

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 547**

51 Int. Cl.:
G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07844370 .2**
96 Fecha de presentación: **18.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2080027**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y DIAGNOSIS DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI.**

30 Prioridad:
19.10.2006 US 583203

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:
**ABBOTT LABORATORIES
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL 60064, US**

72 Inventor/es:
**SHAH, Dinesh O;
CHANG, Chi-Deu;
SCHOCHETMAN, Gerald y
CHENG, Kevin Y**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 372 547 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la Detección y Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a la diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Más específicamente, la presente invención se refiere a los métodos para identificar y diagnosticar la infección por *Trypanosoma cruzi* utilizando una combinación novedosa de cuatro polipéptidos recombinantes.

Antecedentes de la Presente Invención

10 El *Trypanosoma cruzi* ("*T. cruzi*"), el parásito protozoico que ocasiona la enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis Americana, es endémico en América Central y del Sur así como en México. La mayor parte de las personas infectadas, después de una fase aguda suave, entran en la fase indeterminada de larga vida que se caracteriza por la carencia de síntomas, parasitemias bajas, y anticuerpos para una variedad de antígenos de *T. cruzi*. Aproximadamente 10-30% de las personas con infecciones crónicas por *T. cruzi*, sin embargo, desarrollan disfunción cardíaca o gastrointestinal como consecuencia de la presencia persistente del parásito. La quimioterapia es en gran parte ineficaz, concretamente para las infecciones crónicas. Aproximadamente 25.000 de las 12 millones

15 de personas estimadas en los países endémicos que están infectados crónicamente con *T. cruzi* mueren de la enfermedad cada año, debido típicamente a alteraciones del ritmo cardíaco o insuficiencia congestiva del corazón (Véase, Kirchoff, L.V., "American trypanosomiasis (Chagas' disease) in Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice, R.L. Guerrant et al., editores, págs. 1082-1094, Churchill Livingstone, Nueva York 2006).

20 En las zonas endémicas el *T. cruzi* es transmitido principalmente por insectos triatominos chupadores de sangre. La transmisión también se puede producir por transfusión de sangre donada por personas infectadas crónicamente, e históricamente esta ruta de transmisión fue importante en los países endémicos antes de la implementación de los programas de escrutinio de sangre (Véase, Schunis, G.A., Clin. Microbiol. Rev., 18:12-29 (2000)). No existe una vacuna para prevenir la transmisión de *T. cruzi*. Durante las últimas décadas la emigración de los países endémicos para el Chagas hacia los Estados Unidos ha aumentado notablemente. Aproximadamente 13 millones de tales inmigrantes viven ahora en los Estados Unidos, y se estima que 80.000-120.000 de estas personas están infectadas con *T. cruzi* (Véase, Kirchoff, L.V., et al., Transfusion, 46:298-304 (2006)). Su presencia crea un riesgo de transmisión del parásito relacionado con transfusiones en los Estados Unidos. Ya se ha informado sobre cinco casos de enfermedad de Chagas relacionada con transfusiones en los estados Unidos, y las autoridades de los bancos de

30 sangre están de acuerdo con que probablemente se haya producido un número mucho mayor de casos no diagnosticados (Véase, Leiby, D.A., et al., N. Engl. J. Med., 341:1237-1239 (1999) y Young, C.T., "Transfusion acquired Trypanosoma cruzi infección," Transfusion, En prensa (2007)). Actualmente las reservas de sangre en los Estados Unidos no son escrutadas en busca de *T. cruzi*, ya que ningún análisis de escrutinio de sangre ha sido aclarado por la FDA. Por consiguiente, la infección por *T. cruzi* es una amenaza para las reservas de sangre en los Estados Unidos. También se puede transmitir *T. cruzi* por medio de trasplante de órganos obtenidos de personas infectadas crónicamente. Se ha dado parte de numerosos informes de semejante transmisión en los países endémicos, y no está claro cómo han podido pasar inadvertidos en los Estados Unidos (Véase, Mascola, L., et al., MMWR, 55:798-780 (2006) y Zayas, C.F., et al., MMWP. 51:210-212 (2001)).

40 La diagnóstico en laboratorio de la infección crónica por *T. cruzi* es compleja. La demostración del parásito mediante hemocultivo o xenodiagnóstico lleva tiempo, es poco sensible, y es costosa. Por el contrario, los análisis serológicos para los anticuerpos para *T. cruzi* están bien adaptados a una diagnóstico rápida y poco costosa de la infección. Los ensayos convencionales, tales como el análisis de hemaglutinación indirecta ("IHA"), el análisis de inmunofluorescencia indirecta ("IFA"), y el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada ("ELISA"), se utilizan ampliamente en los países endémicos. La mayor parte se basa en fracciones antigénicas completas o semi-purificadas de epimastigotas de *T. cruzi* desarrollados en cultivo axénico. Un problema persistente con los análisis convencionales ha sido la aparición de resultados no concluyentes y falsos positivos (Almeida, I.C., et al., Transfusion, 37:850-857 (1997), Kirchoff, L.V., et al., Transfusion, 46:298-304 (2006) y Leiby, D.A., et al., J. Clin. Microbiol., 38:639-642 (2000)). No existe consenso sobre qué preparación de antígeno del parásito es mejor para

50 detectar anticuerpos para *T. cruzi*. La Organización Panamericana de la Salud y otros grupos expertos han recomendado que la sangre donada sea sometida a ensayo al menos con dos métodos diferentes realizados en paralelo (Véase, "Control of Chagas Disease", World Health Organization, Ginebra (2000)). Este enfoque lleva consigo una enorme carga logística y económica para los bancos de sangre.

55 De este modo, existe la necesidad en la técnica de un análisis adicional para su uso en laboratorios clínicos y bancos de sangre. Ningún análisis ha sido aceptado uniformemente como prueba de oro para la diagnóstico serológica de la infección por *T. cruzi*. Los análisis basados en la PCR carecen de la sensibilidad necesaria para

este papel (Véase, Gomes, M.L., Am. J Trop. Med. Hyg., 60:205-210 (1999)). Hace casi dos décadas se desarrolló un análisis de precipitación radioinmunitaria ("RIPA"), que es un ensayo altamente sensible y específico con resultados fácilmente interpretados y ha sido sugerido para su uso como ensayo de confirmación en los Estados Unidos (Véase, Kirchoff, L.V., et al., J. Infect. Dis., 155:561-564 (1987)). Aunque el RIPA ha sido utilizado como análisis de confirmación en más de 20 proyectos de investigación referidos hasta la fecha (Véanse, Kirchoff, L.V., et al., Transfusion, 46:298-304 (2006) y Leiby, D.A., et al., Transfusion, 42:549-555 (2002)), su sensibilidad y especificidad no han sido validadas sistemáticamente. Por otra parte, la complejidad del RIPA haría difícil su amplio uso fuera del entorno de la investigación (Véase, Leiby, D.A., et al., J Clin. Microbiol., 38:639-642 (2000)).

También se han estudiado análisis de inmunotransferencia como análisis adicionales para los anticuerpos para *T. cruzi*. Hace algunos años se propuso un análisis de inmunotransferencia basado en una fracción antigénica de proteína de *T. cruzi* de epimastigotas unida a una membrana de nitrocelulosa como ensayo adicional para la enfermedad de Chagas (Véase, Mendes, R.P., et al., J. Clin. Microbiol., 35:1829-1834 (1997)). Se ha propuesto un papel similar para un análisis de inmunotransferencia basado en una fracción antigénica excretada-secretada de tripomastigotas ("TESA") producida en cultivos de células de mamífero infectadas por *T. cruzi* (Véase, Berrizbeitia, M., et al., J. Clin Microbiol., 44:291-296 (2006), Umezawa, E.S., J. Clin. Microbiol., 34:2143-2147 (1996)). El riesgo biológico inherente a la manipulación de cultivos de parásitos vivos y la dificultad de producir estas mezclas antigénicas complejas con regularidad entre lotes son las principales desventajas de los análisis basados en antígenos de cultivos tales como estos dos. Además, ninguno de estos ensayos ha sido adoptado como ensayo de confirmación y ninguno ha sido desarrollado comercialmente. Otro análisis, concretamente el análisis de Chagas INNO-LIA, contiene siete bandas de ensayo con dominios únicos de *T. cruzi* sobre una tira de plástico. Sin embargo, el hecho de que se encuentren presentes en la tira siete antígenos recombinantes distintos podría ser un factor limitante en términos de su sensibilidad. Por otra parte, tener siete bandas de ensayo complica el protocolo de interpretación.

Por lo tanto, sigue existiendo en la técnica la necesidad de un análisis para *T. cruzi* que muestre un elevado nivel de sensibilidad y especificidad, que sea simple de interpretar y que sea adecuado para su uso como ensayo de confirmación para especímenes clínicos y de bancos de sangre que son dudosos o reactivos en análisis de escrutinio.

Compendio de la Invención

En una realización, la presente invención hace referencia a un método de identificación de *Trypanosoma cruzi* en una muestra de ensayo. El método comprende las etapas de:

poner en contacto una muestra de ensayo de un ser humano con los cuatro polipéptidos recombinantes FP3, FP6, FP 10 y TcF; y
detectar la unión de los anticuerpos presentes en dicha muestra de ensayo a al menos dos de dichos polipéptidos recombinantes, indicando la presencia de dichos anticuerpos para al menos dos de dichos polipéptidos recombinantes la presencia de *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra de ensayo.

