positivas cuando se observó una banda correspondiente al peso molecular de cada proteína recombinante.³⁰

INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.

Se partió de 2 ml de una suspensión de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa "Y", los parásitos fueron colectados por centrifugación a 3,000 rpm durante 3 minutos. Se aplicaron 3 lavados con 1 ml de PBS y la pastilla se resuspendió en 1 ml de paraformaldehído 2.5%, se colocaron 50 µl de esta suspensión en cubreobjetos y se dejaron fijar los parásitos a temperatura ambiente. Después de lavados con PBS, se bloquearon con suero fetal bovino (Gibco) al 10% en PBS durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Los sueros de cada individuo fueron incubados durante 2 hrs a 37° C en PBS a una dilución 1:32. Después de 6 lavados, se incubó con un segundo anticuerpo de cabra anti IgG, IgA e IgM humana acoplado a fluoresceína (marca Zymed) a una dilución 1:50 durante 1 hora a 37° C. Después de lavar, los cubreobjetos se incubaron con 1 µg/ml de yoduro de propidio para finalmente montar con medio para fluorescencias vectashield (Vector), las preparaciones se observaron en microscopio de fluorescencia.³⁰

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados recuperados de la ELISA como densidad óptica se graficaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.01. El valor de corte para positividad fue definido por la media de las unidades de densidad óptica más tres desviaciones estándar del título de anticuerpos en sueros de individuos no chagásicos. La sensibilidad se estimó como el número de muestras positivas detectadas con los antígenos recombinantes, sobre el número de muestras confirmadas por dos

pruebas inmunológicas (HAI e IFI) y se expresó como porcentaje. La especificidad se definió como el número de muestras detectadas como negativas con los antígenos recombinantes, sobre el número de muestras negativas confirmadas por IFI y HAI y se expresó como porcentaje.

III. RESULTADOS

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Los antígenos recombinantes de *T. cruzi* (MBP::TcHsp70, MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp) fueron producidos como proteínas de fusión a MBP; se indujo su expresión y se purificaron por cromatografía de afinidad a amilosa. Los eluidos de la purificación fueron sujetos a SDS-PAGE al 10% para evaluar la calidad de las proteínas; en todos los casos, las bandas predominantes en el análisis electroforético muestran los pesos moleculares correspondientes de las proteínas nativas más el extra de la proteína de fusión MBP, como se indica en el cuadro 1. Como controles se utilizó el extracto total de bacterias inducidas, junto con el correspondiente extracto no inducido (figura 1). La producción de las proteínas fue de 10-40 mg/litro de cultivo.

Cuadro 1. Características de los antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*.

Antígeno	Tamaño del inserto (p.b.)	Número de a.a.	Peso molecular proteína nativa (KDa)	Tamaño de la proteína de fusión (KDa)
MBP β -Gal α	1188	396	50.8	42.0
MBP::TcHsp70	2045	682	75.0	117.0
MBP::TcHsp70-Chp	350	116.7	12.8	54.8
MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp	1750	583	64.1	106.1

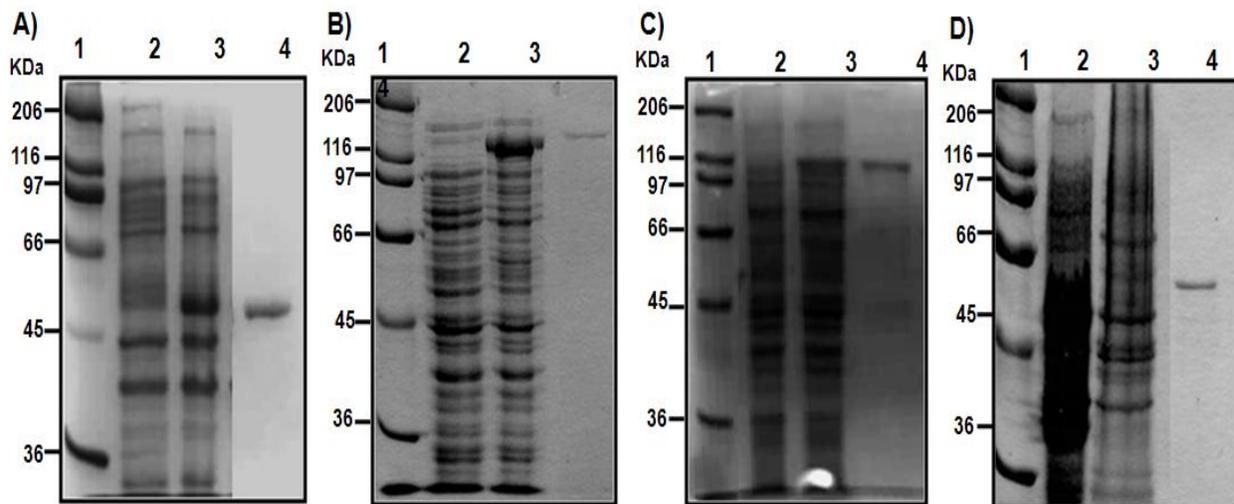


Figura 1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de *T. cruzi*. A) Proteína MBP (control), B) MBP::TcHsp70; C) MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp; D) MBP::TcHsp70-Chp. En los cuatro paneles, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, carril 2 extracto total de *E. coli* DH5 α sin inducir, carril 3 extracto total inducido, carril 4 proteína purificada.

Para valorar la calidad de las proteínas purificadas, se realizó un segundo análisis (Western blot). La inmunodetección se muestra en la figura 2. Se dirigió como primer anticuerpo un suero policlonal de ratón inmunizado con la proteína MBP ya que todas las proteínas están fusionadas a ella. Se observaron bandas de menores pesos moleculares.

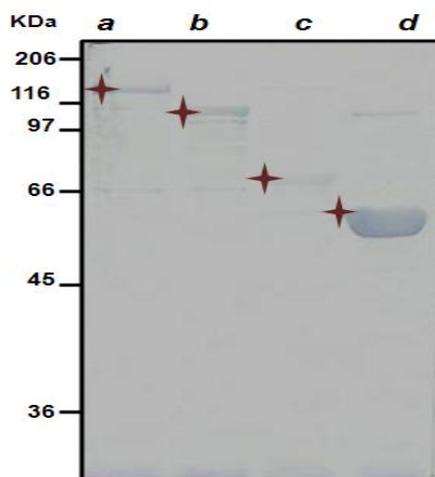


Figura 2. Análisis de Western blot para la inmunodetección de proteínas recombinantes de *T. cruzi* purificadas. Se utilizó suero policlonal de ratón anti-MBP. Carril a, proteína MBP::TcHsp70 purificada; Carril b, proteína MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp purificada; Carril c, proteína MBP::TcHsp70-Chp purificada; Carril d, proteína MBP purificada.

Serodiagnóstico por ELISA utilizando antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

La estandarización de los ensayos de ELISA con los diferentes antígenos recombinantes se realizó mediante curvas de titulación de Ag y Ac (dato no

mostrado) con 24 sueros de personas de zonas no endémicas para *T. cruzi* (controles negativos). Los valores de unidades de D.O. de cada suero se muestran en el cuadro 2. Se calcularon medidas de tendencia central y de dispersión con las que se definieron los valores de corte.

En la figura 3 se muestra la distribución de los controles negativos en la estandarización. Se obtuvieron datos superiores a los VC, probablemente son sueros con alto fondo genético. También se valoró la reactividad de la proteína de fusión MBP, en la figura 3 se muestra a todos los controles negativos por debajo del VC indicando que no hay reacción inespecífica.

Cuadro 2. Valores de densidad óptica (405 nm) obtenidos en la estandarización de ELISA con sueros de personas no chagásicas, con péptidos recombinantes como antígenos.

