

DISEÑO DE UN REACTIVO DE INMUNOAGLUTINACIÓN PARA DIAGNOSTICAR LA ENFERMEDAD DE CHAGAS UTILIZANDO PARTÍCULAS DE LÁTEX FUNCIONALIZADAS

Valeria S. Garcia, Verónica D.G. Gonzalez, y Luis M. Gugliotta

*INTEC (Universidad Nacional del Litoral - CONICET), Güemes 3450,
Santa Fe (3000), Argentina.*

:: RESUMEN

La enfermedad de Chagas es reconocida como la principal endemia de América Latina. Aunque el parásito, *Trypanosoma cruzi*, fue descubierto en 1909, la importancia de la enfermedad y su dimensión como problema social fue comprobada recién a mediados del siglo XX, momento a partir del cual comenzó una serie de acciones destinadas a combatirla. Para lograr este objetivo, es fundamental el diagnóstico de la enfermedad y el presente trabajo avanza en ese sentido a través del desarrollo de un reactivo de inmunoaglutinación. Con este propósito, se sintetizaron primero partículas de látex con funcionalidades carboxilo y acetal, que sirvieron de soporte para ligar diferentes proteínas antigénicas del *T. cruzi* (homogenato del parásito y proteínas recombinantes simples y quiméricas), produciendo complejos látex-proteína capaces de actuar como reactivos de inmunoaglutinación para detectar la enfermedad de Chagas. Se buscaron luego las condiciones “óptimas” de reacción, y se evaluó y comparó el rendimiento de las distintas proteínas frente a un panel de sueros. La reacción antígeno-

no-anticuerpo se detectó midiendo los incrementos en la absorbancia óptica respecto de un blanco (complejo látex-proteína sin el agregado de suero). Las proteínas recombinantes dieron lugar a mejores resultados que el homogenato, especialmente cuando se empleó una proteína quimérica. El trabajo realizado permitió desarrollar un “kit de inmunoaglutinación” para detectar en forma sencilla, precoz, e in situ, la enfermedad de Chagas.

:: ABSTRACT

Chagas disease is recognized as the leading Latin American endemic illness. Although the parasite, *Trypanosoma cruzi*, was discovered in 1909, the importance of the disease and its dimension as a social problem was not proved until the mid-twentieth century, when a series of actions began to combat the Chagas. To this effect, it is essential to diagnose the disease and the present work pretends to advance in such sense, through the development of an immunoagglutination test. Latex particles with car-

boxyl and acetal functionalities were synthesized, and employed as a support of different antigenic proteins of *T. cruzi* (homogenate of the parasite, and single and chimeric recombinant proteins), for producing latex-protein complexes able to be used as immunoagglutination reagents for detecting Chagas disease. Optimal reaction conditions were sought and the performance of various proteins was evaluated against a panel of sera. The antigen-antibody reaction was detected by measuring the optical absorbance increments with respect to a blank (a latex-protein complex without serum). Recombinant proteins allowed outperform the homogenate, especially when chimeric proteins were employed. The present work allowed the development of an "immunoagglutination kit" to easily, early, and in situ detect Chagas disease.

:: INTRODUCCIÓN

Actualmente, en la rama de la salud, se experimentan cambios profundos en busca de nuevos reactivos que permitan el diagnóstico "al pie del paciente" y la implantación de terapéuticas en corto tiempo, así como el seguimiento clínico y epidemiológico de las enfermedades.

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria tropical, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se considera a la enfermedad de Chagas endémica de América Latina, aunque existen casos identificados en Europa, Canadá y Estados Unidos debido a la migración de personas desde el

centro y sur de América hacia los países más desarrollados. La Organización Mundial de la Salud estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16 y 18 millones de personas sólo en América Latina, que anualmente mueren a causa de ella cerca de 50 mil personas, y que más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirirla [1].

De todas las enfermedades transmitidas por vectores, la enfermedad de Chagas es la más asociada a condiciones de pobreza. No existe aún una vacuna contra la misma, ni un método satisfactorio y confiable de tratamiento etiológico (dirigido a atacar las causas) para erradicar el parásito, ni para evitar la aparición o progresión de lesiones e interferir en la cadena de transmisión. La prevención y el diagnóstico son las principales armas para controlar la enfermedad. Sin diagnóstico efectivo no se pueden identificar y por ende tratar a los individuos infectados, y la eficacia del tratamiento específico es difícil de evaluar. Más aún, la efectividad de cualquier campaña de control, ya sea dirigida a vectores, bloqueo de la transmisión o vacunación de poblaciones, no puede medirse sin un competente sistema de diagnóstico.

Los exámenes de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad dependen de la etapa clínica que curse el paciente. En la etapa inicial o aguda, se encuentran parasitemias importantes, por lo que el estudio se basa en la búsqueda del *T. cruzi* en sangre (xenodiagnóstico o cultivo de sangre). En la etapa crónica, la detección del parásito es muy difícil, por lo que el diagnóstico se confirma mediante la detección de anticuerpos (Ac) *anti-T. cruzi* en el suero del paciente.

El diagnóstico basado en la detección de Ac anti-*T.*

cruzi en el suero del paciente, tiene su origen en Argentina en 1913. Desde entonces, el avance del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas ha sido enorme, existiendo actualmente más de 30 ensayos comerciales basados en Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunoensayo Enzimático (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Un método de detección alternativo, es el ensayo de inmunoaglutinación (IA), donde se utilizan partículas de látex como soporte para la fijación de antígenos (Ag), de manera tal de amplificar la reacción Ag-Ac que se produce en el inmunoensayo. Este método resulta rápido, es de sencilla realización e interpretación, posee una sensibilidad analítica relativamente alta, es especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento, y (en principio) permitiría realizar el diagnóstico en campo al pie del paciente.

Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, a excepción del artículo de Cerisola et al. [2]; sólo los trabajos realizados por los autores del presente [3-13] han considerado la síntesis de partículas de látex, su sensibilización y posterior aplicación de los complejos látex-proteína en reacciones de aglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Cerisola et al. [2] estudiaron, la reacción de aglutinación de partículas de poliestireno (PS) sensibilizadas mediante adsorción física con los Ag presentes en el homogenato total del parásito (HTP). Sin embargo, sus resultados no fueron adecuados, debido principalmente a que: **a)** la adsorción física es parcialmente

reversible, pudiéndose desorber la proteína desde la superficie por cambios en el pH o en la fuerza iónica del medio; y **b)** el HTP es una mezcla indefinida de Ags, que varía en contenido y cantidad según el estadio de desarrollo del parásito, por lo que puede generar variaciones en la reproducibilidad y confiabilidad del inmunoensayo.