La muestra de ensayo puesta en contacto puede ser sangre, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal, orina u otra muestra apropiada. Además, el método anterior puede comprender adicionalmente la etapa de poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un polipéptido recombinante más seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.

En otra realización, la presente invención hace referencia a una fase sólida que tiene inmovilizada sobre ella cuatro polipéptidos recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF, y un primer control y un segundo control, donde o bien el primer control o bien el segundo control están inmovilizados sobre la fase sólida a una concentración que es menor que la del otro control.

Los polipéptidos se pueden disponer sobre la fase sólida en forma de bandas separadas (o, p. ej., en forma de manchas o puntos). La fase sólida se puede seleccionar del grupo que consiste en nitrocelulosa, nailon, plástico y papel, u otra fase sólida apropiada. Además, la fase sólida puede ser una tira que tiene dichos polipéptidos inmovilizados sobre ella. La fase sólida puede tener inmovilizado sobre ella además al menos un polipéptido recombinante adicional seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.

En otra realización más, la presente invención hace referencia a un método de diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en un sujeto. Comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto una muestra de ensayo obtenida de un sujeto con una fase sólida, donde dicha fase sólida tiene inmovilizados sobre ella los cuatro polipéptidos recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF en forma de bandas de ensayo separadas, y un primer control y un segundo control, donde o bien el primer control o bien el segundo control están inmovilizados sobre la fase sólida a una concentración que es menor que la del otro control con el fin de comprender un control bajo;

poner en contacto la fase sólida con al menos un reactivo de detección;

detectar la unión de los anticuerpos presentes en la muestra de ensayo identificando la presencia de una señal en cada una de las bandas de ensayo;

comparar la intensidad de cualquier señal identificada en una banda de ensayo para un polipéptido recombinante con la intensidad de la señal de control bajo;

donde la identificación de una señal en al menos dos bandas de ensayo de los polipéptidos recombinantes indica la presencia de *T. cruzi* en dicha muestra de ensayo, siempre que al menos una de las señales identificadas en una banda de ensayo para un polipéptido recombinante tenga una intensidad comparable a la del control bajo.

La muestra de ensayo puesta en contacto en el método anterior puede ser sangre, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal, orina u otra muestra apropiada. Los polipéptidos inmovilizados en la fase sólida empleada en el método anterior se pueden disponer sobre la fase sólida en forma de bandas separadas (o, p. ej., en forma de manchas o puntos). Por otra parte, la fase sólida se puede seleccionar del grupo que consiste en nitrocelulosa, nailon, plástico y papel, u otra fase sólida apropiada. Además, la fase sólida puede ser una tira que tenga dichos polipéptidos inmovilizados sobre ella. La fase sólida puede tener inmovilizado sobre ella al menos un polipéptido recombinante más seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo 1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.

Breve Descripción de las Figuras

La **Figura 1** muestra una tira de inmunotinción ilustrativa. Se emplean cuatro (4) antígenos recombinantes ("rags"), FP3, FP6, FP10 y TcF, como Bandas de Ensayo para la detección de anticuerpos para *T. cruzi*. También se pueden emplear tres (3) bandas de control integradas ("CTL"), anti-IgG humana de cabra ("Anti-hlgG"), hlgG-bajo ("hlgG-L") y hlgG-alto ("hlgG-H"). Se utiliza anti-IgG humana de cabra para verificar la adición de la muestra, se utiliza hlgG-L para ajustar un corte para la intensidad de la banda, y se utiliza hlgG-H como referencia para bandas con mayor intensidad. Los resultados previstos utilizando la tira se pueden describir como sigue. Para un control negativo, las tres (3) bandas de control integradas son visibles y no son visibles las bandas de ensayo. Para un control positivo, además de ser visibles las tres (3) bandas de control integradas, también son visibles las cuatro (4) bandas de ensayo.

La **Figura 2** muestra los resultados típicos obtenidos en un análisis de inmunotransferencia ilustrativo de la invención en términos de reactividad con los antígenos de ensayo FP3, FP6, FP10 o TcF o los antígenos de control hlgG-H, hlgG-L o anti-IgG humana de cabra. La Tira 1 es un control negativo ("CN"), que muestra tres bandas en la sección de control integrada (Recuadro A); la Tira 2 es un control positivo de anticuerpo para *T. cruzi* ("CP"), que muestra cuatro bandas de ensayo (Caja B) además de las tres bandas de control integradas (Caja A); las Tiras 3-6 muestran las muestras que contienen de una a cuatro bandas de ensayo (Caja B) además de las bandas de control integradas (Caja A).

La **Figura 3** es una representación esquemática de un algoritmo ilustrativo para interpretar las lecturas en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención. Las bandas de ensayo son las bandas de ensayo que están comprendidas por los antígenos recombinantes, FP10, FP6, FP3 y TcF. Para que cada análisis individual sea válido, las tres bandas de control integradas también deben estar incluidas en la inmunotransferencia (p. ej., deben estar presentes sobre la tira) y deben ser detectadas por el análisis.

Descripción Detallada de la Presente Invención

Definiciones

Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" hace referencia a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de la misma, concretamente, una porción de unión al antígeno. Los ejemplos de las porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab)₂ que pueden ser generados tratando un anticuerpo con una enzima, tal como pepsina. Los ejemplos de los anticuerpos que pueden ser utilizados en la presente invención son los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos recombinantes, los Fv de cadena sencilla ("scFv"), un anticuerpo madurado por afinidad, los anticuerpos de cadena sencilla, los anticuerpos de un solo dominio, los fragmentos Fab, los fragmentos F(ab'), los Fv unidos por disulfuro ("sdFv"), y los anticuerpos antiidiotípicos ("anti-Id") y los fragmentos de unión a epítomos funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "FP3" hace referencia a un polipéptido de fusión recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* que tiene el dominio antigénico mostrado en la Tabla 1 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia del SEQ ID NO: 1. Los métodos de elaboración de FP3 se describen, p. ej., en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0132077, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia. El término "FP3" según se utiliza en la presente memoria también abarca las variantes de esta secuencia de aminoácidos que difieren en sustituciones y/o modificaciones conservativas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "FP6" hace referencia a un polipéptido de fusión recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* que tiene el dominio antigénico mostrado en la Tabla 1 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia del SEQ ID NO: 2. Los métodos para la elaboración de FP6 se describen, p. ej., en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0132077, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia. El término "FP6" según se utiliza en la presente memoria también abarca las variantes de esta secuencia de aminoácidos que difieren en sustituciones y/o modificaciones conservativas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "FP10" hace referencia a un polipéptido de fusión recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* que tiene el dominio antigénico mostrado en la Tabla 1 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia del SEQ ID NO: 3. Los métodos para la elaboración de FP10 se describen, p. ej., en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0132077, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia. El término "FP10" según se utiliza en la presente memoria también abarca las variantes de esta secuencia de aminoácidos que difieren en sustituciones y/o modificaciones conservativas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "TcF" hace referencia a una polipéptido de fusión recombinante (antígeno) derivado de *T. cruzi* que tiene el dominio antigénico mostrado en la Tabla 1 y la secuencia de aminoácidos mostrada en la secuencia del SEQ ID NO: 4. Los métodos para la elaboración de TcF se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.419.933, cuyos contenidos se incorporan a la presente memoria como referencia. El término "TcF" según se utiliza en la presente memoria también abarca las variantes de esta secuencia de aminoácidos que difieren en sustituciones y/o modificaciones conservativas.

Tabla 1

	Dominio Antigénico	Descripción*
FP10	SAPA ^a	Antígeno de fase aguda diseminado
	MAP ^a	Proteína asociada a microtúbulos
FP6	TcR39 ^a	Citoesqueleto/proteína de membrana
	FRA ^b	Proteína repetitiva flagelar
FP3	TcR27 ^c	Proteína
	FCaBP ^d	flagelar
TCF	PEP-2 ^b	GDKPSPFQAAA GDKPSPFGQA
	TcD ^b	AEPKS AEPKP AEPKS
	TcE ^b	KAA/APA KAAAAPA KAATAPA
	TcLo1.2 ^b	SSMP S GTSEEGSRGGSSMPA
*El subrayado destaca los segmentos de repeticiones de aminoácidos. ^a Segmentos N-terminales, repeticiones, y C-terminales incluidos. ^b Comprendido enteramente por repeticiones (PEP-2 es el SEQ ID NO: 5; TcD es el SEQ ID NO: 6; TcE es el SEQ ID NO: 7 y TcLo1.2 es el SEQ ID NO: 8). ^c N-terminal y repeticiones incluidos. ^d Proteína completa, no repetitiva.		