	MBP::TcHsp70- Chp	MBP::TcSPA:: TcHsp70-Chp	Mezcla Ag	MBP
SUERO	D.O. 405 nm	D.O. 405 nm	D.O. 405 nm	D.O. 405 nm
CN1	0.103	0.398	0.285	0.023
CN2	0.115	0.219	0.329	0.028
CN3	0.061	0.142	0.524	0.111
CN4	0.198	0.184	0.566	0.172
CN5	0.159	0.173	0.385	0.041
CN6	0.104	0.118	0.292	0.197
CN7	0.081	0.086	0.261	0.242
CN8	0.094	0.203	0.370	0.254
CN9	0.048	0.049	0.185	0.110
CN10	0.076	0.090	0.191	0.169
CN11	0.165	0.274	0.334	0.241
CN12	0.048	0.180	0.212	0.155
CN13	0.053	0.103	0.199	0.024
CN14	0.046	0.072	0.312	0.045
CN15	0.116	0.453	0.492	0.157
CN16	0.073	0.108	0.237	0.039
CN17	0.060	0.101	0.189	0.096
CN18	0.127	0.103	0.101	0.249
CN19	0.096	0.092	0.139	0.286
CN20	0.068	0.111	0.571	0.081
CN21	0.042	0.036	0.179	0.062
CN22	0.038	0.047	0.249	0.094
CN23	0.270	0.401	0.333	0.369
CN24	0.070	0.091	0.258	0.181
MEDIA (X)	0.096	0.160	0.299	0.143
DE	0.056	0.115	0.131	0.096
CV	15.0	18.0	11.8	13.9
VC= X+2DE			0.408	
VC= X+3DE	0.263	0.278		0.431

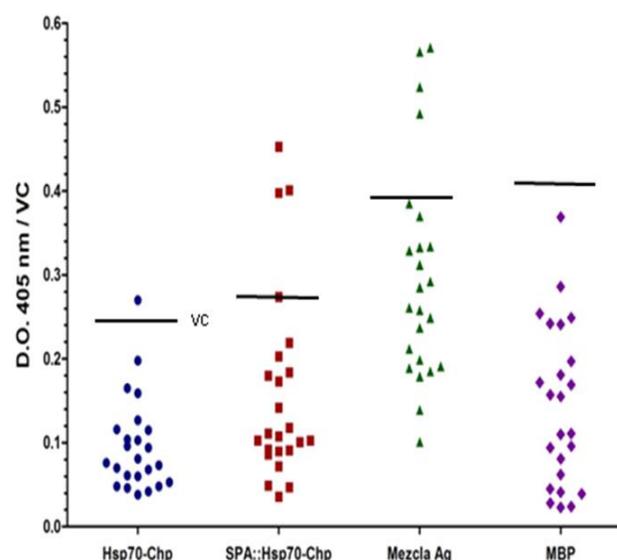


Figura 3. Distribución de controles negativos para Chagas evaluados por ELISA con antígenos recombinantes de *T. cruzi*. La línea horizontal representa el valor de corte para cada antígeno.

DE=desviación estándar, CV=coeficiente de variación, VC=valor de corte.

Una vez establecidas las condiciones para ELISA con los péptidos recombinantes, se realizó el tamizaje de 47 sueros de personas del estado de Guerrero, México. Este tamizaje se hizo por duplicado y los resultados fueron válidos siempre y cuando el coeficiente de variación entre placas fuese $\leq 15\%$. Doce sueros resultaron discordantes en las lecturas y se procesaron nuevamente para establecer el valor definitivo.

Cuando los sueros fueron analizados con el péptido MBP::TcHsp70-Chp (figura 4), 18 sueros (muestras 3, 12, 14, 18, 20, 21, 25, 27, 29, 33, 35, 36, 37, 40, 43, 45, 46, 47) fueron diagnosticados como chagásicos positivos y 29 chagásicos negativos.

El análisis con el péptido MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp (figura 5) estableció los mismos 18 sueros como positivos y cuatro más (muestras 10, 15, 28, 31) también positivos con este antígeno; por lo tanto, el número de sueros negativos se redujo de 29 a 25.

Se realizó una ELISA con una mezcla antigénica para reclutar el mayor porcentaje de muestras positivas. Se obtuvieron 15 sueros positivos y 32 sueros negativos (figura 6). De los 15 sueros positivos, 12 fueron positivos también con los antígenos independientes; en estas muestras, el diagnóstico por ELISA fue constante. De este último ensayo, solo dos muestras (38 y 44) se diagnosticaron como chagásicos positivos, reactividad que no fue detectada con los péptidos independientes. Hasta este momento la muestra 10 fue considerada como un falso positivo tanto para MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp como para la mezcla antigénica, ya que el diagnóstico de comparación fue negativo. Los sueros que en los dos ensayos de ELISA anteriores dieron reacción y en este ensayo no lo hicieron, fueron las muestras 3, 20, 29, 33, 40 y 43; este evento se analiza en la discusión.

En la figura 6 se representa la distribución de las muestras y el número de chagásicos positivos y negativos obtenidos en cada ELISA, indicando que el grado de positividad varió de acuerdo al antígeno recombinante utilizado. En el cuadro 3 se expresan las D.O. de cada muestra y el resultado obtenido con cada antígeno recombinante, además del resultado proporcionado por los laboratorios donadores de muestras.

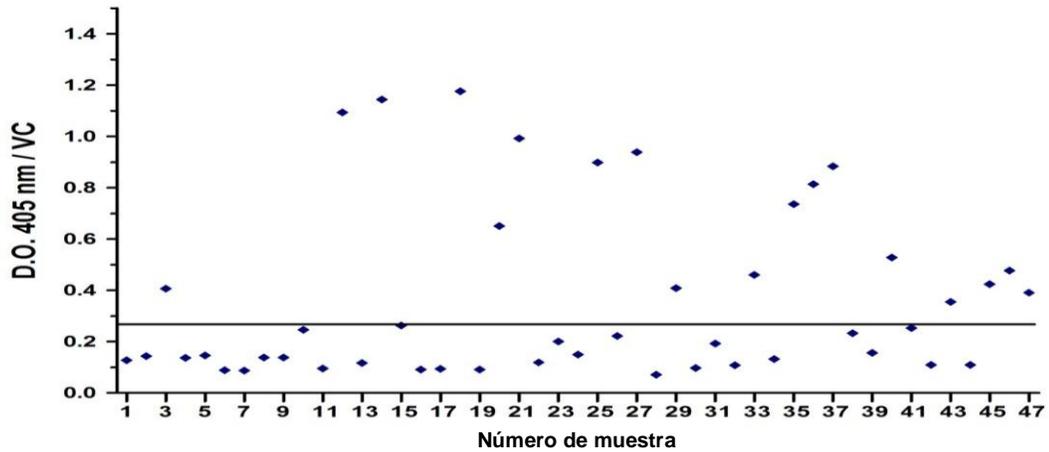


Figura 4. Detección de anticuerpos anti *T. cruzi* por ELISA y el péptido recombinante MBP::TcHsp70-Chp. Cada punto corresponde a una de las 47 muestras analizadas. La línea horizontal representa el valor de corte del ELISA que es de 0.263 U de D.O.