Las condiciones exigidas a un reactivo de diagnóstico son exactitud y reproducibilidad. Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se evalúa a partir de los conceptos de sensibilidad y especificidad. Una alta especificidad implica un número bajo de falsos positivos mientras que una alta sensibilidad significa un número bajo de falsos negativos. En general, se considera que la prueba diagnóstica tiene una validez aceptable si su sensibilidad y especificidad resultan mayores a 80% [14].

La búsqueda de Ag que permitan diagnosticar la enfermedad de Chagas con sensibilidad y especificidad adecuadas es uno de los más importantes pilares de su diagnóstico. La mayoría de los métodos serológicos utilizados actualmente, están basados en el uso de proteínas del HTP obtenidas a partir de cultivos in vitro del parásito, tras procesarlo por distintas técnicas fisicoquímicas. Como consecuencia, aparecen dificultades para estandarizar la metodología, existe considerable variación en la reproducibilidad y exactitud de los resultados obtenidos, y frecuentemente se observan falsos positivos como producto de la reacción cruzada con otras enfermedades parasitarias, tales como la Leishmaniasis.

La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos, permite estandarizar

la metodología, resolver el problema de la especificidad, eliminando los resultados falsos positivos por reacción cruzada con protozoarios relacionados, y mantener una alta sensibilidad.

Si bien se han utilizado muchas proteínas recombinantes para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas [15], ninguna de ellas fueron Ags capaces de ser reconocidos por todos los sueros humanos chagásicos. Para solucionar este inconveniente, se ha recurrido al uso de proteínas quiméricas, que expresan varios determinantes antigénicos no relacionados [16-18]. La estrategia se basa en la elección de epítopes inmunodominantes dentro de los Ags enteros y su posterior ensamblaje, lo que permite contemplar la sensibilidad de varias moléculas, sin perder la especificidad que brindan los fragmentos.

En este trabajo se describen las principales etapas involucradas en la síntesis y caracterización de partículas de polímero funcionalizadas y sensibilizadas con Ag del *T. cruzi*, y su empleo como reactivo de IA para detectar la enfermedad de Chagas. La investigación se realizó en el Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización del Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), donde se viene trabajando desde hace más de 30 años en la síntesis y caracterización de polímeros y coloides poliméricos; y en el modelado matemático, optimización y control de reactores de polimerización. En lo que se refiere a la obtención de polímeros para aplicaciones biomédicas, se está trabajando además en la síntesis de partículas para la detección de Toxoplasmosis en sus etapas aguda y crónica; y de Leptospirosis.

:: TRABAJO EXPERIMENTAL

El desarrollo del reactivo de inmunoaglutinación involucró las siguientes etapas: **a)** síntesis y caracterización de las partículas de látex funcionalizadas; **b)** obtención de diferentes proteínas antigénicas del *T. cruzi*; **c)** producción de los complejos látex-proteína mediante unión covalente de los Ags sobre los grupos funcionales superficiales de las partículas; y **d)** aplicación de los complejos látex-proteína en ensayos de IA. Esta última etapa comprende a su vez: **1)** la búsqueda de las condiciones del medio de reacción que permitan la máxima diferenciación entre un suero control positivo y un suero control negativo; y **2)** la evaluación de la sensibilidad y especificidad del ensayo frente a un panel de sueros.

Paso 1: Síntesis y Caracterización de Partículas de Látex Funcionalizadas

Se realizó la síntesis controlada de coloides poliméricos particulados con funcionalidades carboxilo o acetal mediante polimerización en emulsión en dos etapas y en ausencia de emulsificante. En una primera etapa, se prepararon las siembras de PS; por polimerización en emulsión “batch” de estireno (St) utilizando las condiciones y receta de reacción empleadas por Gonzalez et al. [6].

En una segunda etapa, se realizó la copolimerización en emulsión de St y de un monómero funcional, sobre las siembras sintetizadas previamente, obteniéndose partículas con morfología “core-shell” y funcionalida-

des carboxilo o acetal. Los látex con funcionalidad carboxilo se sintetizaron mediante copolimerización “semibatch” presembrada de St y ácido metacrílico (MAA) [5]; mientras que los látex con funcionalidad acetal se produjeron por copolimerización “batch” presembrada de St y acroleína dietil acetal (ADEA) [12, 20].

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un reactor de vidrio encamisado de 1 litro de capacidad, con un baño termostático para regular la temperatura de reacción, un agitador de paletas de acero inoxidable, y entradas para el burbujeo continuo de nitrógeno, toma de muestras, y alimentación o carga. La conversión final (x) se determinó por gravimetría. En la Fig. 1 se muestra una representación esquemática del sistema de reacción utilizado para las polimerizaciones y de las partículas de látex sintetizadas.

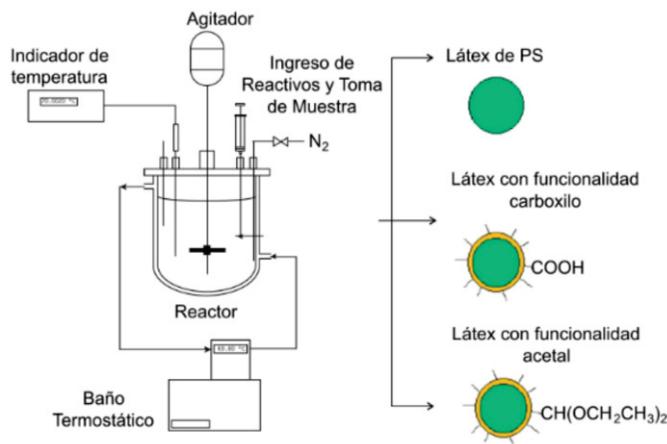


Fig. 1: Esquema del sistema de reacción utilizado y de las partículas de látex sintetizadas.

Antes de la caracterización de las partículas, se procedió a la limpieza de los látex mediante desplazamiento de suero. Este método permite retirar los restos no reaccionados de monómeros e iniciador, como así también los posibles oligómeros y polielectrolitos solubles en fase acuosa o adsorbidos sobre la superficie de las partículas. Durante la caracterización se determinó: **a)** el tamaño medio de partícula mediante Microscopía Electrónica de Barrido, SEM (D_{SEM}), Dispersión de Luz Dinámica, DLS a 90° (D_{DLS}), y Turbidimetría, T (D_T); **b)** la polidispersidad de los látex a través de SEM; **c)** la densidad de carga superficial (σ) y la densidad de grupos funcionales superficiales (δ) mediante titulación conductimétrica con una solución acuosa de NaOH; y **d)** la estabilidad coloidal, a través de la concentración crítica de coagulación (*c.c.c.*), que se determinó visualmente y por DLS a 90° , en términos de la concentración mínima de KBr requerida para la agregación de las partículas.