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "sujeto" y "sujetos" hacen referencia a un mamífero, incluyendo un ser humano o un animal. Preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "muestra de ensayo" hace referencia a una muestra biológica derivada de suero, plasma, sangre completa, saliva, fluido cerebroespinal, orina, u otros fluidos corporales o muestra apropiada para someter a ensayo a un sujeto. La muestra de ensayo se puede preparar utilizando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica. La muestra de ensayo también incluye muestras de una reserva de sangre destinada a transfusión.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "variante o variantes" utilizado en relación con un polipéptido (tal como, pero no limitado a, los polipéptidos de fusión recombinantes, FP3, FP6, FP10 y TcF) hace referencia a un polipéptido que difiere de una secuencia de aminoácidos identificada por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Tales variantes pueden ser identificadas generalmente modificando la secuencia de polipéptidos y evaluando las propiedades antigénicas del polipéptido modificado. Las variantes del polipéptido muestran una identidad de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% y muy preferiblemente al menos aproximadamente 95% (según se describe en la presente memoria) con los polipéptidos identificados. Según se utiliza en la presente memoria, una "sustitución conservativa" es aquella en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos espere que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan esencialmente inalteradas. En general, el cambio dentro de los siguientes grupos de aminoácidos representa cambios conservativos: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Las variantes también pueden contener, o como alternativa contienen, otras modificaciones, incluyendo la delección o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre las propiedades antigénicas, la estructura secundaria y/o la naturaleza hidropática del polipéptido.

Método de Identificación de *T. cruzi* en una Muestra

La presente invención hace referencia a los métodos de identificación de anticuerpos para *T. cruzi* en una muestra de ensayo. Los métodos implican la obtención de una muestra de ensayo de un sujeto que se sospecha que ha estado expuesto a *T. cruzi* o está infectado con *T. cruzi*.

Una vez que se ha obtenido la muestra de ensayo requisito, la muestra de ensayo se pone en contacto con los cuatro polipéptidos recombinantes (o antígenos), FP3, FP6, FP10 y TcF. Una vez que la muestra de ensayo se pone en contacto con los cuatro polipéptidos recombinantes, se determina a continuación la presencia o ausencia de anticuerpos para cada uno de los polipéptidos en la muestra de ensayo y se compara con (1) un valor de corte predeterminado, o (2) la intensidad de la señal generada por uno o más controles. En una realización alternativa, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar también para detectar la infección por *T. cruzi* en reservas de sangre. En otra nueva realización alternativa, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diagnosticar una infección por *T. cruzi* en un sujeto.

Existen una variedad de formatos de análisis diferentes que son bien conocidos por los expertos en la técnica que se pueden emplear utilizando los cuatro polipéptidos recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF en la presente memoria para detectar los anticuerpos contra *T. cruzi* en una muestra de ensayo. Por ejemplo, en un formato de análisis, uno o más de los polipéptidos recombinantes se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido para unirse a y eliminar uno o más anticuerpos de la muestra de ensayo. El anticuerpo o los anticuerpos unidos se pueden detectar a continuación utilizando una marca detectable que se une al complejo de polipéptido/anticuerpo y contiene la marca detectable. De manera alternativa, se puede utilizar un análisis competitivo, en el que se puede utilizar un anticuerpo que se une a uno o más de los polipéptidos recombinantes, en el que un anticuerpo que se une a uno o más de los polipéptidos se marca con una marca detectable y se permite que se una al polipéptido recombinante inmovilizado después de la incubación con el polipéptido recombinante en la muestra de ensayo. El grado en el que los componentes de la muestra de ensayo inhiben la unión del anticuerpo marcado a uno o más polipéptidos recombinantes es indicativo de la reactividad de la muestra con uno o más de los polipéptidos inmovilizados.

En términos de la marca detectable, se puede utilizar cualquier marca detectable conocida en la en la técnica. Por ejemplo, la marca detectable puede ser una marca radiactiva (tal como, p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , y ^{33}P), una marca enzimática (tal como, p. ej., peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, y similares), una marca quimioluminiscente (tal como, p. ej., éteres de acridinio, luminal, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, y similares), una marca fluorescente (tal como, p. ej., fluoresceína (p. ej., 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexafluoro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (p. ej., selenuro de cadmio protegido terminalmente con sulfuro de cinc), una marca termométrica, o una marca para inmuno-reacción en cadena de la polimerasa. Una introducción a las marcas, los procedimientos de marcaje y la detección de marcas se encuentra en *Introduction to Immunocytochemistry*, 2^a ed., de Polak y Van Noorden, Springer Verlag, N.Y. (1997) y en *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996) de Haugland, que es un manual y catálogo combinado publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos normales en la técnica al que se pueden unir las cuatro (4) proteínas recombinantes. Los ejemplos de los soportes sólidos que se pueden utilizar son un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación, nitrocelulosa, nailon, una cuenta o un disco (que puede estar elaborado de un material de vidrio, fibra de vidrio, látex, plástico o papel), un gel (por ejemplo, un gel a través del cual se han hecho correr los polipéptidos y que se seca con posterioridad) o una tira, disco o lámina (que puede

estar elaborada de nitrocelulosa, nailon, plástico o papel). El formato de análisis preferido para los métodos de la presente invención es un análisis de inmunotransferencia en un formato de ensayo de flujo continuo o en tira. En el formato de ensayo de flujo continuo o en tira, el soporte sólido está en forma de una tira, disco o lámina que se elabora de nitrocelulosa, nailon, plástico o papel. Más preferiblemente, los polipéptidos recombinantes descritos en la presente memoria se inmovilizan sobre dicha tira, disco o lámina. Muy preferiblemente, las proteínas recombinantes se disponen como bandas, manchas o puntos paralelos, separados sobre la tira, disco o lámina (cada uno de los cuales puede ser referido como banda, mancha o punto, "de ensayo" colectivamente como bandas, manchas o puntos de "ensayo"). Las proteínas recombinantes se pueden inmovilizar sobre dicha tira, disco o lámina utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica, por ejemplo técnicas automáticas, tales como eyección de las proteínas recombinantes sobre dicha tira, disco o lámina (utilizando aparatos de eyección tales como los asequibles de Bio-Dot ((tal como AJQ3000 Air Jet Quanti o 4200 - Dip Tank), Irvine, CA) o técnicas manuales, por ejemplo pipeteando las proteínas recombinantes sobre dicha tira, disco o lámina. Si se utiliza una lámina, una vez que todas las proteínas recombinantes se inmovilizan sobre la lámina, la lámina se puede cortar, utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica en tiras para su uso en un análisis. La localización de las proteínas recombinantes (y opcionalmente, de cualquiera de los controles) sobre la tira, disco o lámina no es crítica. Además, la tira, el disco o la lámina se pueden inmovilizar adicionalmente sobre una capa de soporte utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica, tales como encolado, laminación, etc. La capa de soporte se puede elaborar de plástico, cartón, etc. Por ejemplo, una tira o disco de nitrocelulosa se puede laminar sobre una película de plástico sensible a la presión. Adicionalmente de manera opcional, además de cualquier región discreta empleada en la localización de las bandas, manchas o puntos de ensayo integrados, la tira, disco o lámina comprende opcionalmente una región de identificación ("Núm. ID" en la **Figura 1**) empleada para marcar una muestra de manera que se pueda diferenciar de las otras muestras (p. ej., nombre, número, referencia alfanumérica, código de barras, u otros medios apropiados).

Los polipéptidos recombinantes (a saber, FP3, FP6, FP10 y TcF) pueden estar unidos a o inmovilizados sobre el soporte sólido utilizando cualquiera de los mecanismos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, utilizando una técnica de transferencia Western, cuyo método es bien conocido por los expertos en la técnica). Además, y opcionalmente, también se puede inmovilizar uno o más controles sobre el soporte sólido (Por ejemplo para su uso en un análisis de inmunotransferencia, esto es, en un formato de ensayo de flujo continuo o en tira). Los términos "unido" o "inmovilizado" según se utilizan indistintamente en la presente memoria, hacen referencia tanto a la asociación no covalente, tal como la adsorción, como al anclaje covalente (que puede ser una unión directa entre la proteína recombinante) y los grupos funcionales sobre el soporte sólido o puede ser una unión que se efectúe por medio de un agente de entrecruzamiento). Se prefiere la unión mediante adsorción a una tira, disco o lámina. En estos casos, se puede lograr la adsorción poniendo con contacto soluciones de cada uno de los polipéptidos recombinantes, y opcionalmente, cualquier control en un tampón adecuado, con la tira, disco o lámina durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto variará dependiendo de la temperatura, pero se encuentra entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 24 horas.

Si fuera necesario, el anclaje covalente de los polipéptidos recombinantes (y opcionalmente, cualquiera de los controles) a un soporte sólido se puede lograr haciendo reaccionar primero el soporte sólido con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en los polipéptidos recombinantes. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar unidos a soportes que tienen un revestimiento de polímero adecuado utilizando benzoquinona o por medio de la condensación de un grupo aldehído del soporte con una amina y un hidrógeno activo del polipéptido.