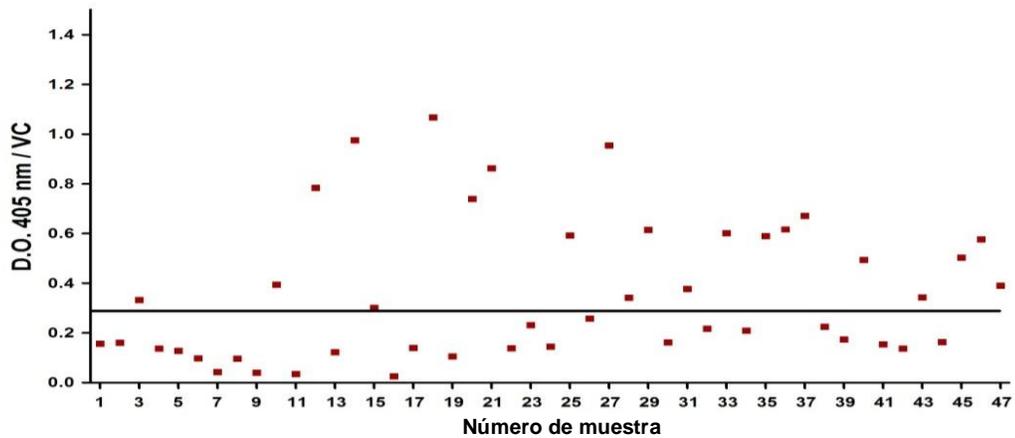


Figura 5. Detección de anticuerpos anti *T. cruzi* por ELISA y el péptido recombinante MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp. Cada punto corresponde a una de las 47 muestras analizadas. La línea horizontal representa el valor de corte del ELISA que es de 0.278 U de D.O.

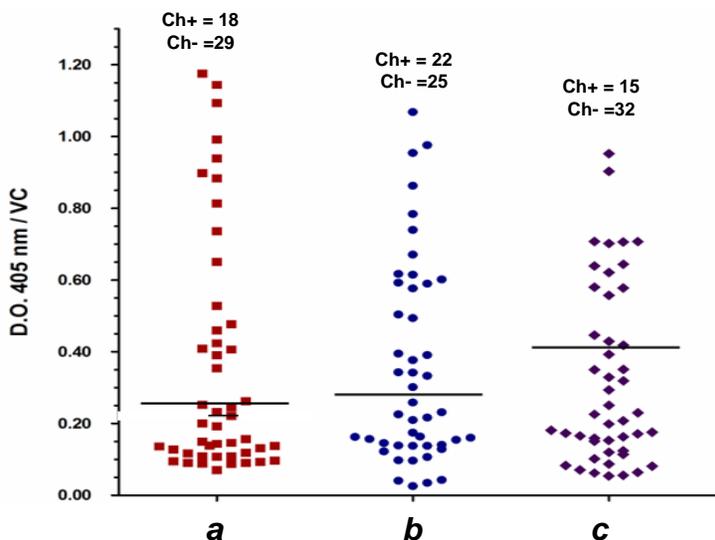


Figura 6. Reactividad de sueros del estado de Guerrero por ELISA con péptidos recombinantes de *T. cruzi*. La línea horizontal indica el valor de corte para cada péptido. Columna a muestra la reactividad de los sueros con el Ag MBP::TcHsp70-Chp; columna b reactividad para MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp; columna c reactividad para la mezcla antigénica. Ch+ representa el total de sueros positivos para cada ensayo, Ch- es el total de sueros negativos para *T. cruzi*.

Cuadro 3. Valores de densidad óptica e interpretación del análisis por ELISA con antígenos recombinantes de *T. cruzi* en sueros del estado de Guerrero, México.

		ELISA MBP::TcHsp70-Chp		ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp		ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp/Chp		Diagnóstico reportado
ID	SUERO	VC: 0.263 U de D.O.		VC: 0.278 U de D.O.		VC: 0.408 U de D.O.		
		D.O.405 nm	RESULTADO	D.O.405 nm	RESULTADO	D.O.405 nm	RESULTADO	
1	CO-01	0.128	-	0.157	-	0.251	-	-
2	CO-02	0.144	-	0.161	-	0.153	-	-
3	CO-03	0.407	+	0.333	+	0.199	-	+
4	CO-04	0.137	-	0.138	-	0.171	-	-
5	CO-05	0.147	-	0.129	-	0.173	-	-
6	CO-06	0.089	-	0.098	-	0.071	-	-
7	CO-07	0.088	-	0.043	-	0.062	-	-
8	CO-08	0.139	-	0.097	-	0.226	-	-
9	CO-09	0.138	-	0.041	-	0.064	-	-
10	CO-10	0.246	-	0.395	+	0.446	+	-
11	CO-11	0.095	-	0.035	-	0.124	-	-
12	OM-01	1.094	+	0.784	+	0.707	+	+
13	OM-02	0.117	-	0.123	-	0.151	-	-
14	OM-03	1.144	+	0.976	+	0.580	+	+
15	OM-04	0.263	-	0.302	+	0.159	-	-
16	OM-05	0.091	-	0.026	-	0.083	-	-
17	OM-06	0.094	-	0.141	-	0.087	-	-
18	OM-07	1.176	+	1.068	+	0.578	+	+
19	OM-08	0.091	-	0.107	-	0.056	-	-
20	OM-09	0.651	+	0.740	+	0.294	-	+
21	OM-10	0.992	+	0.863	+	0.621	+	+
22	OM-12	0.119	-	0.139	-	0.166	-	-
23	OM-13	0.201	-	0.232	-	0.351	-	-
24	OM-14	0.150	-	0.146	-	0.181	-	-
25	OM-16	0.898	+	0.593	+	0.702	+	+
26	OM-17	0.222	-	0.259	-	0.230	-	-
27	OM-18	0.939	+	0.954	+	0.418	+	+
28	LE-01	0.071	-	0.342	+	0.114	-	-
29	LE-02	0.409	+	0.615	+	0.350	-	+
30	LE-03	0.097	-	0.163	-	0.081	-	-
31	LE-04	0.193	-	0.377	+	0.163	-	-
32	LE-05	0.108	-	0.217	-	0.120	-	+
33	LE-06	0.460	+	0.602	+	0.393	-	+
34	LE-07	0.132	-	0.210	-	0.208	-	-
35	LE-08	0.736	+	0.590	+	0.644	+	+
36	LE-09	0.814	+	0.617	+	0.706	+	+
37	LE-10	0.884	+	0.671	+	0.707	+	+
38	LE-11	0.233	-	0.226	-	0.429	+	+
39	LE-12	0.157	-	0.175	-	0.102	-	-
40	LE-13	0.528	+	0.494	+	0.329	-	+
41	LE-14	0.253	-	0.155	-	0.176	-	+
42	LE-15	0.109	-	0.138	-	0.054	-	+
43	LE-16	0.355	+	0.343	+	0.319	-	+
44	LE-17	0.109	-	0.164	-	0.557	+	+
45	LE-18	0.424	+	0.504	+	0.903	+	+
46	LE-19	0.477	+	0.577	+	0.952	+	+
47	LE-20	0.391	+	0.391	+	0.639	+	+

Resultado +/- según el valor de corte

Sensibilidad y especificidad de los antígenos recombinantes por ELISA.

Para acceder a la utilidad diagnóstica de estos antígenos recombinantes se calculó su sensibilidad y especificidad en la prueba de ELISA con base al diagnóstico proporcionado por los laboratorios donadores de las muestras de estudio y el resultado obtenido en el diagnóstico interno (cuadro 4). El análisis global de los

sueros de Guerrero mostró que la menor positividad fue presentada por la mezcla antigénica (74.1%), mientras que para los antígenos independientes la positividad fue de 82.1% para ambos. La especificidad de los antígenos recombinantes fue menor para el antígeno MBP::TcSPA:Tc:Hsp70-Chp (85.7%), y el mayor grado de discriminación de individuos sanos se logró con el antígeno MBP::TcHsp70-Chp logrando una especificidad de 100%; por tal motivo, este último péptido brinda mayor certeza para aquellos sujetos con diagnóstico positivo realmente padezcan la enfermedad (VPP de 0.100), mientras que los dos antígenos ofrecen en un 82.7% la certeza de que aquellos sujetos sanos den un diagnóstico negativo en la prueba (VPP de 0.827).

