



EVALUACIÓN DE Q5B13 PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Maldonado, Camila

Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Director/a: Marcipar, Iván Sergio

Codirector/a: Peverengo, Luz María

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Chagas crónico, Diagnóstico, Trypanosomacruzi

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas causada por el protozoo flagelado *Trypanosomacruzi* (*T. cruzi*) presenta dos etapas sucesivas, aguda y crónica. En la etapa crónica, el diagnóstico se confirma por la demostración de los Anticuerpos (Acs) contra Antígenos (Ags) de *T. cruzi* en el suero mediante técnicas como Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) o Hemaglutinación Indirecta (HAI) (Malik y col., 2015). Ninguno de los métodos antes mencionados es cien por ciento confiable por lo que la OMS recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias, basadas en diferentes metodologías o en diferentes preparaciones antigénicas, para identificar a un paciente con enfermedad de Chagas. En caso de obtener un resultado discordante se usa una tercera reacción para definir el estado de infectado.

En trabajos previos, en el laboratorio de Tecnología Inmunológica, se han desarrollado distintos antígenos quiméricos destinados a determinar anticuerpos anti *T. cruzi* en sueros humanos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica. Fruto de dichas investigaciones, se determinó que, en ensayos de ELISA, una mezcla de proteínas recombinantes constituidas por los antígenos CP1 y CP3, formados por las fracciones antigénicas del parásito FRA y SAPA y TSSA, MAP y TcD, respectivamente, permitía lograr la mejor combinación antigénica para dicho fin (Peverengo y col 2017). Posteriormente se desarrolló un clon que codifica una nueva proteína quimérica conformada por los Antígenos FRA, SAPA, CRA y B13 al que se ha denominado Q5B13. En este trabajo, se evaluó el desempeño para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica de esta última proteína recombinante quimérica en forma individual o mezclada con CP3 y se lo ha comparado con la mezcla CP1+CP3.

OBJETIVOS

- Expresión y purificación de la proteína recombinante quimérica Q5B13.
- Evaluación del comportamiento antigénico de Q5B13 en forma individual y en mezcla antigénica con CP3 mediante ensayo de ELISA.
- Comparación diagnóstica de Q5B13 con la mezcla de proteínas recombinantes quiméricas CP1+ CP3.

Título: Desarrollo de dispositivos de microfluídica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas
Instrumento: CAI+D
Año Convocatoria: 2016
Organismo financiador: UNL
Director/a: Dr. Claudio L.A Berli

METODOLOGÍA

Expresión y purificación de la proteína recombinante Q5B13

Se indujo la expresión del clon de *Escherichiacoli* pET32-Q5B13, mediante el agregado de IPTG 1mM (3 hs). Se purificó utilizando una columna de agarosa con Níquel inmovilizado y las fracciones recolectadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15%. Luego se calculó la concentración mediante el método colorimétrico del ácido bicinconinico (BCA) (Bainor y col., 2010). Los antígenos CP1 y CP3 estaban disponibles en el laboratorio.

Panel de Sueros

Las muestras de suero de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* (Ch+) se obtuvieron de donantes de sangre que asistían al Hospital J. B. Iturraspe. Dos pruebas comerciales diferentes incluyendo ELISA (Chagatest ELISA) e IHA (Chagatest IHA) fueron empleados para evaluar el estado de infección crónica. Se confirmó la condición serológica como positiva cuando se obtuvieron resultados concordantes, según lo establecido por procedimientos técnicos estándar de la OMS (2002). Muestras de suero de pacientes no infectados con *T. cruzi*(Ch-)se obtuvieron de donantes de sangre del mismo hospital.

Se trabajó con un panel reducido (15 Ch+ y 15 Ch-) y un panel ampliado (36 Ch+ y 33 Ch-).