Una vez que los polipéptidos recombinantes (y opcionalmente, cualquiera de los controles) se inmovilizan sobre el soporte, el resto de los sitios de unión a la proteína del soporte se bloquean típicamente. Se puede utilizar cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear albúmina de suero bovino ("BSA"), solución salina tamponada con fosfato ("PBS"), soluciones de caseína en PBS, Tween 20® (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), así como otros agentes de bloqueo. Opcionalmente, para el uso de un soporte que comprende un gel que se seca con posterioridad, puede no ser necesario el bloqueo del soporte. Una vez completado el bloqueo, el soporte se puede lavar opcionalmente, por ejemplo con PBS y dejar secar (por ejemplo mediante secado al aire) durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de secado variará dependiendo de la temperatura, pero se encuentra entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 24 horas.

Los polipéptidos inmovilizados recombinantes (y opcionalmente, uno o más controles) se dejan incubando después con la muestra de ensayo. Antes de dicha incubación, la muestra de ensayo puede ser diluida con un diluyente adecuado, tal como PBS. Durante esta incubación, si se encuentra presente cualquiera de los anticuerpos en la muestra de ensayo, estos anticuerpos se unirán a uno o más de los polipéptidos recombinantes sobre el soporte sólido. Generalmente, el período de incubación es un período de tiempo que es suficiente para permitir la detección de la presencia de anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra de ensayo. Preferiblemente, el período de incubación está entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 6 horas. Muy preferiblemente, el período de incubación está entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 4 horas.

La muestra de ensayo no unida se puede separar lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS o tampón Tris (tal como un tampón Tris que contiene Tris 20 mM, Tween 20® al 0,15% y azida de sodio al 0,1%). Se pueden añadir uno o más reactivos detectables al soporte sólido. Los reactivos detectables apropiados son cualquier compuesto que se une al complejo polipéptido-anticuerpo inmovilizado (y opcionalmente cualquiera de los controles inmovilizados) y que puede ser detectado mediante cualquiera de una variedad de métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el reactivo detectable contiene un agente de unión, tal como, por ejemplo, Proteína A, Proteína G, una inmunoglobulina, una lectina o un antígeno libre) conjugado con una marca detectable. La conjugación del agente de unión a la marca detectable se puede lograr utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden adquirir agentes de unión comunes para una variedad de marcas detectables de numerosas fuentes comerciales, incluyendo, pero no limitados a, Zymed Laboratories (San Francisco, CA) y Pierce (Rockford, IL).

Se incuban uno o más reactivos de detección con el complejo de polipéptido-anticuerpo inmovilizado (y opcionalmente, uno o más controles) durante una cantidad de tiempo que sea suficiente para detectar el anticuerpo o los anticuerpos unidos (y opcionalmente, uno o más controles). El tiempo de incubación adecuado se puede determinar generalmente a partir de las instrucciones del fabricante o analizando el nivel de unión que existe a lo largo de un período de tiempo. El reactivo de detección no unido puede ser separado después y el reactivo de detección unido es detectado utilizando la marca detectable. El método utilizado para detectar las marcas detectables dependerá de la naturaleza de las marcas detectables utilizadas en el análisis. Por ejemplo, para marcas radiactivas, se puede utilizar el recuento del centelleo o métodos autorradiográficos. Para las marcas quimioluminescentes o fluorescentes, se pueden utilizar métodos espectroscópicos. Las marcas enzimáticas se pueden detectar generalmente mediante la adición de un sustrato (normalmente durante un período de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico u otro análisis de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra de ensayo, la señal o las señales detectadas a partir de la marca o las marcas detectables que permanecen unidas al soporte sólido se comparan con un valor de corte pre-determinado. Más específicamente, este valor de corte puede ser la señal media promedio obtenida cuando las proteínas recombinantes inmovilizadas se incuban con muestras de un sujeto que no está infectado con *T. cruzi*. En general, una muestra de ensayo que genera una señal que está tres desviaciones típicas por encima de la media se considera positiva para anticuerpos de *T. cruzi* e infección por *T. cruzi*. De manera alternativa, si se emplea un aparato con lectura de luz, oscuridad o color, tal como un densitómetro, que sea capaz de generar un valor numérico, se puede determinar el valor de corte utilizando la Curva Característica Operativa del Receptor ("ROC"), utilizando el método de Sackett et al., Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, págs. 106-107 (Little Brown y Co., 1985). En resumen, el valor de corte se puede determinar a partir de un gráfico de pares de proporciones de verdaderos positivos (esto es, sensibilidad) y proporciones de falsos positivos (esto es, especificidad del 100%) que corresponde a cada posible valor de corte para el resultado del ensayo de diagnóstico. El valor de corte del gráfico es el más próximo a la esquina superior izquierda (esto es, el valor que incluye el área más grande) es el valor de corte más exacto, y una muestra que genera una señal que es superior al valor de corte determinado mediante este método puede ser considerado positivo. De manera alternativa, el valor de corte se puede desplazar hacia la izquierda a lo largo del gráfico, para minimizar la proporción de falsos positivos. En general, una muestra que genera una señal que es superior al valor de corte determinado mediante este método se considera positiva para infección por *T. cruzi*. Preferiblemente, la identificación de una señal que demuestra la unión de anticuerpos a al menos 2 de las 4 proteínas recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF indica la presencia de *T. cruzi* en dicha muestra de ensayo.

Como se ha comentado previamente en la presente memoria, el formato de análisis preferido es un análisis de inmunotransferencia, esto es, un formato de flujo continuo o en tira, donde cuatro polipéptidos recombinantes FP3, FP6, FP10 y TcF se inmovilizan sobre una tira, un disco o una lámina, tal como una tira, un disco o una lámina de nitrocelulosa, nailon, plástico o papel, en forma de al menos cuatro bandas, manchas o puntos de ensayo separados. La inmovilización de cada uno de estos cuatro polipéptidos recombinantes sobre un a tira, un disco o una lámina se puede obtener utilizando las técnicas descritas previamente en la presente memoria. Además de estos cuatro polipéptidos recombinantes (a saber, FP3, FP6, FP10 y TcF) también se pueden incluir opcionalmente en la tira, disco o lámina otros polipéptidos. Por otra parte, además de los cuatro polipéptidos recombinantes, la tira, disco o lámina también contienen inmovilizados sobre ellos en forma de bandas, manchas o puntos de ensayo separados al menos un control (cada uno de los cuales puede ser referido como banda, mancha o punto "de control integrados" colectivamente como bandas, manchas o puntos de "control integrados"). Se prefiere que la tira, disco o lámina contengan inmovilizados sobre ellos dos controles discretos, separados (esto es, un primer control y un segundo control), muy preferiblemente, la tira, disco o lámina pueden contener inmovilizados sobre ellos tres controles discretos, separados (esto es, un primer control, un segundo control y un tercer control). Si se encuentra presente más de un control, los controles pueden ser idénticos entre sí o diferentes unos de otros. Preferiblemente, al menos dos de los controles son idénticos (tal como, por ejemplo, el primer control y el segundo control). Si dos de los controles son idénticos, se prefiere que la concentración de uno de los controles (ya sea el primer control o el segundo control o si están presentes tres controles, el primer control o el tercer control o el segundo control o el tercer control) inmovilizados sobre la tira, disco o lámina sea superior (o mayor) que la del otro control inmovilizado

sobre la tira, disco o lámina. El control inmovilizado sobre la tira, disco o lámina a una concentración superior que el otro control es referido como "control elevado". El control inmovilizado sobre la tira, disco o lámina a una concentración inferior al control elevado es referido como "control bajo". La razón de la concentración de control bajo con respecto a control elevado presente sobre la tira, disco o lámina puede ser de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10, preferiblemente de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:6. Por ejemplo, el primer control puede ser el control bajo y el segundo control puede ser el control elevado. De manera alternativa, el primer control puede ser el control elevado y el segundo control puede ser el control bajo. A modo de otro ejemplo, la tira, disco o tira puede contener 3 controles, esto es, un control bajo y un control elevado así como un tercer control (que se puede utilizar, por ejemplo, para verificar la adición de la muestra). El control bajo y el control elevado pueden ser tanto IgG humana (donde la razón de control bajo con respecto a control elevado es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10) y el tercer control puede ser una anti-IgG humana de cabra.

En el formato de flujo continuo, un extremo de la tira, disco o lámina al cual están unidos los polipéptidos recombinantes se puede sumergir en una solución que contiene la muestra de ensayo. Alternativamente, toda la tira, disco o lámina puede ser colocada en una bandeja de reacción con un diluyente y después la muestra de ensayo puede ser añadida a la bandeja de reacción. La muestra de ensayo y la tira se dejan incubando durante un período de tiempo suficiente utilizando los mismos tiempos y técnicas descritos previamente en la presente memoria. La muestra de ensayo no unida puede ser separada utilizando las técnicas descritas previamente en la presente memoria. En este formato, los anticuerpos de la muestra de ensayo se unen a los polipéptidos inmovilizados (y al como mínimo un control) a medida que la muestra de ensayo pasa a través de la membrana. Se puede añadir al menos un reactivo de detección (tal como un reactivo de detección descrito previamente en la presente memoria que contiene una marca detectable). El al menos un reactivo de detección se une a cada uno de los polipéptidos y complejos polipéptido-anticuerpo formados a medida que la solución que contiene el reactivo de detección fluye a través de la tira. Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra de ensayo, la detección de los reactivos de detección unidos se puede realizar como se ha descrito antes utilizando un corte o comparando la intensidad de una o más señales generadas por uno o más controles como se comenta con más detalle más abajo.