Paso 2. Obtención de los Antígenos

Se utilizaron distintas proteínas antigénicas del *T. cruzi*. Se trabajó con el HTP, constituido por una mezcla de antígenos, y con proteínas recombinantes simples y quiméricas.

El HTP se obtuvo por sonicación de un cultivo *in vitro* del parásito en el estadio de epimastigote. Los restos celulares se separaron de la mezcla de proteínas antigénicas mediante centrifugación.

La obtención de las proteínas recombinantes, que involucró la amplificación del gen que las codifica, el

clonado y la transformación de células de *Escherichia coli*, fue realizada por personal del Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral), a cargo del Dr. Iván Marcipar.

Durante este trabajo se realizó la expresión y purificación de las proteínas recombinantes. El procedimiento consistió en hacer crecer, bajo agitación a 37°C, las células de *E. coli* transformadas. Luego se indujo la expresión génica. Las células se recogieron centrifugando durante 15 minutos, y se dispersaron en buffer de resuspensión de células (PBS, pH 7.4). La suspensión se sonicó hasta lisis total, se centrifugó durante 10 minutos para separar los restos celulares, y se recolectó el sobrenadante que contiene las proteínas solubles. Para purificar la proteína de interés, se utilizó Cromatografía de Afinidad de Ion Metálico Inmovilizado (IMAC) y el grado de purificación se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, de acuerdo al método descrito por Laemmli [20].

Las etapas fundamentales para la obtención de las proteínas mediante la tecnología de ADN recombinante se muestran en la Fig. 2.

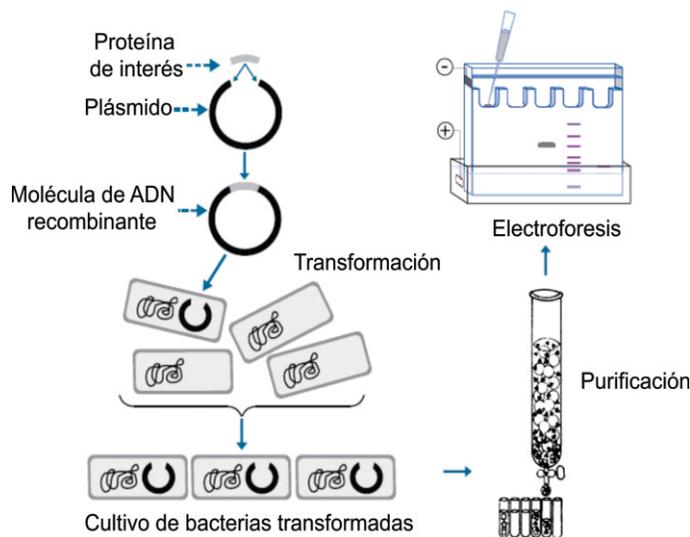


Fig. 2: Etapas fundamentales para la obtención de proteínas recombinantes.

Se trabajó con tres proteínas recombinantes simples RP1, RP2 y RP5 [3-13] (denominadas, en el presente trabajo, como S1, S2 y S3 respectivamente) que se expresan en todos los estadios de desarrollo y cepas del *T. cruzi*, y presentan alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad en su etapa crónica; y dos proteínas recombinantes quiméricas CP1 y CP2 [3-13] (denominadas respectivamente como Q1 y Q2) respectivamente formadas por la expresión en tándem de dos y tres péptidos altamente antigénicos, y específicos del *T. cruzi* de las etapas aguda y crónica de la enfermedad, lo que permite su diagnóstico en ambas etapas.

La antigenicidad de las distintas proteínas recombinantes obtenidas, es decir su capacidad para ser reconocidas por sus Ac específicos, se evaluó mediante ensayos de ELISA.

Paso 3: Producción de los Complejos Látex-Proteína

El proceso de sensibilización consistió en la unión covalente de las proteínas antigénicas con los grupos funcionales (carboxilo o acetal) anclados sobre la superficie de las partículas, sin alterar su actividad antigénica.

Los grupos carboxilo no son lo suficientemente activos para reaccionar espontáneamente con los grupos amino de las proteínas, y por ello es necesario activarlos previamente con una carbodiimida soluble en agua, que convierte los grupos carboxilo en acilureas, las cuales reaccionan fácilmente con los grupos amino de las proteínas, con formación de un enlace amida. Para evitar la hidrólisis de la acilurea, la activación se realizó en presencia de la proteína.

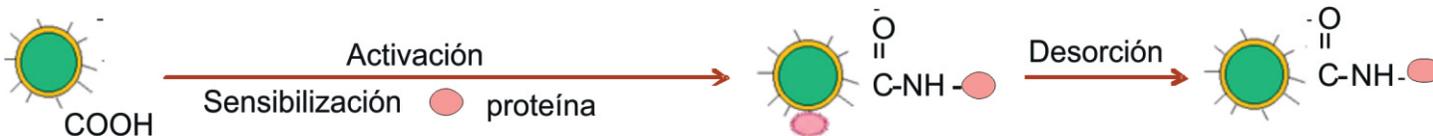
Para poder sensibilizar los látex con funcionalidad acetal mediante unión covalente, los grupos acetal deben transformarse, mediante una simple acidificación, en grupos aldehído, los que no precisan ser activados para unirse covalentemente a las proteínas.

Las sensibilizaciones se realizaron a través de experimentos “batch” a temperatura ambiente, mezclando

en tubos eppendorff las partículas de látex, el buffer fosfato pH 5 (fuerza iónica final 2 mM) y cantidades crecientes de la proteína antigénica. Además, para cada experimento se preparó un blanco sin proteína. Las muestras se agitaron suavemente durante 5 h. Los complejos látex-proteína se separaron de la solución mediante centrifugación y la proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método del ácido bicinconínico (BCA).

Debido a que los complejos látex-proteína así obtenidos contienen, tanto proteínas absorbidas físicamente, como proteínas unidas covalentemente a los grupos funcionales superficiales, los complejos se trataron con un emulsificante para eliminar la proteína adsorbida, de manera de asegurar que la mayor parte de la proteína presente en la superficie de las partículas se encuentre unida covalentemente. Para ello, los complejos látex-proteína separados por centrifugación se redispersaron en Tritón X-100 y se mantuvieron bajo agitación durante 24 h. Luego de centrifugar, se determinó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante por el método del BCA. Finalmente, mediante un balance de masa se calculó la cantidad de proteína que permanece en la superficie de las partículas luego del proceso de desorción. La Fig. 3 muestra un esquema del proceso de sensibilización por unión covalente de partículas de látex con funcionalidades carboxilo y acetal.

Partículas con Funcionalidad Carboxilo



Partículas con Funcionalidad Acetal



Fig. 3: Esquema del proceso de sensibilización por unión covalente de proteínas antigénicas sobre partículas de látex con funcionalidades carboxilo y acetal.