Cuadro 4. Sensibilidad y especificidad diagnóstica (%) de ELISA con péptidos recombinantes de *T. cruzi* y sueros del estado de Guerrero, México.

FUENTE DEL SUERO	TOTAL	MBP::TcHsp70-CHP N° de casos ^a		MBP::TcSPA::TcHsp70- Chp N° de casos ^b		MBP::TcSPA::TcHsp70- Chp/MBP::Hsp70-Chp N° de casos ^c	
		Anti- <i>T. cruzi</i> negativos	Anti- <i>T. cruzi</i> positivos	Anti- <i>T. cruzi</i> negativos	Anti- <i>T. cruzi</i> positivos	Anti- <i>T. cruzi</i> negativos	Anti- <i>T. cruzi</i> positivos
Individuos sanos	24	24	0	20	4	23	1
Individuos chagásicos	23	5	18 (82.1%)	5	18 (82.1%)	8	15 (74.1%)
TOTAL	47	29	18	25	22	31	16

La sensibilidad se muestra entre paréntesis. Especificidad relativa 100% ^a, 85.7% ^b, 96.0% ^c

VPP 0.100 ^a, 0.851 ^b, 0.958 ^c; VPN 0.827 ^a, 0.827 ^b, 0.750 ^c

Serodiagnóstico por Western blot utilizando antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

Para confirmar la positividad de las muestras evaluadas por el método de ELISA, se realizaron ensayos de WB a todos los sueros, utilizando como antígenos las proteínas recombinantes purificadas MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp. Primero se retaron las tiras transferidas con sueros de personas sanas y de personas infectadas (controles positivos y negativo respectivamente) para observar el reconocimiento específico. En la figura 7A se observa el reconocimiento de la proteína MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp (figura 7B) por sueros chagásicos reflejando el peso molecular esperado. Los sueros negativos no reaccionaron con los antígenos

recombinantes. Como control de reacción positiva se utilizó suero policlonal de ratón *anti-TcHsp70*, que permitió reconocer la fracción chaperona de las dos proteínas recombinantes; el suero preinmune de ratón (control negativo) no mostró reacción con el material transferido. Se realizó un ensayo para observar la interferencia que pudiera ocasionar la proteína de fusión MBP al interactuar con sueros humanos (dato no mostrado), no hubo reconocimiento de la proteína de fusión.

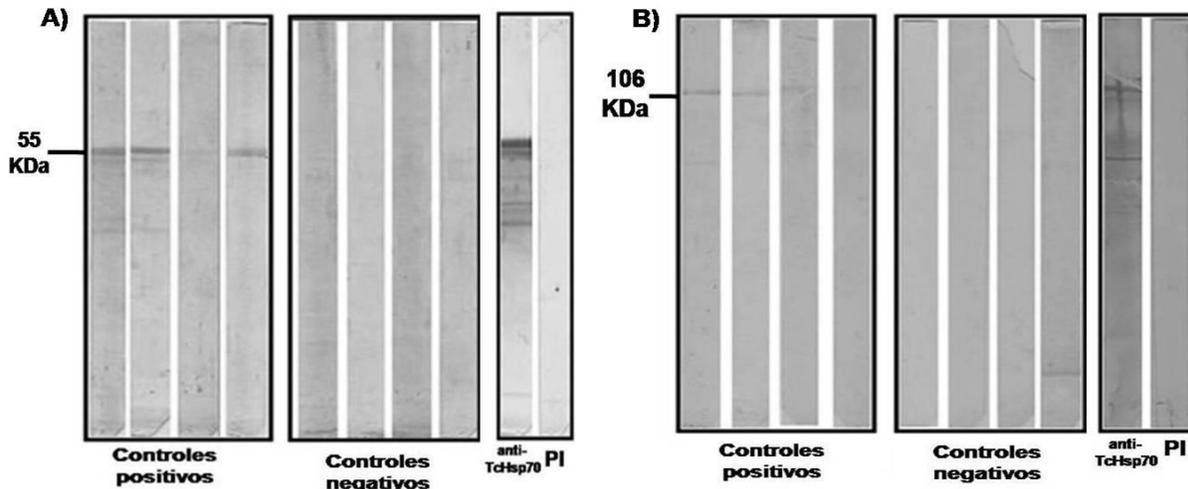


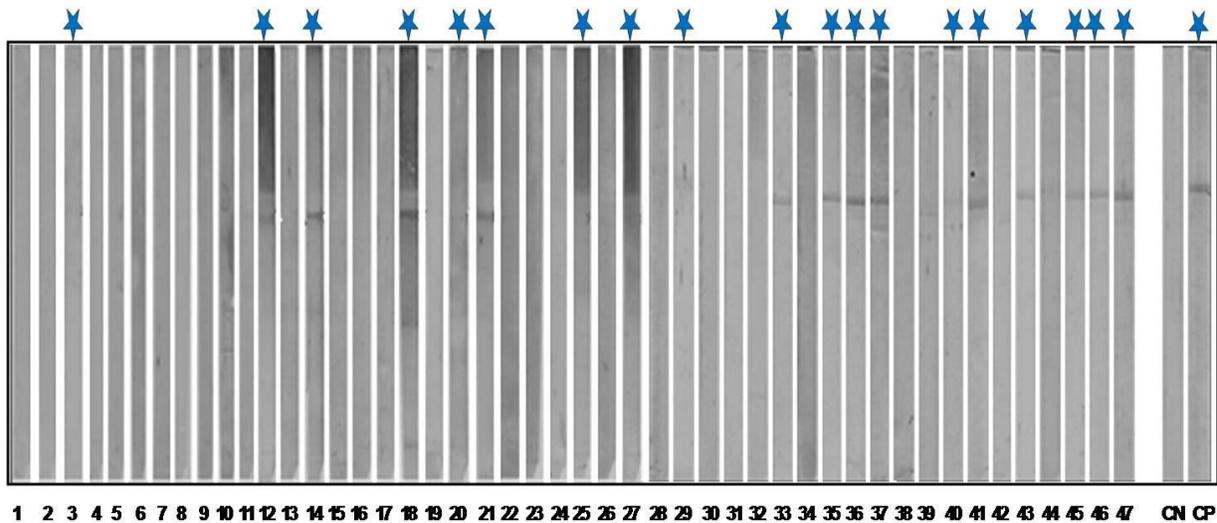
Figura 7. Análisis de Western blot de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* con sueros positivos y negativos para Chagas. A) Inmunodetección de la proteína MBP::TcHsp70-Chp, B) Inmunodetección de la proteína MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp. Controles negativos: sueros de personas sanas; Controles positivos: sueros de pacientes Chagásicos confirmados, α -Hsp70 suero de ratón inmunizado con la proteína MBP::TcHsp70, PI es suero pre inmune de ratón.

Posteriormente, se realizó la inmunodetección de anticuerpos anti *T. cruzi* en sueros de personas del estado de Guerrero. El método de WB es un método inmunológico altamente específico para el reconocimiento de proteínas de interés.