Cuando se utilizan un control bajo y un control elevado como se ha descrito más arriba en el formato de flujo continuo, se prefiere determinar la presencia o ausencia de los anticuerpos de *T. cruzi* en la muestra de ensayo identificando la presencia de una señal de la marca detectable en cada una de las bandas de ensayo (o manchas o puntos) en busca de los polipéptidos. Si se identifica una señal en una banda de ensayo para un polipéptido, la intensidad de esta señal detectada se compara con la intensidad de la señal de la banda (o mancha o punto) de bajo control y la banda (o mancha o punto) de control elevado, utilizando una escala de 0 a 4+. La lectura es 0 cuando no hay banda visible. Las intensidades de la banda de control bajo y la banda de control elevado se definen como 1+ (para el control bajo) y 3+ (para el control elevado), respectivamente. Una banda de ensayo con una intensidad comparable a la del control bajo se puntuaría como 1+. Una banda con una intensidad entre la del control bajo y la del control elevado se puntuaría como 2+. Una banda con una intensidad comparable con la del control elevado se puntuaría como 3+. Una intensidad de banda superior a la del control elevado se puntuaría como 4+. Una banda tenue con una intensidad más débil que la del control bajo se puntuaría como +/- (Véase la Tabla 2). Como se muestra en el algoritmo ilustrativo representado en la Figura 3, si los resultados del análisis de inmunotransferencia son o bien (1) no hay bandas visibles (distintas de las bandas para el control bajo, el control elevado y el control negativo); o (2) solamente es visible una única banda (distinta de las bandas para el control bajo, el control elevado y el control negativo), se considera que la muestra de ensayo es negativa para *T. cruzi*. Como también se muestra en el algoritmo ilustrativo representado en la **Figura 3**, si los resultados del análisis de inmunotransferencia son que dos o más bandas para los polipéptidos recombinantes demuestran una señal, se debe realizar el siguiente análisis. Específicamente, si todas las bandas muestran un intensidad que es más débil que la del control bajo, esto es, todas las bandas están puntuadas como +/-, se considera que la muestra de ensayo es indeterminada para *T. cruzi*. No obstante, si al menos una de las bandas se puntuía como 1+ o superior, se considera que la muestra de ensayo es positiva para anticuerpos de *T. cruzi*.

Tabla 2

Intensidad	Puntuación
Ausente	0
Ténue o < hlgG-L CTL integrada	+/-
= hlgG-L CTL integrada	1+
Entre hlgG-L CTL integrada y hlgG-H CTL	2+
= hlgG-H CTL integrada	3+
> hlgG-H CTL integrada	4+

Los análisis descritos más arriba se pueden realizar utilizando más de los cuatro polipéptidos recombinantes descritos en la presente memoria. Los ejemplos de otros polipéptidos de *T. cruzi* recombinantes que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitados a, JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FcCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1. Las secuencias de aminoácidos y los métodos para elaborar cada uno de estos polipéptidos recombinantes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos para PEP-2, TcD y TcE se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.054.135. Los polipéptidos JL8, TCR27, TCR39, Ag36, JL9, TCNA y FcCaBP se comentan en Frasch, A.C.C. et al., "Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens." Parasitol. Today 7:148-151 (1991). El polipéptido Tc-28 lo comentan Abate, T. et al., en "Cloning and partial characterization of a 28 kDa antigenic protein of Trypanosoma cruzi". Biol. Res., 26:121-130 (1993). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de Tc-40 cDNA la describen Lesenechal, M. et al., en "Cloning and characterization of a gene encoding a novel antigen of Trypanosoma cruzi". Mol. Biochem. Parasitol., 87:193-204 (1997). Los polipéptidos FL-160 y SA85-1.1 son comentados por Centron, M.S. et al. en "Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigen of Trypanosoma cruzi in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas disease". Acta Trop., 50:259-266 (1992). El polipéptido CEA el comentado por Jazin, E.E. et al. en "Trypanosoma cruzi exoantigen is a member of a 160 kDa gene family". Parasitol., 110:61-69 (1995). La secuencia de aminoácidos para CRP (identificado como CRP-10) es descrita por Norris, K.A. et al., en "Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton Trypanosoma cruzi complement regulatory protein". Infect Immun 65:349-357 (1997). El polipéptido JL7 lo comenta Umezawa, ES, et al., J. Clinical Microbiology, 37:1554-1560 (1999) y Cotrim, PC, et al., J. Clinical Microbiology, 28:519-524 (1990). El polipéptido TcLo1.2 lo comenta en Houghton, RL, et al., J. Infectious Diseases, 179:1226-1234 (1999). El polipéptido TcP2 β _N-C29 lo describe Aguirre, S., et al., J Clin. Microbiology, 44(10):3768-3774 (Oct. 2006). El péptido TS lo describe Da Silveira, et al., Trends in Parasitology, Vol.17, NO.6 Junio 2001, 286-291.

Además, el inmunoanálisis puede ser revisado para que incluya adicionalmente antígenos polipeptídicos para la detección de otras enfermedades, trastornos o afecciones, especialmente para la detección de otras enfermedades por parásitos. Junto con los parásitos que causan la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), los parásitos que causan la enfermedad del sueño Africana (Tripanosomiasis Africana) y la leishmaniasis ocasionan enfermedades humanas mortales que afectan a quinientos millones de las personas más pobres del mundo. De este modo, opcionalmente, una inmunotransferencia de acuerdo con la invención comprende además polipéptidos para la detección de otras enfermedades por parásitos tales como la enfermedad del sueño Africana y/o la leishmaniasis.

A modo de ejemplo, y no de limitación, se proporcionarán a continuación ejemplos de la presente invención.

35 EJEMPLO 1: Formato de Análisis de Inmunotransferencia

Preparación de la Tira Inmunológica. Se prepararon soluciones de IgG humana de elevada concentración ("IgG-H"), IgG humana de baja concentración ("IgG-L"), anti-IgG humana de cabra (las 3 bandas de control integradas), así como los antígenos recombinantes ("rAgs") FP10, FP6, FP3, y TcF (las 4 bandas de ensayo). Específicamente, cada proteína se disolvió a pH 7, tampón 3-(N-morfolino)-2-hidroxiopropanosulfonato de sodio 20 mM. Utilizando un sistema dispensador XYZ3050 controlado por un microprocesador Bio-Dot (Irvine, CA) se eyectó 1 microlitro por cm de cada proteína sobre láminas de membrana de nitrocelulosa (0,45 micras, 5 x 30 cm; Whatman Schleicher & Schell, Keene, NH) en líneas paralelas en las posiciones relativas representadas en la Figura 1. Las concentraciones de las soluciones de eyección fueron las siguientes: TcF a 75 microgramos/ml; FPP3 a 0,4 microgramos/ml; FP6 a 0,7 microgramos/ml; FP10 a 6 microgramos/ml; anti-IgG humana de cabra a 25 microgramos/ml; IgG-L a 2,5 microgramos/ml y 15 microgramos para IgG-H. Después de secar (37°C, 30 minutos), la membrana se bloqueó con caseína al 1% sobre solución salina tamponada con fosfato ("PBS"), se lavó varias veces en PBS, y de nuevo se secó al aire. Como etapa final, la lámina de membrana se laminó con un plástico sensible a la presión y se cortó en tiras de 4 mm de ancho. La carga de las proteínas se ajustó de manera que el espécimen de control negativo (Figura 2, tira 1) no mostró ninguna de las bandas de ensayo (distintas de las bandas de control – anti-IgG humana de cabra, IgG-L e IgG-H) y el espécimen de control positivo (Figura 2, tira 2) mostró 4 bandas de ensayo, mientras en ambos casos las 3 bandas de control fueron reactivas. Un panel de muestras reactivas (Figura 2, tiras 3 a 6) mostró de 1 a 4 bandas de ensayo, además de las 3 bandas de control.

Especímenes de control. El control negativo fue plasma humano normal recalcificado que dio negativo en análisis para el antígeno de superficie de la hepatitis B ("HBsAg") y para los anticuerpos para la proteína núcleo del virus de la hepatitis B ("HBnúcleo"), virus de la hepatitis C ("HCV"), virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH") y virus linfotrófico de las células T humanas ("HTLV"). El control positivo para anticuerpos de *T. cruzi* fue de una reserva de varias unidades de plasma recogidas de donantes de sangre diagnosticados de enfermedad de Chagas. El plasma positivo se confirmó como positivo mediante varios ensayos para anticuerpos de *T. cruzi*, incluyendo ELISA-I (un ensayo basado en el producto lisado asequible comercialmente en Latinoamérica), ELISA-II (un ensayo 510(k)-aclarado basado en antígenos recombinantes), y RIPA.