Evaluación de Q5B13 para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Para la evaluación de la antigenicidad de Q5B13 en forma individual y en mezcla se utilizó ensayo de ELISA indirecto. Se inmovilizaron los Ag en la microplaca (1 hora a 37 °C, luego 4°C ON). Se evaluaron diferentes concentraciones de Ag (100 ng; 500 ng por pocillo) en solución de buffer carbonato (pH 9,6). Luego las placas, se lavaron y se bloquearon los sitios de unión inespecífica, incubando con PBS-leche 5% (p/v). Se lavó y se incubó el suero (1/100 con PBS-leche 1% (p/v)). Luego del lavado se incubó el Ac anti-IgG humana conjugado a peroxidasa, diluido en PBS-leche 1%, se lavó y se procedió a revelarlas, agregando a cada pocillo 1 gota de TMB. Todos los lavados se realizaron por 3 veces con PBS-Tween-20 (0,05%) y los pasos de incubación fueron de 30 minutos a 37°C.

Los resultados se leyeron en lector de ELISA (450 nm) y se calculó el valor de *cut-off* como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros controles negativos más 2 desviaciones estándar. Todos los valores de DO fueron normalizados calculando el índice de densidad óptica en relación con el *cut-off* (IDON). Se consideró que la presencia de Ac era negativa ante un IDON < 1.

Los datos se evaluaron con el software GraphPadPrism (version 5.03), realizando:i) gráficas de dispersión de sueros,ii) curvas ROC a fin de estimar los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E), iii) comparaciones de medianas de IDON para sueros positivos y negativos mediante test de Mann Whitney y, iv) análisis de la relación de mediana de los sueros positivos/ mediana de los sueros negativos ($\Delta+/\Delta-$).

RESULTADOS / CONCLUSIÓN

Expresión y purificación de Q5B13

Se verificó mediante SDS-PAGE la capacidad de Q5B13 de expresarse correctamente en la fracción soluble con un peso molecular de 50 KDa y no se observaron bandas intensas relacionadas con impurezas. La concentración obtenida fue de 0,58 mg/ml.

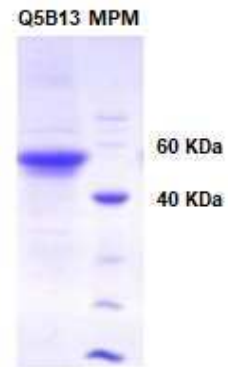


Figura 1: Obtención de la proteína recombinante: SDS-PAGE que muestra la proteína Q5B13 purificada y al marcador de peso molecular (MPM).

Evaluación del comportamiento antigénico de Q5B13

A) Q5B13 en forma individual

Se evaluaron diferentes concentraciones de Q5B13 (100 ng y 500 ng por pocillo) frente al panel reducido utilizando una dilución de conjugado de 1/20000. Con la condición 100 ng de Q5B13, se obtuvo muy buena discriminación entre sueros positivos y negativos ($\Delta+/\Delta- = 12,1$) a un bajo *cut-off* (0,184). Como puede observarse en la Figura 2 A, con esta condición frente al panel ampliado se obtuvo una buena performance diagnóstica (AUC:0,994), con valores de S del 100% y E del 66,7%, lo que se correspondió con la presencia de 11 sueros falsos positivos (FP). Si bien se obtuvo buena discriminación entre sueros positivos y negativos ($\Delta+/\Delta- = 5,54$) la misma disminuyó en comparación al $\Delta+/\Delta-$ obtenido en la evaluación previa con un panel reducido.

B) Q5B13 en mezcla con CP3

Se decidió incorporar en la sensibilización la proteína antigénica CP3 en mezcla con Q5B13 con el objetivo de mejorar la especificidad obtenida aumentando los Ag expuestos en la placa de ELISA.

Se evaluó el panel reducido frente a dos condiciones de mezcla: 1) Q5B13 100 ng + CP3 100 ng (Conj. Dil: 1/20000) y 2) Q5B13 500 ng + CP3 100 ng (Conj. Dil: 1/30000). Con la condición 2, además de obtener una buena discriminación entre sueros positivos y negativos ($\Delta+/\Delta- = 6,76$) con un bajo *cut-off* (0,19), no se obtuvieron resultados FP ni Falsos Negativos (FN). Al ampliar el panel se obtuvo un comportamiento similar ($\Delta+/\Delta- = 6,07$). Si bien se obtuvo un buen desempeño diagnóstico (AUC: 0,989), con una S del 100%, no se logró aumentar la E (63,6%), observándose la presencia de 12 sueros FP (Figura 2 B).