Una vez purificados, los complejos látex-proteína se redispersaron en buffer borato pH 8 para su almacenamiento y posterior utilización en los inmunoensayos.

Paso 4: Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de IA

La detección de la reacción de IA se realizó mediante el método visual y mediante turbidimetría. La Fig. 4 muestra un esquema del proceso de inmunoaglutinación.

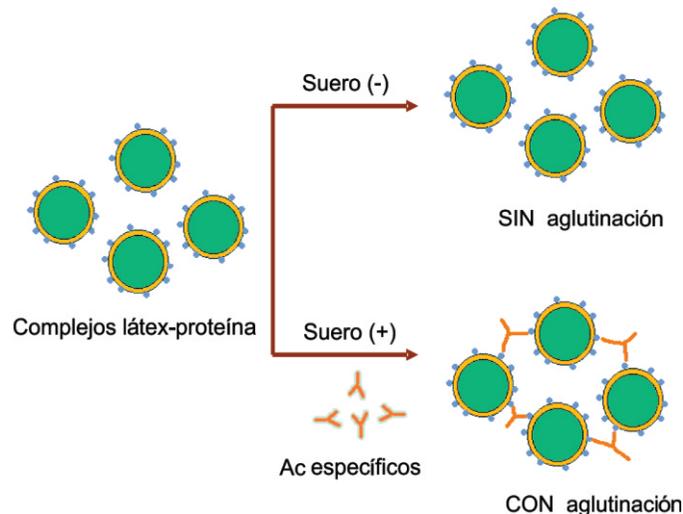


Fig. 4: Representación esquemática del proceso de inmunoaglutinación.

Para la detección mediante el método visual, se mezclaron el complejo látex-proteína y el suero positivo o negativo sobre un portaobjeto de fondo negro, y se registró el tiempo al cual se visualizó el proceso de aglutinación.

En el estudio mediante turbidimetría, el inmunoensayo consistió en mezclar la dispersión del complejo látex-proteína, con el suero positivo o el suero negativo y medir el incremento en la absorbancia óptica (ΔA), a una longitud de onda de 570 nm, después de 5 minutos de reacción. El ΔA se determinó restando al correspondiente valor de absorbancia medido, el valor de absorbancia de un blanco (complejo látex-proteína sin la adición del suero). Las mediciones de absorbancia del blanco deben ser constantes a lo largo del tiempo, lo que es indicativo de la estabilidad del complejo látex-proteína en el medio en el que se realiza el inmunoensayo. Esta condición es requerida para que un complejo se considere apto para ser utilizado en ensayos de IA.

4.a. Búsqueda de las Condiciones del Medio de Reacción

Dado que en la reacción Ag-Ac intervienen fuerzas no covalentes y reversibles, ciertos parámetros tales como el tiempo de reacción, fuerza iónica del medio y agregado de agentes bloqueantes al buffer de reacción, afectan la respuesta del inmunoensayo. Por lo tanto, una vez obtenidos los complejos látex-proteína, se ajustaron dichos parámetros a fin de maximizar la discriminación en la respuesta de sue-

ros positivos y negativos, y de facilitar la lectura de los resultados. El control cuidadoso de estos parámetros es necesario para mejorar la sensibilidad en el ensayo de IA y para minimizar la unión no específica.

Se trabajó con los distintos complejos látex-proteína obtenidos y con sueros controles. El suero control negativo corresponde a un individuo sano y el suero control positivo corresponde a un individuo infectado con altos niveles de Ac anti-*T. cruzi*, que fueron detectados mediante la técnica de referencia, ELISA. Ambos sueros, fueron obtenidos de zonas endémicas del norte de la Provincia de Santa Fe.

4.b. Evaluación de Sensibilidad y Especificidad del Inmunoensayo frente a un Panel de Sueros

Se realizó la detección de la reacción de IA mediante turbidimetría, enfrentando los complejos látex-proteína de sueros Chagas positivos (obtenidos de individuos con enfermedad de Chagas), sueros Leishmania positivos (obtenidos de individuos con Leishmaniasis) y sueros negativos para ambas parasitemias.

Las muestras de suero positivo para Chagas fueron obtenidas de una región endémica del noreste argentino y se clasificaron previamente como tales con dos técnicas de diagnóstico de referencia: ELISA y HAI. El panel de sueros positivos para Leishmaniasis fue obtenido de pacientes que habitan en una región de endemicidad (Recife, Brasil), con manifestaciones clínicas de Leishmaniasis cutánea. Las muestras de sueros negativos fueron clasificadas como tales, tan-

to para la infección por *T. cruzi* como para Leishmaniasis.

Los ΔA obtenidos con cada complejo látex-proteína fueron empleados para la construcción de curvas ROC (Receiver Operating Characteristics), utilizando el software gráfico MedCald. Las curvas ROC son utilizadas para proporcionar un criterio unificador en el proceso de evaluación y uso de pruebas diagnósticas [21].

A partir de las curvas ROC se obtuvieron los datos de sensibilidad, especificidad y valor del *cut-off* (límite que permite diferenciar entre sueros positivos y sueros negativos). A partir de los valores de *cut-off* obtenidos, se representaron las distribuciones de ΔA relativas ($\Delta A/cut-off$), utilizando el software gráfico GraphPad Prism.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Síntesis y Caracterización de los Látex

La síntesis de partículas de látex con funcionalidades carboxilo y acetal se llevó a cabo mediante un proceso de polimerización en emulsión en dos etapas. En la primera se prepararon los núcleos o siembra de PS, alcanzándose un valor final de conversión de 71% y un D_{DLS} de 300 nm. En la segunda etapa se formaron las cortezas con funcionalidades carboxilo o acetal sobre la siembra de PS, generando así partículas con morfología “core-shell”.

En la Tabla 1 se resumen las principales característi-

cas del látex siembra de PS y de los dos látex funcionalizados.

Tabla 1. Principales características de los látex

	Látex		
	PS	Carboxilado	Acetal
D_{SEM} [nm]	285	365	320
D_T [nm]	303	369	326
D_{DLS} [nm]	300	374	330
e_{shell} [nm]	-	37	15
Polidispersidad	1.009	1.004	1.009
σ [$\mu C/cm^2$]	14.9	78.4	24.6
δ_{SO_4} [mEq/cm ²]	-	1.76×10^{-8}	2.22×10^{-7}
δ_{COOH} [mEq/cm ²]	-	7.95×10^{-7}	-
$\delta_{CH(OR)}$ [mEq/cm ²]	-	-	3.21×10^{-8}
c.c.c. vis [mM]	250	900	250
c.c.c. DLS [mM]	75	300	150

Para el látex carboxilado se obtuvo una conversión final de 88%, con un crecimiento del diámetro de partícula, respecto de la siembra, de 74 nm (espesor de la corteza, $e_{shell} = 37$ nm). En el látex con funcionalidad acetal, la conversión final obtenida fue baja ($\approx 30\%$), observándose un incremento del diámetro de partícula, respecto al de la siembra, de 30 nm ($e_{shell} = 15$ nm).