Procedimiento de ensayo. Se incluyeron especímenes de control positivo y negativo en cada ronda. Se sometieron muestras de suero o plasma congeladas previamente a microcentrifugación (14.000 rpm, 5 minutos) en tubos Eppendorf de 1,5 ml antes del ensayo para separar la materia particulada, las muestras que nunca habían sido congeladas no se centrifugaron. Se colocó 1 ml de diluyente y una tira inmunológica en cada depresión de una bandeja de reacción de inmunotransferencia (Bio-Rad, Hercules, CA) y se incubó durante 5 min. Durante cada etapa de incubación los contenidos de las depresiones se mezclaron suavemente sobre un balancín. Se añadió una muestra de 20 µl a cada depresión que contenía una tira en diluyente y se incubó a la temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de aspiración y tres lavados con un tampón Tris (pH 8,0, Tris 20 mM, Tween-20 al 0,15% y azida de sodio al 0,1%). Se añadió 1 ml de una solución de anti-hIgG de cabra conjugada con fosfatasa alcalina a cada depresión. Después de una hora de incubación, cada depresión fue aspirada y lavada tres veces. Después de esto, se añadieron 0,7 ml de una solución sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio ("BCIP/NBT"; 1 comprimido en 20 ml de agua destilada; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a cada pocillo y se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos para el desarrollo de color. Esto estuvo seguido de aspiración y tres lavados con agua destilada para detener el desarrollo de color. Con posterioridad, las tiras se separaron de las depresiones y se secaron al aire para su lectura visual. El tiempo de análisis total fue de aproximadamente 4 horas.

Interpretación de los resultados del ensayo. La reactividad con anticuerpos de *T. cruzi* en un espécimen de ensayo se determina mediante comparación visual de las intensidades de las 4 bandas de ensayo con las intensidades de las dos bandas de control de IgG en la parte superior de la tira, utilizando una escala de 0 a 4+. La lectura es 0 cuando no hay una banda visible, y las intensidades de las bandas de control de IgG-L e IgG-H se definen como 1+ y 3+ respectivamente. Con estas referencias en mente, una banda de ensayo con una intensidad comparable a la del control de IgG-L humana se puntuaría como 1+; una banda con una intensidad entre la del control de IgG-L y la del control de IgG-H se puntuaría como 2+; una banda con una intensidad comparable a la del control de IgG-H se puntuaría como 3+; y una intensidad de banda superior a la del control de IgG-H se puntuaría como 4+. Finalmente, una banda tenue con una intensidad más débil que la del control de IgG-L se puntuaría como +/-.

Otros análisis serológicos. El análisis PRISM® de Abbott para Chagas (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) se realizó como han descrito previamente Chang, C.D., et al., *Transfusion* 46:1737-1744 (2006). El RIPA se llevó a cabo como se ha esbozado antes (Véase, Kirchoff, L.V., et al., *J. Infect. Dis.*, 155:561-564 (1987) y Kirchoff, L.V., et al., *Transfusion*, 46:298-304 (2006)), y todo el ensayo RIPA se realizó a ciegas.

Especímenes Chagásicos. Se obtuvieron un total de 345 especímenes de suero o plasma humano positivos para anticuerpos de *T. cruzi* de la Cruz Roja Americana, Antibody Systems (Hurst, TX), BioClinical Partners (Franklin, MA), Biocollections Worldwide, Inc. (Miami, FL), Boston Biomedica, Inc. (BBI, West Bridgewater, MA), Goldfinch Diagnostics Inc. (Iowa City, IA), Teragenix Corp. (Ft. Lauderdale, FL.), y la Federal University of Bahia (Salvador, Bahia, Brasil). Estos especímenes procedían de personas que adquirieron *T. cruzi* en la mayor parte de los países de América Central y Sudamérica, así como Méjico y los Estados Unidos (Véase la Tabla 3, más abajo). Todos ellos fueron positivos en 2 o 3 inmunoanálisis para *T. cruzi* convencionales (IHA, IFA, y ELISA) y también el RIPA.

Tabla 3

<u>País de Origen</u>	<u>Núm. de Muestras</u>
Argentina	40
Bolivia	53
Brasil	126
Chile	5
Colombia	1
Ecuador	1
El Salvador	12
Honduras	1
Méjico	17
Nicaragua	16
Surinam	1
USA	4
Venezuela	21

<u>País de Origen</u>	<u>Núm. de Muestras</u>
Desconocido	44

Población de donantes al azar. Se obtuvieron un total de 500 especímenes de donantes seleccionados al azar (sueros (150) y plasma con EDTA (350)), del Gulf Coast Regional Blood Center (Houston, TX). Estos especímenes no ligados se recogieron de donantes al azar y no se eliminaron especímenes de este grupo debido a los resultados positivos en cualquiera de los seis ensayos rutinarios realizados en las unidades donadas. Todos los especímenes se sometieron a ensayo a los 10 días de la recogida tanto en el análisis de inmunotransferencia como en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott. Todas las muestras reactivas con valores S/CO de 0,90 o mayores en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott se sometieron a ensayo en ELISA-I, ELISA-II, y RIPA.

Especímenes potencialmente problemáticos. En el análisis de inmunotransferencia se hicieron circular un total de 271 especímenes de suero o plasma archivados, serológicamente positivos para otras enfermedades o que contenían sustancias que interferían potencialmente. Este grupo incluía especímenes de personas con citomegalovirus ("CMV") (n = 4), Virus de Epstein-Barr ("EBV") (n = 14), virus de la hepatitis A ("HAV") (n = 10), helmintos o protozoos intestinales (n = 5), HIV (n = 10), virus del herpes simplex ("HSV") (n = 15), lepra (n = 15), rubeola (n = 10), sífilis (n = 10), toxoplasmosis (n = 5), tuberculosis (n = 3), levadura (n = 10), virus varicela-zoster ("VZV") (n = 10), hemólisis (n = 20), hiper-IgG (n = 10), hiper-IgM (n = 10), hiperbilirubinemia (n = 10), hipertrigliceridemia (n = 15), vacunados de influenza (n = 15), mieloma múltiple (n = 15), esclerosis múltiple (n = 5), factor reumatoide (n = 15), anticuerpos anti-ratón humanos (n = 15), lupus eritematoso generalizado (n = 11), y leishmaniasis (n = 9). Fueron adquiridos de diferentes proveedores incluyendo New York Biologicals (Nueva York, NY), ProMedDx (Norton, MA), SeraCare Life Sciences, Inc. (West Bridgewater, MA), y Hemacare Bioscience (Ft. Lauderdale, FL.). Estas 271 muestras se sometieron a ensayo en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención y el análisis para Chagas PRISM® de Abbott prototipo. Todos los especímenes que fueron repetidamente reactivos en el último fueron sometidos a ensayo en ELISA-I, ELISA-II, y después confirmados además en RIPA.

Resultados. Los resultados obtenidos con el análisis de inmunotransferencia de la presente invención se muestran en la **Figura 1**, donde las localizaciones de las tres bandas de control integradas y las cuatro bandas de ensayo para rAg (FP10, FP6, FP3 y TcF) son claramente evidentes. Los 345 especímenes positivos para anticuerpos para *T. cruzi* mostraron dos o más bandas de ensayo en el análisis de inmunotransferencia. Un total de 277 de estos especímenes mostraron cuatro bandas de ensayo, 60 mostraron tres bandas, 8 mostraron dos bandas, y digno de mención, ninguno mostró una única banda o fue completamente negativo. La mayor parte de las bandas de ensayo con las muestras positivas mostraron una intensidad igual o mayor que la de la banda de control de IgG-L (1+). Por otra parte, los 345 especímenes fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott y en ELISA-II. Por el contrario, seis de los 272 especímenes de este grupo de 345 que fueron sometidos a ensayo en el ELISA-I fueron negativos, aunque seis tuvieron valores S/CO por encima de la línea base, oscilando de 0,60 a 0,89 (Véase la Tabla 4, más abajo). Estas muestras discordantes fueron confirmadas como positivos débiles en RIPA y mostraron dos o tres bandas en el análisis de inmunotransferencia, con al menos una intensidad de banda de 1+ o superior. Debido al nivel de detección más bajo del ELISA-I observado en el ensayo de los primeros 272 especímenes positivos, éste se excluyó de otras comparaciones de sensibilidad con otros análisis en muestras chagásicas recién adquiridas, aunque se utilizó para verificar repetidamente muestras reactivas del análisis para Chagas PRISM® de Abbott.

Tabla 4

ID Muestras	Análisis Chagas ABBOTT S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotransferencia	
					Bandas de Ensayo presentes	Interpretación
Rag-40218	4,40	0 66	2,62	+ (Débil)	Dos	Positivo
Rag-40224	3,86	0,77	3,56	+ (Débil)	Tres	Positivo
RR04	1,52	083	3,02	+ (Débil)	Tres	Positivo
RR52	2,07	0,83	3,56	+	Tres	Positivo
RR115	1,50	060	3,53	+ (Débil)	Dos	Positivo

ID Muestras	Análisis Chagas ABBOTT S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotransferencia	
					Bandas de Ensayo presentes	Interpretación
RR334	2,37	0,89	3,35	+ (Débil)	Dos	Positivo

Los 500 especímenes de donantes al azar se sometieron a ensayo en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención y también en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott prototipo. En el inmunoanálisis de la presente invención, un espécimen dio una única banda de ensayo 1+ y otras dos bandas mostraron una banda de ensayo tenue (+/-). Ninguna de estas muestras fue reactiva en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott ni en ninguno de los dos ELISA; por lo tanto, estas muestras no se enviaron al RIPA. En vista de los resultados negativos obtenidos con estos tres especímenes en los tres análisis de comparación, parece que la reactividad limitada observada en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención no es específico.