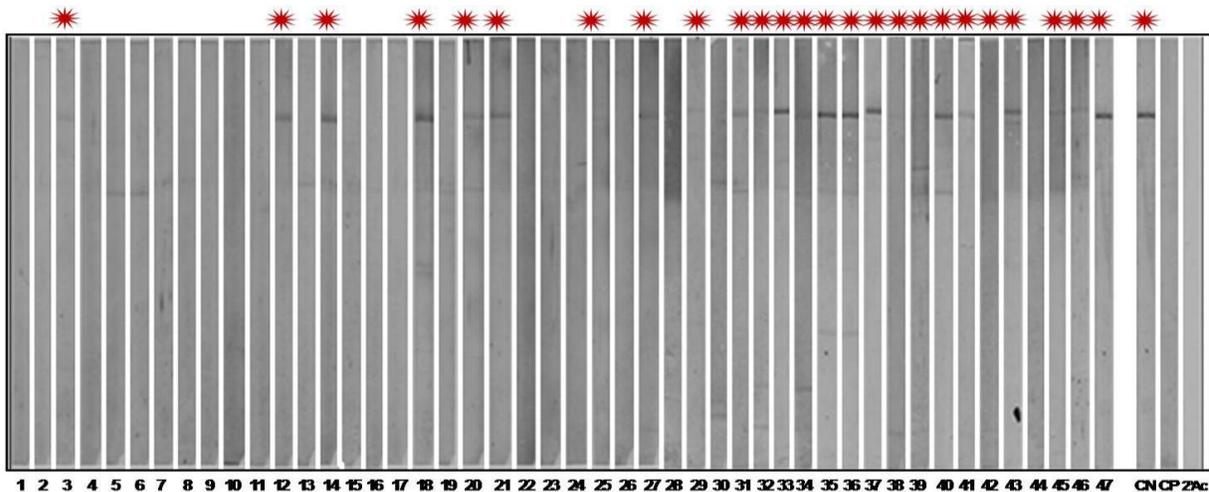
La interacción de estos sueros con el péptido MBP::TcHsp70-Chp (figura 8) mostró un patrón de reacción similar al obtenido en ELISA con el mismo antígeno, ya que los mismos 18 sueros positivos en ELISA fueron positivos en WB, sin embargo un suero más (muestra 41) fue detectado como positivo por esta última prueba.

El análisis con el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp (figura 9) mostró concordancia con ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp en 19 muestras (3, 12, 14, 18, 20, 21, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 36, 37, 40, 43, 45, 46, 47), además se identificaron como positivos a *T. cruzi* a 6 sueros más (muestras 32, 34, 38, 39, 41, 42). Interesantemente, en este ensayo de WB se estableció como Chagásicos negativos a los sueros 10, 15 y 28, estas 3 muestras solo fueron diagnosticadas como positivas

por ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp pero no por ELISA y WB MBP::TcHsp70-Chp, lo que nos encaminó a deducir que ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp establece como falsos positivos a estos 3 sueros.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 CN CP
Figura 8. Inmunodetección en fase sólida de la proteína MBP::TcHsp70-Chp y sueros del estado de Guerrero. CP es suero humano chagásico positivo, CN es suero humano chagásico negativo. La estrella en la parte superior indica los sueros positivos para la reacción.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 CN CP 2Ac
Fig. 9. Inmunodetección en fase sólida de la proteína MBP::TcSPA::TcHsp70-chp y sueros del estado de Guerrero. CP es suero humano chagásico positivo, CN es suero humano chagásico negativo; se incluye control para 2°Ac. La estrella en la parte superior indica los sueros positivos para la reacción.

Sensibilidad y especificidad de los antígenos recombinantes por Western blot.

Se determinó la sensibilidad y especificidad de los péptidos recombinantes por el método de WB (cuadro 5) utilizando como referencia el diagnóstico proporcionado por las instituciones donadoras de los sueros problema. La mayor positividad fue presentada por el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp con un 95.8% de

sensibilidad, sin embargo, la mayor especificidad fue lograda por el péptido MBP::TcHsp70-Chp (100%).

Cuadro 5. Sensibilidad y especificidad diagnóstica relativa (%) del ensayo de Western blot con péptidos recombinantes de *T. cruzi* y sueros del estado de Guerrero, México.

	TOTAL	MBP::Hsp70-chp ^a		MBP::SPA::Hsp70-chp ^b	
		SUEROS NO REACTIVOS	SUEROS REACTIVOS	SUEROS NO REACTIVOS	SUEROS REACTIVOS
INDIVIDUOS SANOS	24	24	0	21	3
INDIVIDUOS CHAGÁSICOS	23	4	19 (85.1%)	1	22 (95.8%)
TOTAL	47	28	19	22	25

La sensibilidad se muestra entre paréntesis. ^a Especificidad Dx 100.0%, VPN 0.857, VPP 0.100, ^b Especificidad Dx 88.8%, VPN 0.96, VPP 0.884.

Detección de anti-*T. cruzi* en sueros del estado de Guerrero por Inmunofluorescencia indirecta.

Para obtener el diagnóstico definitivo, tanto las muestras positivas como las muestras discordantes fueron sometidas a un tercer análisis inmunológico mediante IFI. Las inmunofluorescencias fueron realizadas incluyendo un pool de sueros positivos y sueros negativos para *T. cruzi* como controles. Los sueros problema fueron procesados en las mismas condiciones como se establece en materiales y métodos. El grado de fluorescencia fue establecido como +/+++ comparando con los controles positivos (figura 10).

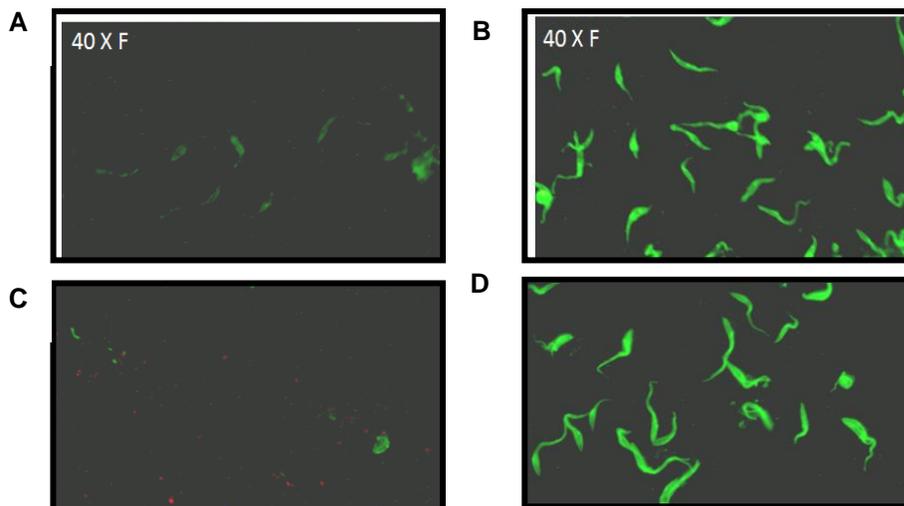


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de sueros del estado de Guerrero. A. Suero de persona sana como control negativo, B. pool de sueros chagásicos, C. Suero de Guerrero 15, D. suero de Guerrero 25. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de Epifluorescencia en objetivo 40X.

Una vez analizadas las muestras por 3 métodos inmunológicos para establecer un diagnóstico para la infección por *T. cruzi* se siguieron las recomendaciones de la OMS quien indica que para diagnosticar como positivo a la infección, un suero debe dar reacción en 2 de 3 pruebas inmunológicas diferentes. El conjunto de resultados de las pruebas se muestra en el cuadro 6, además se incluye el diagnóstico interno obtenido y el diagnóstico proporcionado por las instituciones de referencia.