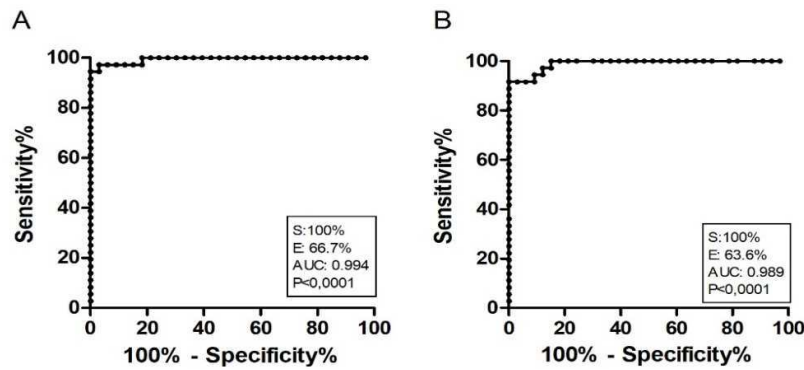


Figura 2: Evaluación del desempeño de las quimeras frente al panel de sueros (36 Ch+ y 33 Ch-). A) Curva Roc obtenida al enfrentar el panel a la proteína recombinante quimérica Q5B13. B) Curva Roc obtenida al enfrentar el panel a la mezcla de proteínas recombinantes quiméricas Q5B13+CP3.

Comparación de Q5B13 sola y en mezcla con CP3 con la mezcla antigénica CP1+CP3

Con los resultados obtenidos en la gráfica de distribución de valores de IDON (Figura 3), podemos concluir que, al comparar el desempeño diagnóstico de las quimeras frente al panel de sueros ampliado, Q5B13 permite una especificidad menor a la presentada por la mezcla de CP1+CP3, con presencia de FP, no permitiendo una buena discriminación entre sueros positivos y negativos.

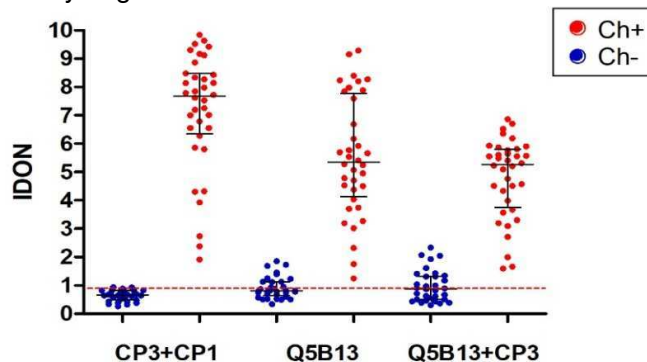


Figura 3: Comparación del desempeño diagnóstico de las quimeras frente al panel de sueros (36 Ch+ y 36 Ch-). Distribución de los valores de IDON para el panel de sueros evaluado con las quimeras: CP3+CP1, Q5B13 y Q5B13+CP3. La línea roja punteada indica el valor de corte para discriminar entre sueros positivos y negativos.

Por esta razón se descarta la posibilidad de utilizar Q5B13 en los ensayos de ELISA. Posteriormente se evaluará si su aplicación en otro tipo de plataforma diagnóstica como aglutinación o tira reactiva permite su uso para detección de Chagas crónico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bainor A, Chang L, McQuade T, Webb B, Gestwicki JE** (2010). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Anal Biochem*, 410(2): 310-312.
- Malik L, Singh G, Amsterdam E** (2015). The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clin Cardiol*, 38(9):565-9.
- Peverengo L, Garcia V, Rodeles L, Mendicino D, Vicco M, Lagier C, Gonzalez V, Gugliotta L, Marcipar I** (2018). Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*, 145(12):1594-1599.
- World Health Organization** (2002) Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Geneva: WHO.