De los 271 especímenes con diferentes dolencias o sustancias potencialmente obstaculizadoras sometidas a ensayo en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención, 265 no mostraron bandas de ensayo, cuatro dieron una única banda 1+, y dos mostraron tres bandas de ensayo. Los cuatro especímenes con una única banda de ensayo no fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott. Sin embargo, ambos especímenes que mostraron tres bandas de ensayo también fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott, ELISA-I, y ELISA-II, y se confirmó que daban positivo en el RIPA (Véase la Tabla 5, más abajo). Además, como se muestra en la Tabla 5 más abajo, tres especímenes que dieron valores S/CO por encima de 0,90 en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott no se confirmaron mediante RIPA y no mostraron bandas de ensayo en el análisis de inmunotransferencia.

Tabla 5

ID Muestra	Análisis Chagas PRISM® Abbott S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotrasferencia	
					Bandas de ensayo presentes	Interpretación
Protozoico ^a , 2e03	9,55	3,02	2,82	Positivo	Tres	Positivo
Lepra ^b , 3b10	9,96	2,36	2,92	Positivo	Tres	Positivo
HAMA ^c , Núm.1	11,92	032	1,10	Negativo	Ninguna	Negativo
HSV-1, Núm. 2	0,92	065	0,15	Negativo	Ninguna	Negativo
HSV-2, Núm. 4	4,01	065	0,26	Negativo	Ninguna	Negativo

^aDonante Brasileño, dio positivo en una prueba para protozoo intestinal
^bDonante Brasileño
^cAnticuerpos anti-ratón de ser humano ("HAMA")

Basándose en los resultados obtenidos sometiendo a ensayo estos tres grupos de especímenes, que suman 1.116, se puede utilizar el siguiente esquema para interpretar los patrones de bandas de ensayo que aparecen en las tiras inmunológicas: a) sin banda o una única banda - negativo; b) dos o más bandas con al menos una banda que tiene una intensidad de 1+ o superior - positivo; y c) múltiples bandas tenues (+/-) - indeterminado (Véase la **Figura 3**).

Cuando se aplica este esquema a los patrones de bandas de ensayo obtenidos con los 345 especímenes positivos para anticuerpos de *T. cruzi*, todos se consideran positivos, dando de este modo una sensibilidad del 100% (345/345). Con los 500 especímenes de donantes al azar, 497 no mostraron bandas de ensayo, dos mostraron una única banda 1+, y 1 mostró una banda tenue (+/-); de este modo todos son negativos y la especificidad resuelta es del 100% (500/500). Finalmente, utilizando este esquema, el análisis de inmunotransferencia de la presente

invención mostró una especificidad resuelta del 100% (269/269) en los 271 especímenes con dolencias o sustancias obstaculizadoras.

- 5 Durante el desarrollo del análisis para Chagas PRISM® de Abbott y el análisis de inmunotransferencia, se sometieron a ensayo aproximadamente 42.000 especímenes de suero y plasma no ligados de donantes al azar de los Estados Unidos y se encontró que 21 fueron repetidamente reactivos o en la zona gris en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott. Seis especímenes del último grupo fueron reactivos en ELISA-I y ELISA-II, y se confirmó que eran positivos mediante RIPA (Véase la Tabla 6, más abajo). Cinco de estos seis especímenes mostraron tres o cuatro bandas de ensayo en el análisis de inmunotransferencia y por consiguiente se interpretó que eran positivos.
- 10 El sexto espécimen de este grupo, Núm. 5060, no pudo ser sometido a ensayo en el análisis de inmunotransferencia porque se agotó antes de que comenzara el desarrollo del último.

Tabla 6

ID Muestra	Análisis Chagas PRISM® Abbott S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotransferencia	
					Bandas de Ensayo presentes	Interpretación
Núm. 437	10,9	3,58	2,31	+	Cuatro	Positivo
Núm. 5060	6,78	2,64	7,27	+	NT*	NA
Núm. 161	7,85	2,89	8,10	+	Cuatro	Positivo
Núm. S2712	2,90	1,46	5,00	+ (Débil)	Tres	Positivo
Núm. S108677	1,58	1,13	2,74	+	Tres	Positivo
Núm. P91	7,92	2,53	3,20	+	Cuatro	Positivo

*NT= no sometido a ensayo debido a un volumen insuficiente

- 15 Los quince especímenes restantes reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott, la mayoría de los cuales tenía S/CO relativamente bajos, fueron todos negativos en RIPA (Véase la Tabla 7, más abajo). Todos fueron negativos en ELISA-I, pero dos fueron reactivos y dos estuvieron en la zona gris en ELISA-II. En el análisis de inmunotransferencia, ocho de estos 15 especímenes no mostraron bandas de ensayo y los otros siete mostraron una única banda, incluyendo el Núm. 1660 que mostró una única banda FP3 como Tira 3 en la Figura 2. De este modo los quince fueron resueltos como negativos cuando se aplicó el esquema de interpretación descrito más arriba.
- 20

Tabla 7

25

ID Muestra	Análisis Chagas PRISM® Abbott S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotransferencia	
					Bandas de Ensayo presentes	Interpretación
Núm. P1497	2,92	0,26	2,23	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P1660	2,64	0,42	2,75	Neg	Bandas FP3 única (2+)	Negativo
Núm. P1705	1,50	045	013	Neg	Ninguna	Negativo

ID' Muestra	Análisis Chagas PRISM® Abbott S/CO	ELISA-I (Producto Lisado) S/CO	ELISA-II (rAg) S/CO	RIPA	Inmunotransferencia	
					Bandas de Ensayo presentes	Interpretación
Núm. P1788	1,05	037	0,13	Neg	Banda TcF única tenue (+/-)	Negativo
Núm. P2171	1,66	047	014	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P3881	1,61	023	0,12	Neg	Banda TcF única tenue (+/-)	Negativo
Núm. P6257	2,13	047	014	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P6817	2,65	088	058	Neg	Banda FP10 única tenue (+/-)	Negativo
Núm. P7087	1,00	029	0,14	Neg	Banda FP6 única tenue (+/-)	Negativo
Núm. P7957	2,25	056	0,90	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P8956	0,90	0,77	0,18	Neg	Banda TcF única tenue (+/-)	Negativo
Núm. P9026	1,12	0,42	016	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P9228	1,81	024	017	Neg	Ninguna	Negativo
Núm. P9807	1,00	038	034	Neg	Banda FP6 única	Negativo
Núm. S108760	1,83	0,64	0,95	Neg	Ninguna	Negativo

El análisis para Chagas por inmunotransferencia de la presente invención proporciona 14 dominios antigénicos distintos, incluyendo segmentos repetitivos así como no repetitivos, en solamente cuatro bandas de ensayo (Véase la Tabla 1). Esta disposición mantiene el potencial para reducir considerablemente el riesgo de reacciones falsas negativas, mientras permite al mismo tiempo el simple esquema de interpretación presentado en la Figura 3. Este esquema de interpretación fue desarrollado analizando los resultados obtenidos haciendo funcionar el análisis de inmunotransferencia de la presente invención en los tres grupos de especímenes positivos y negativos descritos más arriba. Los resultados indican claramente que se requiere reactividad en dos bandas de ensayo para una interpretación positiva. La adopción de un esquema de interpretación en el que se requieren dos bandas de ensayo reactivas para la confirmación de anticuerpos anti-*T. cruzi* está en línea con la interpretación de las transferencias Western utilizadas para confirmar el VIH (Véanse, Maldarelli, F, "Diagnosis of human immunodeficiency virus infection", págs. 1506-1527. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, y R. Dolin (eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases. John Wiley & Sons, Nueva York) y la borreliosis de Lyme (Véase, Agüero-Rosenfeld, M.E., Clin. Microbiol., Rev., 18:484-509 (2005)) y con el análisis de inmunotransferencia recombinante para anticuerpos para HCV (Véase, Tobler, L.H., Transfusion, 40:917-923 (2000)), de los cuales los tres requieren más de una banda de ensayo reactiva para la identificación positiva de una infección específica.

Por otra parte, con respecto al análisis de inmunotransferencia de la presente invención, como se ha indicado, en el grupo de 345 especímenes que se sabe que son positivos para los anticuerpos para *T. cruzi*, la sensibilidad del análisis fue del 100%. Este resultado fue particularmente interesante, dada la diversidad geográfica de los especímenes (Véase la Tabla 3 de más arriba) y el hecho de que no hubo pre-selección para títulos elevados. Todos

los especímenes de este grupo fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott y el ELISA-II recombinante, pero seis de los 272 especímenes sometidos a ensayo en el ELISA-I basado en productos lisados fueron negativos. Los seis fueron positivos débiles en el RIPA, y estos resultados sugieren que se encontraba presente un amplio intervalo de reactividad con los antígenos de *T. cruzi* en el grupo de 345 positivos y que el análisis de inmunotransferencia es capaz de detectar positivos de título bajo.