De las 47 muestras analizadas, 23 fueron consideradas como positivas por HAI e IFI, de estas solo 19 fueron positivas en las 3 pruebas inmunológicas con los dos antígenos recombinantes (cuadro 6), las 4 muestras restantes se comportaron de la siguiente manera: los sueros 32, 38 y 42 solo fueron diagnosticadas como positivas con el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp en 2 de las 3 pruebas, mientras que con el antígeno MBP::TcHsp70-Chp en 2 de las 3 pruebas fueron establecidas como negativas por lo que no pudo establecerse un diagnóstico definitivo. El suero 44 resulto negativo en todos los ensayos inmunológicos y dada la mayor sensibilidad y especificidad que alcanzan ELISA y WB en comparación con HAI e IFI, se establece que esta muestra fue diagnosticada falsamente positiva por los laboratorios de referencia.

Con respecto a los sueros con diagnóstico negativo previo (n=24), 21 sueros fueron confirmados negativos sin mayor problema ya que no dieron reacción con ningún antígeno en las 3 pruebas (cuadro 6). Las muestras 31, 34 y 39 fueron diagnosticadas como negativas al utilizar MBP::TcHsp70-Chp, sin embargo mostraron reacción en WB con MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp e IFI y el diagnóstico definitivo no pudo establecerse.

Cuadro 6. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* por tres pruebas inmunológicas con péptidos recombinantes y el diagnóstico reportado por los laboratorios de referencia.

ID	SUERO	ELISA Hsp70-Chp	ELISA SPA::Hsp70-Chp	WB Hsp70-Chp	WB SPA::Hsp70-Chp	IFI (ET de EPI)	DX INTERNO	DX REPORTADO
1	CO-01	-	-	-	-	ND	-	-
2	CO-02	-	-	-	-	ND	-	-
4	CO-04	-	-	-	-	ND	-	-
5	CO-05	-	-	-	-	-	-	-
6	CO-06	-	-	-	-	ND	-	-
7	CO-07	-	-	-	-	ND	-	-
8	CO-08	-	-	-	-	ND	-	-
9	CO-09	-	-	-	-	ND	-	-
10	CO-10	-	+	-	-	-	-	-
11	CO-11	-	-	-	-	ND	-	-
13	OM-02	-	-	-	-	-	-	-
15	OM-04	-	+	-	-	-	-	-
16	OM-05	-	-	-	-	ND	-	-
17	OM-06	-	-	-	-	ND	-	-
19	OM-08	-	-	-	-	ND	-	-
22	OM-12	-	-	-	-	ND	-	-
23	OM-13	-	-	-	-	-	-	-
24	OM-14	-	-	-	-	ND	-	-
26	OM-17	-	-	-	-	-	-	-
28	LE-01	-	+	-	-	-	-	-
30	LE-03	-	-	-	-	ND	-	-
31	LE-04	-	+	-	++	-	-/+	-
34	LE-07	-	-	-	++	++	-/+	-
39	LE-12	-	-	-	+	++	-/+	-
3	CO-03	+	+	+	+	+	+	+
12	OM-01	+	+	++	+++	+	+	+
14	OM-03	+	+	+++	+++	++	+	+
18	OM-07	+	+	+++	+++	ND	+	+
20	OM-09	+	+	+	++	+++	+	+
21	OM-10	+	+	+++	++	+++	+	+
25	OM-16	+	+	+	+	+++	+	+
27	OM-18	+	+	+	+	++	+	+
29	LE-02	+	+	+	+	+	+	+
32	LE-05	-	-	-	+	+	-/+	+
33	LE-06	+	+	++	++	++	+	+
35	LE-08	+	+	+++	+++	+	+	+
36	LE-09	+	+	+++	+++	+	+	+
37	LE-10	+	+	+++	+++	++	+	+
38	LE-11	-	-	-	+	++	-/+	+
40	LE-13	+	+	+	+++	++	+	+
41	LE-14	-	-	++	++	+	+	+
42	LE-15	-	-	-	+	+	-/+	+
43	LE-16	+	+	++	++	+	+	+
44	LE-17	-	-	-	-	-	-	+
45	LE-18	+	+	++	++	+	+	+
46	LE-19	+	+	++	+	++	+	+
47	LE-20	+	+	+	++	+	+	+

En ELISA + o - según el valor de corte, en WB +/+++ comparado con controles positivos; en IFI +/+++ comparado con controles positivos, ND: No determinado, -/+ negativo para *T. cruzi* con el péptido MBP::TcHsp70-Chp pero positivo con el péptido MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp.

La propuesta de este trabajo fue optimizar antígenos recombinantes que faciliten el diagnóstico con elevada sensibilidad y especificidad pero sobre todo con factibilidad metodológica. Para esto se analizó la capacidad diagnóstica de los antígenos recombinantes de *T. cruzi* utilizando paneles de diagnóstico con las 3 pruebas inmunológicas pero solo con un péptido (cuadro 7). El diagnóstico con el péptido MBP::TcHsp70-Chp ofrece una elevada especificidad (100%) pero mediana sensibilidad (85.1%), el diagnóstico con el péptido MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp ofrece más sensibilidad (95.8%), pero la especificidad aportada es de 88.8%. Conjuntando la aportación de ELISA y WB con los 2 péptidos e IFI, se logró una sensibilidad elevada (96%) y una especificidad de 92%.

Cuadro 7. Sensibilidad y especificidad relativa (%) de los péptidos recombinantes por panel diagnóstico.

	PANEL DX 1 *	PANEL DX 2 ‡	PANEL DX 3 §
SENSIBILIDAD (%)	85.1	95.8	96.0
ESPECIFICIDAD (%)	100	88.8	92.3
* Diagnóstico por ELISA TcHsp70-Chp, WB TcHsp70-Chp e IFI con extracto total de epimastigote.			
‡ Diagnóstico por ELISA TcSPA::TcHsp70-Chp, WB TcSPA::TcHsp70-Chp e IFI con extracto total de epimastigote.			
§ Diagnóstico por ELISA con ambos antígenos independientes, WB con ambos antígenos independientes e IFI con extracto total de epimastigote.			

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La infección por *T. cruzi* no es autolimitante y todo individuo infectado representa un reservorio potencial del parásito. De esta manera, los movimientos migratorios representan un riesgo de diseminación importante y justifica, junto con la transmisión reportada por material anatómico contaminado la inversión en el intento de obtener un método de diagnóstico altamente sensible, específico y factible.

Los métodos serológicos son ampliamente utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, principalmente ELISA, IFI y HAI, sin embargo, están basados en extractos completos de *T. cruzi* y han mostrado pérdidas en la especificidad siendo esto fuente de variación en los resultados proporcionados.^{9, 23} Para resolver este problema, en este trabajo evaluamos la eficiencia diagnóstica de dos antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

La proteína TcHsp70 cuenta con repeticiones aminoacídicas altamente conservadas evolutivamente entre muchas especies incluyendo el hombre con quien comparte una similitud del 73% de los aminoácidos. Engman *et al.*, 1990²⁹, demostraron que esta proteína cuenta con una secuencia carboxilo terminal específica del parásito y que no reacciona cruzadamente con otros organismos filogenéticamente relacionados, atribuyendo aplicaciones diagnósticas a la proteína. En México, se ha evaluado el poder diagnóstico de la proteína recombinante MBP::TcHsp70.³⁰ Con el afán de optimizar este antígeno, en este estudio, estandarizamos una nueva ELISA y WB para detectar anticuerpos IgM, IgA e IgG contra la fracción chaperona (fracción C-terminal específica) de la proteína TcHsp70 y el dominio A de la proteína SP (proteína de superficie) de *T. cruzi* previamente reportada con aplicaciones diagnósticas por Arce *et al.*, 2005.³¹

Inicialmente se planteó el objetivo de evaluar la presencia de Ac contra la proteína completa MBP::TcHsp70 para comparar su poder diagnóstico con la fracción C-terminal específica. Siguiendo el protocolo de Ramos *et al.*, 2006³⁰, se purificó la proteína recombinante, la banda de la proteína se observó ligeramente por encima del peso molecular calculado ya que este es aproximado (figura 1B). Por problemas para discriminar entre Chagásicos positivos y negativos, no se continuó

con el estudio de esta proteína. Estas dificultades pudieron deberse a contaminación de la proteína purificada y/o posible inestabilidad de la misma pues se observaron productos de degradación (figura 2).