Los diámetros medios estimados a partir de las mediciones de DLS (D_{DLS}) y T (D_T) resultaron mayores a los obtenidos por SEM (D_{SEM}) debido a que en esta última se miden partículas secas, mientras que en DLS y T se determinan diámetros hidrodinámicos.

En todos los casos, se logró sintetizar látex con baja polidispersidad de tamaños, que es requerida para su empleo en el desarrollo de reactivos de IA (los látex deben ser “monodispersos” para aumentar la estabilidad coloidal; asegurar un reparto homogéneo de las proteínas sobre la superficie de las partículas; y lograr una mejor visualización de la reacción de aglutinación que se produce en el inmunoensayo).

Los látex con morfología “core-shell” presentaron grupos sulfato, carboxilo y acetal en su superficie, proporcionados respectivamente por el iniciador y los monómeros de funcionalización (MAA y ADEA). Sólo los grupos superficiales sulfato y carboxilo proporcionaron estabilidad a las partículas de látex. Los látex con funcionalidad carboxilo mostraron mayor estabilidad coloidal (mayor *c.c.c.*); mientras que los látex con funcionalidad acetal presentaron una estabilidad similar a los látex de PS.

Finalmente, las *c.c.c.* obtenidas por el método visual resultaron mayores que las determinadas por DLS en iguales condiciones, corroborando la mayor sensibilidad y la ausencia de subjetividad de los métodos instrumentales en la detección de la agregación de las partículas coloidales.

2. Obtención de los Ags Recombinantes

Los Ags se obtuvieron con un alto grado de pureza y con una adecuada concentración como para ser utilizados en la síntesis de complejos látex-proteína para ensayos de IA.

Durante la evaluación de la antigenicidad de las pro-

teínas recombinantes mediante ELISA, se observó que los sueros de pacientes no infectados no mostraron ninguna reacción, mientras que los sueros de los pacientes chagásicos mostraron reacción positiva. De esta manera, se comprobó que las proteínas obtenidas presentan actividad específica como Ag de captura, para su utilización en la sensibilización de las partículas de látex para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

3. Síntesis de Complejos Látex-Proteína

En los experimentos de sensibilización de las partículas con HTP, la fracción de proteína unida covalentemente fue baja (menor al 50%) y cayó ligeramente con el incremento de la concentración inicial de proteína. Esto puede estar relacionado al hecho de que al ser el HTP una mezcla de proteínas de distintos tamaños, las mayores pueden ocluir grupos reactivos de la superficie de las partículas, reduciendo la disponibilidad de los mismos para interactuar con otras proteínas y/o a las distintas reactividades de las proteínas en función de su estructura.

En el caso de las proteínas recombinantes, la fracción de proteína unida covalentemente fue mucho mayor que en el caso del HTP. Esto puede deberse al pequeño tamaño de las proteínas utilizadas, lo que permite que tengan buena accesibilidad a los sitios activos, evitando su oclusión.

Cuando se trabajó con las proteínas recombinantes, tanto la cantidad total unida, como la ligada covalentemente aumentaron con la concentración inicial de

proteína. Sin embargo, la relación entre la proteína unida covalentemente y la cantidad adicionada disminuyó al aumentar la concentración de proteína adicionada, debido a la saturación de los grupos superficiales. Se observó además, que la fracción de proteína unida covalentemente resultó muy alta, aún cuando la concentración inicial de proteína fuera baja, lo que podría hacer innecesaria la desorción de las proteínas adsorbidas físicamente, reduciendo así, el riesgo de desnaturalización.

La Fig. 5 muestra algunos de los resultados obtenidos en la producción de complejos látex-proteína, a partir del látex carboxilado y de diferentes proteínas antigénicas. La totalidad de los resultados, pueden consultarse en nuestros trabajos previos [3-13].

Finalmente, los complejos látex-proteína obtenidos fueron caracterizados. Para ello, se les determinó la *c.c.c.* y el diámetro de partícula de los complejos látex-proteína por DLS a Múltiples Ángulos (MDLS) en el rango $30^\circ - 110^\circ$ (a intervalos de 10°). De resultados que no se muestran por razones de brevedad, se observó que: **a)** los valores de *c.c.c.* de los complejos látex-proteína fueron menores que los correspondientes a los látex sin sensibilizar; **b)** los diámetros medios de los complejos látex-proteína medidos por MDLS en función del ángulo de detección exhibieron un comportamiento similar al de los látex sin sensibilizar, pero con un ligero desplazamiento hacia diámetros mayores. Esto estaría indicando que la distribución de tamaños de partícula no cambia de forma y que no hay aglomeración sustancial de partículas durante la sensibilización.

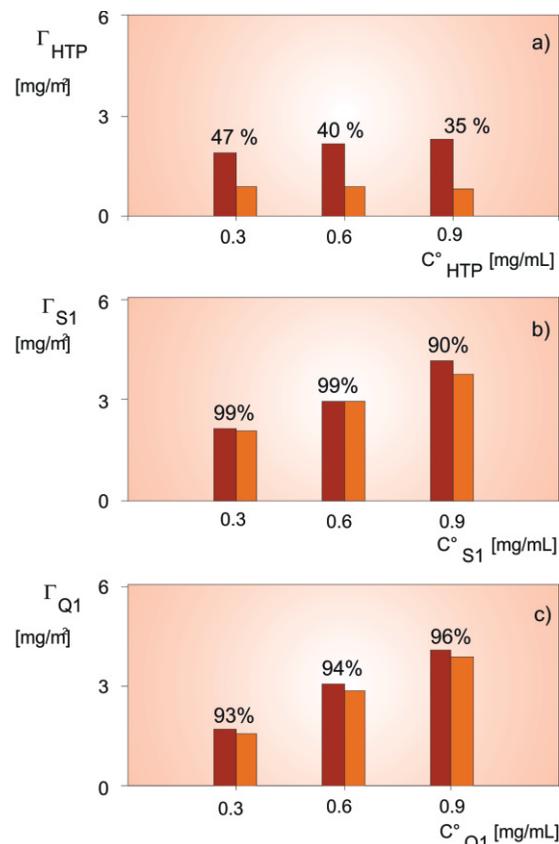


Fig. 5: Unión covalente del HTP (a); la proteína recombinante simple S1 (b) y la proteína recombinante quimérica Q1 (c) sobre las partículas con funcionalidad carboxilo. Se representa la cantidad de proteína unida sobre las partículas (Γ_{Prot} , mg/m^2) en función de la concentración inicial de proteína (C , mg/mL). Las densidades de proteína total unida a la superficie de las partículas (barras marrones) se compara con las densidades de proteína ligada en forma covalente (barras naranjas) determinadas después del proceso de desorción con Tritón X-100. El porcentaje sobre las barras indica la fracción de proteína unida covalentemente.

4. Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de IA.

Evaluación Mediante el Método Visual

Durante el análisis mediante el método visual (Fig. 6), se utilizaron los complejos obtenidos con las proteínas recombinantes. En general, la IA se hizo visible a los 35-40 segundos con el suero control positivo. Sin embargo, para obtener una diferenciación significativa entre el suero control positivo y el negativo, se observó que el ensayo se debería leer después de 2 minutos, pudiéndose extender incluso hasta los 8-10 minutos. De resultados no mostrados por brevedad, se observó que si bien con los complejos obtenidos a partir de las proteínas recombinantes simples se obtuvo mayor velocidad de aglutinación, la misma resultó más clara con los complejos sintetizados en base a las proteínas recombinantes quiméricas.



Fig. 6: Ensayo de IA detectado por el método visual a los 4 minutos de poner en contacto al suero control positivo (y al suero control negativo) con el complejo formado con el látex carboxilado y la proteína recombinante quimérica Q1.

Evaluación Mediante Turbidimetría

4.a. Búsqueda de las Condiciones del Medio de Reacción

Debido a que la composición del medio de reacción juega un papel vital en el reconocimiento inmunológico, se la optimizó con el objetivo de obtener las condiciones de reacción que permitan maximizar la discriminación entre los sueros positivos y negativos. En base al complejo obtenido a partir de la proteína Q1 y el látex carboxilado, se analizó: **a)** el tiempo de reacción, es decir el intervalo entre la mezcla del suero con el complejo látex-proteína y la lectura de la absorbancia, haciendo mediciones a $t = 5, 15$ y 25 min; **b)** la influencia de la fuerza iónica del medio de reacción, trabajando a valores de 20 y 150 mM; y **c)** la presencia de un agente bloqueante de los sitios que quedan libres sobre la superficie de las partículas después del proceso de sensibilización. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 7.

Respecto del efecto del tiempo de reacción (Fig. 7a), se observó que los mejores resultados se obtuvieron a los 5 min. Al aumentar el tiempo, se incrementó la respuesta del suero negativo, dificultando la discriminación con el suero positivo. Esto podría deberse a la pérdida de estabilidad del complejo látex-proteína con el tiempo.

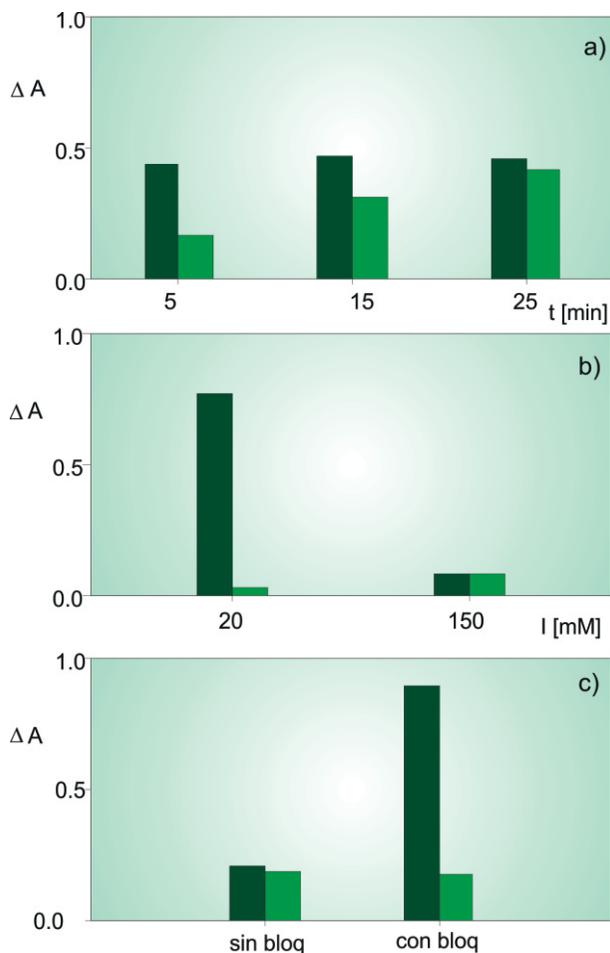


Fig. 7: Estudio de las condiciones de reacción: a) Influencia del tiempo de reacción; b) efecto de la fuerza iónica del medio; c) influencia de la presencia de agentes bloqueantes en el buffer de reacción. La respuesta del suero positivo (barras verdes oscuras) se compara con la respuesta del suero negativo (barras verdes claras).

En lo que refiere a la influencia de la fuerza iónica del medio de reacción en el que se llevó a cabo el inmunoensayo (Fig. 7b), se observó que la mayor discriminación entre el suero control positivo y el suero control negativo se obtuvo a baja fuerza iónica. En estas condiciones, las cadenas poliméricas situadas en la superficie de las partículas, y que poseen los Ags unidos covalentemente, se encuentran extendidas hacia la solución, lo que permite que los Ags queden más expuestos para interactuar con los Ac presentes en el suero. Por otra parte, la estabilidad de los complejos látex-proteína es mayor a baja fuerza iónica, debido a que tanto las proteínas como la superficie de las partículas están cargadas negativamente, lo que genera repulsión entre las partículas, evitando de este modo la aglutinación inespecífica. En cambio, a alta fuerza iónica, los Ags se encuentran más cercanos a la superficie de las partículas, dificultando la interacción Ag-Ac por impedimento estérico o bien por oclusión del sitio activo del Ag. Además, los complejos látex-proteína son menos estables a alta fuerza iónica, generando aglutinación inespecífica.

Cuando al buffer de reacción se le adicionó agentes bloqueantes, aumentó la interacción Ag-Ac y se logró disminuir las uniones inespecíficas (Fig. 7c). La presencia de estos agentes permite bloquear los sitios libres de las partículas, es decir, aquellos no ocupados por las proteínas antigénicas inmovilizadas durante la sensibilización. De esta manera, el Ac presente en el suero al que será expuesto posteriormente el complejo látex-proteína, tiene mayor posibilidad de unirse específicamente al Ag, y se evita su unión de manera inespecífica sobre la superficie de la partícula.