Las dos proteínas estudiadas en este trabajo (MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp) se expresaron en grandes cantidades en el sistema de expresión empleado. Al valorar la pureza de las proteínas se observaron algunas bandas de menor peso molecular (figura 1 y 2), posiblemente productos de degradación.

Las muestras analizadas fueron diagnosticadas por métodos inmunológicos menos confiables (IFI y HAI); estos ensayos son estandarizados en el laboratorio con equipo convencional y se ha demostrado reacción cruzada con *L. mexicana* y *T. rangelli* originada al utilizar extractos completos de *T. cruzi*, además de que la cepa utilizada también suele proporcionar variabilidad. Actualmente no se cuenta con un estándar de oro para el diagnóstico. Por este motivo solo se obtuvo una relativa sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Primero se evaluó el reconocimiento de sujetos chagásico positivos y chagásicos negativos del estado de Guerrero mediante ELISA por su alta sensibilidad (cuadro 1). La sensibilidad lograda con el antígeno MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp fue limitada (82.1% para ambas); la especificidad lograda por ELISA MBP::TcHsp70-Chp fue la esperada de 100%, por ser este dominio específico para *T. cruzi*. Umezawa *et al.*, 1999¹⁶ evaluó la sensibilidad y especificidad por ELISA de 6 antígenos recombinantes compuestos de repeticiones aminoácidas en tándem, logrando una especificidad de 96.2 a 99.6% y una sensibilidad de 79 a 100%. Meira *et al.*, 2002³⁷ valoró la utilidad diagnóstica de la proteína recombinante reguladora del complemento de *T. cruzi*, y obtuvo 100% de sensibilidad y especificidad comparada con la prueba de lisis mediada por el complemento.

Algunos autores proponen que la mezcla de antígenos recombinantes podría ser capaz de detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en todas las muestras de sueros chagásicos; Umezawa *et al.*, 2004²⁰ realizó ensayos de ELISA con 3 antígenos recombinantes (JL8, MAP y TcPo), obtuvo elevada sensibilidad de 99.4% y una

especificidad de 99.3%, cuando combinó los antígenos JL8 y MAP. En este estudio, el diagnóstico multiantigénico alcanzó una sensibilidad de 74.1%; ya que 6 de los sueros (muestras 3, 20, 29, 33, 40, 43) que dieron reacción con los péptidos independientes disminuyeron su D.O., diagnosticándolos como chagásicos negativos (cuadro 3). Una explicación probable a esto es el hecho de que en un ensayo de ELISA los antígenos son utilizados en condiciones nativas, y en solución cada proteína conserva funciones nativas; donde cambios conformacionales pueden suceder y de esta manera ocultar o exponer epitopes de reconocimiento por los anticuerpos en sujetos chagásicos. La mezcla antigénica solo permitió identificar como chagásicos positivos dos sueros (muestras 38 y 44) que con los antígenos independientes no se detectaron, probablemente por que estas muestras tienen títulos bajos para los péptidos individuales. Las muestras 10, 15, 28, 31 fueron diagnosticados falsamente como positivos por ELISA MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp y el análisis con la mezcla antigénica permitió confirmar como negativos a 3 de ellos. Con el interés de mejorar la aportación de una mezcla antigénica para el diagnóstico por ELISA, y dado que la especificidad aportada es considerada como buena (96%), se sugiere optimizar las concentraciones de uno u otro antígeno, de tal manera que se conserve la especificidad, pero se aumente la sensibilidad.

En la literatura se ha reportado la especificidad diagnóstica brindada por ensayos de WB y aunque esta no es una prueba de rutina, como prueba secundaria es excelente. En este ensayo, se lograron detectar 6 muestras más como positivas con el péptido MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp mismos que no fueron detectados por ELISA (figura 9); en este estudio se alcanzó una especificidad del 100% con MBP::TcHsp70-Chp y una sensibilidad de 95.8% con el péptido MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp (cuadro 5); por lo tanto, cuando 2 ó más antígenos son empleados se puede distinguir mejor entre reactivos y no reactivos.

Con respecto a la IFI, es de interés mencionar aquellos sueros con reacción positiva y cuyo diagnóstico proporcionado fue negativo (muestras 21, 34, 39). Estas muestras tuvieron positividad de +++, ++ y ++ respectivamente; el alto grado de fluorescencia pudo deberse a impurezas en la preparación o por una reacción cruzada de inmunoglobulinas IgM inespecíficas debido a factores reumatoides. Un

falso negativo para IFI fue la muestra 44, esta falta de reacción pudo deberse a baja concentración del conjugado. Todas estas variaciones dependen enormemente de la extrema subjetividad del ensayo, pues las variaciones diagnósticas suelen ocurrir entre diversos investigadores.

Una vez obtenido el diagnóstico con los antígenos recombinantes de interés, y comparando con el diagnóstico proporcionado por los donadores de las muestras, se observó que varios sueros no fueron concordantes con lo reportado, ya que con los antígenos recombinantes el suero 44 fue establecido como falso positivo (cuadro 6); este resultado demuestra la poca especificidad de métodos como HAI e IFI en el diagnóstico, reportando individuos infectados que en realidad no lo están.

Seis sueros arrojaron resultados dudosos (muestras 31, 32, 34, 38, 39, 42) ya que con un antígeno son establecidos como chagásicos positivos (MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp), pero con el otro (MBP::TcHsp70-Chp) son clasificados como chagásicos negativos (cuadro 6). Sin embargo, las muestras se establecieron como chagásicos positivos por haber dado reacción en WB MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp, prueba que aporta la especificidad e IFI, prueba q brinda la sensibilidad. La ausencia de reacción en la prueba de ELISA con ambos péptidos pudo deberse a bajo título de Ac para el reconocimiento de moléculas nativas.

Una rutina para aportar mas certeza al diagnóstico puede ser aplicada utilizando primero el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp para detectar el mayor número de positivos, y posteriormente utilizar el antígeno MBP::TcHsp70-Chp para descartar inespecificidad. Además, diluciones menores del suero problema para los ensayos podría aclarar el diagnóstico interno. Otros factores relacionados con el huésped como “background” genético o historia de exposición pueden ser responsables de la variabilidad de reconocimiento de los antígenos recombinantes.

De acuerdo con la historia clínica de los donadores, el paciente número 3 recibió tratamiento antichagásico (Benzonidazol 100mg durante 30 días) después del diagnóstico informado, el título de las diluciones para HAI e IFI fue de 1:128. En este estudio se logró detectar aún la presencia de anticuerpos, y aunque el tratamiento no erradica por completo al parásito, con estos antígenos podría evaluarse también la respuesta a los antiparasitarios.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica de nuestros antígenos es elevada cuando se analiza un suero con ELISA y WB con ambos péptidos e IFI. Guzmán *et al.*, 1996³³ observaron una sensibilidad de 89.3% y una especificidad de 98.5% utilizando el péptido completo MBP::TcHsp70; en este ensayo utilizando solo la fracción chaperona se obtuvo una sensibilidad de 85.1% y la especificidad del 100% obtenida con el panel diagnóstico N°1 (cuadro 7), se logró aumentar la especificidad pero la sensibilidad disminuyó un poco. Estos resultados son similares a los obtenidos por Marcipar *et al.*, 2005²³ quienes evaluaron la aplicación diagnóstica de la fracción C-terminal de la proteína calflagina reportando una sensibilidad relativamente baja (70%) pero una especificidad del 100%. Para la validación de una prueba diagnóstica es indispensable considerar la factibilidad de la misma, en nuestro trabajo, para alcanzar una sensibilidad de 96% y una especificidad de 92% se requirió de 5 ensayos inmunológicos.