4.b. Evaluación de la Sensibilidad y de la Especificidad del Inmunoensayo frente a un Panel de Sueros

En una primera instancia, se consideró la aplicación de los complejos látex-proteína obtenidos a partir de los látex carboxilados y de los distintos Ags (HTP, proteínas recombinantes simples y proteínas recombinantes quiméricas) en ensayos de IA, siguiendo las reacciones Ag-Ac mediante turbidimetría. En la Fig. 8 se muestran las distribuciones de ΔA relativas ($\Delta A/\text{cut-off}$) de los diferentes complejos desarrollados a partir del HTP, de la proteína recombinante simple S1 y de la proteína recombinante quimérica Q1.

Los complejos látex-HTP no permitieron diferenciar sueros positivos de negativos, debido a que presentan muy baja especificidad (33.3%). Además, debido a que el HTP está compuesto por una mezcla indefinida de proteínas, la cual varía en función de la cepa del parásito y del estadio de desarrollo del mismo, suelen observarse variaciones en la reproductibilidad y en la confiabilidad de los resultados; y dificultades para estandarizar el método de diagnóstico.

Cuando se trabajó con proteínas recombinantes simples, el ensayo mostró mayor especificidad (menor cantidad de falsos positivos) que cuando se utilizó el HTP. Sin embargo, la sensibilidad fue baja (70.4%). Cuando se utilizó proteínas quiméricas, la especificidad del ensayo se mantuvo respecto de las simples (80.0%), pero la sensibilidad aumentó (92.0%), disminuyendo la cantidad de falsos negativos. Esto puede estar relacionado al hecho de que al aumentar el número de determinantes antigénicos presentes en

la proteína, aumenta la posibilidad de que éstos sean reconocidos por los Ac presentes en el suero, lo que se refleja en una mayor sensibilidad del ensayo. La ventaja adicional de utilizar proteínas quiméricas es que permiten diagnosticar la enfermedad de Chagas tanto en la etapa aguda, como en la crónica, debido a los Ags que las componen.

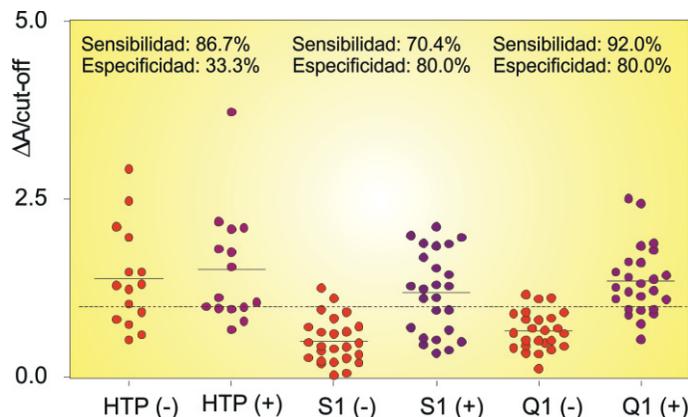
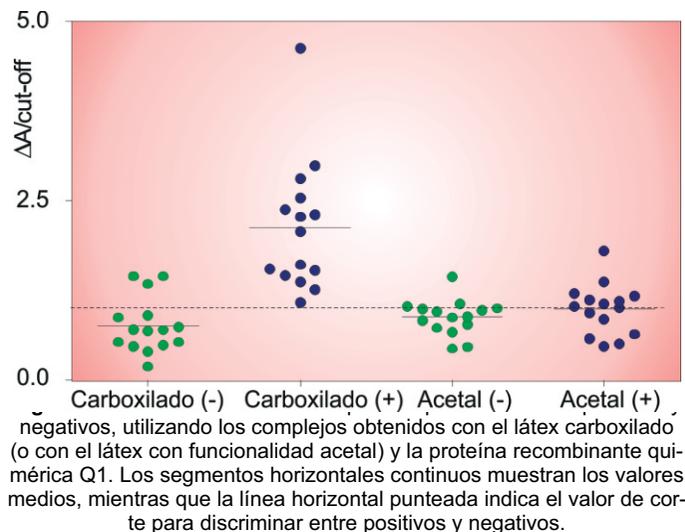


Fig. 8: Distribuciones de ΔA relativas obtenidas con los complejos sintetizados a partir del látex carboxilado y las proteínas HTP, S1 y Q1. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre sueros positivos y sueros negativos.

En cuanto al análisis del panel de sueros *Leishmania* positivos, con el complejo formado con el HTP fue imposible discriminar si el paciente está infectado con *T. cruzi* o *Leishmania* spp. Esto es debido al fenómeno de la reacción cruzada Chagas-Leishmaniasis, que se genera por la similitud entre los Ags de ambos parásitos. A diferencia de lo observado con el HTP, ningún suero positivo para Leishmaniasis reaccionó con

los complejos formados con las proteínas recombinantes.

Finalmente, se analizaron los complejos obtenidos con el látex con funcionalidad acetal y se comparó su respuesta durante los inmunoensayos, con la obtenida al utilizar los complejos basados en los látex con funcionalidad carboxilo. En la Fig. 9 se observa que, empleando la misma proteína, el complejo obtenido a partir del látex carboxilado permite discriminar mejor los sueros positivos y negativos, mostrando el ensayo mayor sensibilidad y especificidad. Por lo antedicho, los complejos obtenidos a partir del látex con funcionalidad acetal son menos eficientes para discriminar entre sueros positivos y negativos, probablemente debido a la baja c.c.c., baja densidad de carga superficial, y baja cantidad de grupos funcionales superficiales que presentan, respecto de los látex carboxilados. Además, los complejos formados a partir de los látex con funcionalidad acetal, presentan baja estabilidad en el tiempo, debido a que las iminas formadas durante el proceso de sensibilización (Fig. 3) poseen un doble enlace inestable, que se hidroliza fácilmente produciendo la separación entre la proteína y la superficie del látex.



CONCLUSIONES

Se sintetizaron partículas de látex “monodispersas” de tipo “core-shell” con funcionalidades carboxilo y acetal, que sirvieron como soporte para el acoplamiento covalente de distintas proteínas antigénicas del T. cruzi. La síntesis de los látex se realizó en dos etapas, definiéndose en la primera (producción de la siembra de PS) el tamaño de las partículas; y controlando en la segunda (copolimerización sobre siembra PS) el tipo de funcionalidad y la densidad de carga superficial.

En la etapa de sensibilización de las partículas de látex con los Ags, se observó un mayor porcentaje de proteína unida covalentemente cuando se trabajó con los Ags recombinantes, lo que haría innecesaria

la etapa de desorción con emulsificante de la pequeña fracción adsorbida físicamente, previa a la utilización de los complejos.

Debido a que la composición del medio de reacción donde se realiza el ensayo de IA juega un papel vital en el reconocimiento inmunológico, se la optimizó a fin de obtener condiciones capaces de maximizar la discriminación entre sueros positivos y negativos. Los mejores resultados se obtuvieron a los 5 minutos de reacción, trabajando a baja fuerza iónica y en presencia de agentes bloqueantes en el buffer de reacción. El control cuidadoso de estos parámetros fue necesario para mejorar la sensibilidad en el ensayo de IA y para minimizar la unión no específica.