En conclusión, las pruebas de ELISA y WB con las proteínas recombinantes MBP::TcHsp70-Chp y MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp son ensayos altamente sensibles y específicos para la búsqueda de anticuerpos en suero contra *T. cruzi* de sujetos del estado de Guerrero, México. Proponemos una rutina diagnóstica de dos pasos, ya que como se esperaba, la fracción chaperona de la proteína TcHsp70 brinda 100% de especificidad, sin embargo no es lo suficientemente sensible para proponerla como único criterio para el diagnóstico. La aportación en términos de sensibilidad que brinda el antígeno MBP::TcSPA::TcHsp70-Chp complementa la rutina diagnóstica. Esta metodología es una herramienta útil para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el periodo agudo, indeterminado y crónico.

Perspectivas: Con el interés de mejorar el diagnóstico de la tripanosomiasis americana, sugerimos una evaluación posterior de los antígenos con un panel mayor de sueros y que estos sean diagnosticados previamente con metodologías de mayor sensibilidad y especificidad en el mercado, para validar la rutina diagnóstica; además se sugiere valorar la reacción de los antígenos recombinantes con sueros de individuos con otras parasitosis endémicas del área como Leishmaniasis y analizar posible reacción cruzada.

V. REFERENCIAS

- 1 Salazar-Schettino P M-LA, Bucio-Torres M, Cabrera-Bravo M, Guevara-Gómez Y, Rojas-Wastavino G. Manual de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Secretaria de Salud 2002:46.
- 2 Guzman-Bracho C G-GL, Floriani-Verdugo J. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. 1998;4(2):94-99.
- 3 Dias J SA, Schofield J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002 Jul;97(5):603-612.
- 4 Sierra-Johnson J O-MA, Monteon-Padilla V, Reyes P, Vallejo M. Epidemiological and clinical outlook of chronic Chagas' heart disease in Mexico. Revista de saude publica. 2005 Oct;39(5):754-760.
- 5 Cruz-Reyes A P-LJ. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-a review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006 Jun;101(4):345-354.
- 6 Souza WD. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current pharmaceutical design. 2002;8(4):269-285.
- 7 Hernandez-Becerril N MM, Ballinas-Verdugo M, Garza-Murillo V, Manilla-Toquero E, Lopez R, Trevethan S, Cardenas M, Reyes A, Hirayama K, Monteon V. Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico City. Anti-*Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005 Apr;100(2):111-116.
- 8 Segura E. I. Mitos y realidades de la utilización de sangre segura para las transfusiones. *Simposium de la Enfermedad de Chagas*. MÉXICO D.F: Gaceta Médica Mexicana 2003:S75-S77.
- 9 Caballero Z O-SE, Waldelania-Marques P, 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*. Clinical And Vaccine Immunology. 2007;14(8):1045–1049.
- 10 Berrizbeitia M NM, Gottschalk M, Ache A, Vasquez F, Lacouture S, Medina M, Ward B. Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (Epimastigotes, Amastigotes, and Trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. Journal of clinical microbiology. 2004 Apr;42(4):1766-1769.
- 11 Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Ache A, Lacouture S, et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. Journal of clinical microbiology. 2006 Feb;44(2):291-296.
- 12 Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, de Aguilar V, Gonzalez A, et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. Journal of clinical microbiology. 2005 Oct;43(10):5065-5068.

- 13 Bhatia V, Sinha M, Luxon B, Garg N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* sequence database for identification of potential vaccine candidates by in silico and in vitro screening. *Infection and immunity*. 2004 Nov;72(11):6245-6254.
- 14 Cotrim C, Paranhos S, Mortara A, Wanderley J, Rassi A, Camargo E, et al. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *Journal of clinical microbiology*. 1990 Mar;28(3):519-524.
- 15 Lesenechal M, Becquart L, Lacoux X, Ladaviere L, Baida RC, Paranhos-Baccala G, et al. Mapping of B-cell epitopes in a *Trypanosoma cruzi* immunodominant antigen expressed in natural infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005 Feb;12(2):329-333.
- 16 Umezawa S, Bastos F, Camargo E, Yamauchi M, Santos R, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of clinical microbiology*. 1999 May;37(5):1554-1560.
- 17 Saez-Alquezar A, Sabino C, Salles N, Chamone F, Hulstaert F, Pottel H, et al. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Feb;38(2):851-854.
- 18 Ferreira W, Belem R, Lemos A, Reed G, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *Journal of clinical microbiology*. 2001 Dec;39(12):4390-4395.
- 19 Gomes M, Pereira R, Nakazawa M, Rosa S, Barros D, Ferreira G, et al. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001 May;96(4):497-501.
- 20 Umezawa S, Luquetti O, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, 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*. 2004 Jan;42(1):449-452.
- 21 Aguirre S, Silber M, Brito E, Ribone E, Lagier M, Marcipar S. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Oct;44(10):3768-3774.
- 22 Bannai H, Sakurai T, Inoue N, Sugimoto C, Igarashi I. Cloning and expression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003 Sep;10(5):926-933.
- 23 Marcipar S, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito E, Winter M, et al. Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Nov;43(11):5498-5503.
- 24 Pereira-Chioccola L, Fragata-Filho A, Levy M, Rodrigues M, Schenkman S. Enzyme-linked immunoassay using recombinant trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003 Sep;10(5):826-830.

- 25 Olson L, Nadeau C, Sullivan A, Winqvist G, Donelson E, Walsh T, et al. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. The Journal of biological chemistry. 1994 Feb 4;269(5):3868-3874.
- 26 Requena J LM, Jimenez A, de la Torre J, Carlos Alonso. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Research. 1988;16(4):1393-1404.
- 27 Krautz M, Peterson D, Godsel M, Krettli U, Engman M. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1998 Feb;58(2):137-143.
- 28 Giambiagi-deMarval M, Souto-Padron T, Rondinelli E. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. Experimental parasitology. 1996 Aug;83(3):335-345.
- 29 Engman M, Dragon A, Donelson E. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1990 May 15;144(10):3987-3991.
- 30 Ramos-Ligonio A R-SM, Gonzalez-Hernández J, Rosales-Encina J. Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Salud Pública de México. 2006;48(1):13-22.
- 31 Arce-Foseca. M. Respuesta inmune inducida por inmunización con DNA que codifica para un antígeno de amastigote de *Trypanosoma cruzi*. México D.F.: CINVESTAV-IPN; 2005.
- 32 Guajardo-Anchondo E. Evaluación de la respuesta inmune generada por la inmunización con el gene TcSP de *Trypanosoma cruzi* (tesis). México, D.F.: CINVESTAV-IPN; 2003.
- 33 Guzmán-Bracho. C. Producción y Caracterización parcial de un péptido recombinante y su valor diagnóstico en la enfermedad de Chagas (tesis). México D.F.: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN; 1996.
- 34 Sambrook J RD. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3^a ed. United States of America 2001.
- 35 pMAL protein fusion and purification system: Expression and purification of protein from cloned genes. New England Biolabs. 2004.
- 36 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976 May 7;72:248-254.
- 37 Meira S, Galvao M, Gontijo D, Machado-Coelho L, Norris A, Chiari E. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. Journal of clinical microbiology. 2002 Oct;40(10):3735-3740.