Los diferentes complejos látex-proteína sintetizados, se evaluaron como reactivos de IA en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, frente a un panel de sueros positivos para Chagas, sueros positivos para Leishmaniasis y sueros negativos para ambas parasitemias. Durante la evaluación del rendimiento antigénico del HTP se observó que las distribuciones de ΔA relativas obtenidas para sueros positivos y para sueros negativos, resultaron muy similares, y que todos los sueros *Leishmania* positivos fueron reactivos, lo que refleja una muy baja especificidad de este complejo para ser utilizado en ensayos de IA.

Al utilizar complejos obtenidos a partir de las proteínas recombinantes simples, mejoró la discriminación entre sueros positivos y negativos, pero con un elevado número de falsos negativos. En cambio, los complejos sintetizados a partir de las proteínas recombinantes quiméricas permitieron una importante reducción de los falsos negativos, lo que generó un aumen-

to de la sensibilidad del ensayo. Además, ninguna de las proteínas recombinantes dio reacción con los sueros de pacientes con Leishmaniasis, lo cual indica que dichas proteínas son más específicas para la detección de Ac anti-*T. cruzi* que las obtenidas del HTP, debido a que codifican epítopes específicos del parásito.

El empleo de proteínas recombinantes en ensayos de IA, y el uso de proteínas quiméricas en particular, han posibilitado mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo, transformando a esta técnica en una herramienta atractiva para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Ella ha permitido detectar en forma precoz e *in situ*, pacientes con enfermedad de Chagas, tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad, con calidad diagnóstica y a bajo costo, lo que la haría accesible a la mayoría de la población de escasos recursos. Además, el ensayo presenta la facilidad que no requiere instrumental específico, pudiéndose aplicar directamente en campo.

:: REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud (2010) www.who.int/entety/medianticuerposentre/anticuerpostsheets/fs340/es-31k
- [2] Reacción de aglutinación de partículas de látex para diagnóstico de la enfermedad de Chagas, J. Cerisola, M. Alvarez, J. Wynne de Martín, *Medicina*, 40(1) (1980) 132-136.
- [3] Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes, V. Gonzalez, L. Gugliotta, G. Meira, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 19(2) (2008) 789-795.
- [4] Immunodiagnosis of Chagas disease: Synthesis of three latex-

protein complexes containing different antigens of *Trypanosoma cruzi*. V. Gonzalez, V. Garcia, J. Vega, I. Marcipar, G. Meira, L.M., Gugliotta, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(1) (2010) 12-17.

[5] Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease. I. Synthesis of the base carboxylated latex, V. Gonzalez, L. Gugliotta, G. Meira, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 19(2) (2008) 777-788.

[6] Síntesis y Caracterización de un Látex Monodisperso Carboxilado y Sensibilizado para Detectar la Enfermedad de Chagas, V. Gonzalez, Tesis Doctoral, Univ. Nac. del Litoral, Fac. Ing. Qca., Santa Fe, Argentina (2004).

[7] Reactivo de Inmunoaglutinación para Detectar Infección por *Trypanosoma cruzi* (CP1), L. Gugliotta, J. Vega, V. Gonzalez, V. Garcia, I.S. Marcipar, G. Meira, Patente de Invención P-0110102351, solicitada al Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) (2011).

[8] Reactivo de Inmunoaglutinación para Detectar Infección por *Trypanosoma cruzi* (FRA), L. Gugliotta, J. Vega, V. Gonzalez, V. Garcia, I. Marcipar, Patente de Invención P-0110102349, solicitada al Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) (2011).

[9] Reactivo de Inmunoaglutinación para Detectar Infección por *Trypanosoma cruzi* (B13), L. Gugliotta, J. Vega, V. Gonzalez, V. Garcia, I. Marcipar, P. Caudana, Patente de Invención P-0110102348, solicitada al Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) (2011).

[10] Reactivo de Inmunoaglutinación para Detectar Infección por *Trypanosoma cruzi* (CP2), L. Gugliotta, J. Vega, V. Gonzalez, V. Garcia, I. Marcipar, P. Caudana, Patente de Invención P-0110102350, solicitada al Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) (2011).

[11] Obtención de un Reactivo de Inmunoaglutinación para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma Cruzii*, V. Garcia, Tesis de Doctorado, Univ. Nac. del Litoral, Fac. Ing. Qca., Santa Fe, Argentina (2011).

[12] Synthesis and Characterization of Carboxyl and Acetal Latexes by Emulsion Polymerization. Application to the Production of Latex-Protein Complexes for Detecting Chagas Disease, V. Garcia, V. Gonzalez, J. Vega, I. Marcipar, L. Gugliotta,

Latin American Applied Research, 42(4) (2013) 405-412.

[13] Synthesis of Latex-Antigen Complexes from Single and Multiepitope Recombinant Proteins. Application in Immunoagglutination Assays for the Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection, V. Garcia, V. Gonzalez, P. Caudana, J. Vega, I. Marcipar, L. Gugliotta, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101 (2013) 384-391.

[14] Métodos de investigación clínica y epidemiológica, J. Argimón Pallás, J. Jiménez Vila, Ed Harcourt 2006.

[15] Serodiagnosis of Chronic and Acute Chagas' Disease with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Proteins: Results of a Collaborative Study in Six Latin American Countries, E. Umezawa, A. Luquetti, G. Levitus, C. Ponce, E. Ponce, D. Henriquez, S. Revollo, B. Espinoza, O. Sousa, B. Khan, J. da Silveira, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 449-452.

[16] Use of Full-Length Recombinant Calflagin and Its C Fragment for Improvement of Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection, I. Marcipar, C. Roodveldt, G. Corradi, M. Cabeza, M. Brito, L. Winter, A. Marcipar, A. Silber, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 5498-5503.

[17] Design, Construction, and Evaluation of a Specific Chimeric Antigen To Diagnose Chagasic Infection, S. Aguirre, A. Silver, M. Brito, M. Ribone, C. Lantigenosier, I. Marcipar, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 103768-103774.

[18] Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixture versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis, C. Camussone, V. Gonzalez, M. Belluzo, N. Pujato, M. Ribone, C. Lagier, I. Marcipar, *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(6) (2009) 899-905.

[19] Síntesis, caracterización y aplicaciones de coloides polimérico con funcionalidad aldehído y acetal, R.M. Santos-Pérez, Tesis Doctoral, Univ. del País Vasco (1997).

[20] Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, U. Laemmli, *Nature*, 227 (5259) (1970) 680-685.

[21] Inefficiency of diagnostic efficiency, M. Zweig, *Clin. Chem.*, 38(1) (1992) 163-164.