En los dos grupos de especímenes presumiblemente negativos para anticuerpos para *T. cruzi*, la especificidad del análisis de inmunotransferencia de la presente invención fue del 100% cuando se utilizó el esquema interpretativo descrito más arriba y mostrado en la Figura 3. Los 500 especímenes de donantes al azar de Texas, todos los cuales dieron negativo en el análisis de inmunotransferencia, también dieron negativo en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott y en los dos ELISA y por consiguiente no fueron sometidos a ensayo en RIPA. En los 271 especímenes sometidos a ensayo que reaccionan de manera cruzada potencialmente, dos especímenes Brasileños, de pacientes con lepra y una infección por protozoo intestinal, dieron positivo en el análisis de inmunotransferencia (tres bandas de ensayo) y también dieron claramente positivo en los otros análisis, incluyendo RIPA, sugiriendo de ese modo que son verdaderos positivos (Véase la Tabla 5, más arriba). Los tres especímenes de los Estados Unidos fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott y uno fue reactivo en ELISA-II; no obstante, todos fueron negativos en ELISA-I y RIPA. En gran medida, ninguno de estos especímenes mostró ninguna banda de ensayo en el análisis de inmunotransferencia de la presente invención, sugiriendo de este modo que el último es una herramienta útil para resolver especímenes que son discordantes en los otros análisis. En términos generales, la especificidad resuelta del análisis de inmunotransferencia en este grupo de especímenes de prueba fue del 100% (269/269).

El estudio de un grupo final de especímenes también demuestra la utilidad del análisis de inmunotransferencia de la presente invención como un ensayo de confirmación. Como se ha explicado más arriba, en estudios de aproximadamente 42.000 donantes al azar de los Estados Unidos no ligados, 21 especímenes fueron reactivos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott o el análisis de inmunotransferencia. Seis de las muestras fueron globalmente positivas, y las cinco para las cuales quedó un volumen suficiente fueron claramente positivas en el análisis de inmunotransferencia, mostrando tres o cuatro bandas de ensayo (Véase la Tabla 6, más arriba). Con respecto a los resultados obtenidos con los otros 15 especímenes en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott (Véase la Tabla 7, más arriba), todos estos especímenes tuvieron S/CO relativamente bajos en el análisis para Chagas PRISM® de Abbott y fueron algo reactivos pero finalmente resultaron negativos en ELISA-I. Cuatro de los 15 especímenes fueron reactivos en ELISA-II. En gran medida, los 15 especímenes fueron negativos en RIPA, y de nuevo es digno de mención que todos los ensayos RIPA se realizaron de manera ciega. Por último, los 15 especímenes también fueron negativos en el análisis de inmunotransferencia. Como resulta evidente a partir de la Tabla 7, aproximadamente la mitad de los especímenes mostró una cierta reactividad, pero ninguno fue positivo cuando se utilizó el esquema de interpretación descrito más arriba y mostrado en la Figura 3. Teniendo en cuenta que estos 15 especímenes son quizás los más sensibilizadores del grupo total de 42.000 sometidos a ensayo, resultó inesperado que fueran todos resueltos por medio del análisis de inmunotransferencia de la presente invención de una manera que concordaba al 100% con los resultados de RIPA. En conclusión, estos descubrimientos y aquellos generados sometiendo a ensayo los otros grupos de especímenes estudiados en este ejemplo indican que el análisis de inmunotransferencia de la presente invención puede proporcionar un ensayo exacto para la confirmación serológica de la infección crónica por *T. cruzi*.

Un experto en la técnica apreciaría fácilmente que la presente invención está bien adapta para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a ella. Los complejos moleculares y los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas, compuestos específicos descritos en la presente memoria son actualmente representativos de las realizaciones preferidas, son ilustrativos, y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención. Resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar sustituciones variables y modificaciones de la invención descrita.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención.

La invención descrita ilustrativamente en la presente memoria se puede poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en la presente memoria. De este modo, por ejemplo, en cada caso de la presente memoria cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser remplazado por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no se pretende que el uso de tales términos y expresiones excluya cualquiera de los equivalentes de los rasgos mostrados y descritos o sus porciones, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. De este modo, se debe entender que aunque la presente invención ha sido descrita específicamente por medio de las realizaciones preferidas y rasgos opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos descritos en la presente memoria, y que tales

modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Shah, Dinesh
 Chang, Chi-Deu
 Schochetman, Gerald
 Cheng, Kevin

10 <120> MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y DIAGNOSIS DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA
 CRUZI

<130> 8338.US.01

15 <140> PCTUS0781735
 <141> 2007-10-18

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1
 <211> 693
 <212> PRT
 <213> T. cruzi

25 <400> 1

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110

ES 2 372 547 T3

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
145 150 155 160

Ala Gln Leu Gln Gln Ala Glu Asn Asn Ile Thr Asn Ser Lys Lys Glu
165 170 175

Met Thr Lys Leu Arg Glu Lys Val Lys Lys Ala Glu Lys Glu Lys Leu
180 185 190

Asp Ala Ile Asn Arg Ala Thr Lys Leu Glu Glu Glu Arg Asn Gln Ala
195 200 205

Tyr Lys Ala Ala His Lys Ala Glu Glu Glu Lys Ala Lys Thr Phe Gln
210 215 220

Arg Leu Ile Thr Phe Glu Ser Glu Asn Ile Asn Leu Lys Lys Arg Pro
225 230 235 240

Asn Asp Ala Val Ser Asn Arg Asp Lys Lys Lys Asn Ser Glu Thr Ala
245 250 255

Lys Thr Asp Glu Val Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala
260 265 270

Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu
275 280 285

Ala Glu Lys Arg Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu
290 295 300

Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln
305 310 315 320

Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala
325 330 335

Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu
340 345 350

ES 2 372 547 T3

Ala Met Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala
 355 360 365

Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val
 370 375 380

Ala Glu Ala Glu Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu
 385 390 395 400

Thr Glu Lys Gln Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu
 405 410 415

Lys Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Glu Thr Glu Lys Gln
 420 425 430

Arg Ala Ala Glu Ala Thr Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Asp Ile Asp
 435 440 445

Pro Met Gly Ala Cys Gly Ser Lys Asp Ser Thr Ser Asp Lys Gly Leu
 450 455 460

Ala Ser Asp Lys Asp Gly Lys Asn Ala Lys Asp Arg Lys Glu Ala Trp
 465 470 475 480

Glu Arg Ile Arg Gln Ala Ile Pro Arg Glu Lys Thr Ala Glu Ala Lys
 485 490 495

Gln Arg Arg Ile Glu Leu Phe Lys Lys Phe Asp Lys Asn Glu Thr Gly
 500 505 510

Lys Leu Cys Tyr Asp Glu Val His Ser Gly Cys Leu Glu Val Leu Lys
 515 520 525

Leu Asp Glu Phe Thr Pro Arg Val Arg Asp Ile Thr Lys Arg Ala Phe
 530 535 540

Asp Lys Ala Arg Ala Leu Gly Ser Lys Leu Glu Asn Lys Gly Ser Glu
 545 550 555 560

Asp Phe Val Glu Phe Leu Glu Phe Arg Leu Met Leu Cys Tyr Ile Tyr
 565 570 575

Asp Phe Phe Glu Leu Thr Val Met Phe Asp Glu Ile Asp Ala Ser Gly
 580 585 590

ES 2 372 547 T3

Asn Met Leu Val Asp Glu Glu Glu Phe Lys Arg Ala Val Pro Arg Leu
595 600 605

Glu Ala Trp Gly Ala Lys Val Glu Asp Pro Ala Ala Leu Phe Lys Glu
610 615 620

Leu Asp Lys Asn Gly Thr Gly Ser Val Thr Phe Asp Glu Phe Ala Ala
625 630 635 640

Trp Ala Ser Ala Val Lys Leu Asp Ala Asp Gly Asp Pro Asp Asn Val
645 650 655

Pro Glu Ser Pro Arg Pro Met Gly Ile Asp Ile Gly Ser Glu Phe Glu
660 665 670

Leu Arg Arg Gln Ala Cys Gly Arg Thr Arg Ala Pro Pro Pro Pro
675 680 685

Leu Arg Ser Gly Cys
690

<210> 2
<211> 994
<212> PRT
<213> T. cruzi

5

<400> 2

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

10

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly

ES 2 372 547 T3

	100					105					110					
Ser	Gly	His	Met	His	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro
	115							120					125			
Arg	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	
	130					135					140					
His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Met	
145					150				155						160	
Gly	Tyr	Leu	Trp	Ile	Arg	Ile	Arg	Ser	Ala	Arg	Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	
				165					170					175		
Lys	Leu	Lys	Leu	Asn	Gln	Gln	Asn	Lys	Pro	His	Ile	Ala	Asn	Asn	Lys	
			180					185					190			
Gln	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Thr	Gln	Thr	Glu	Gln	Lys	Thr	Ala	Pro	
		195					200						205			
Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	
	210					215					220					
Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Lys	Pro	Pro	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	
				245						250				255		
Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Pro	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	
			260					265					270			
Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	
		275					280						285			
Lys	Pro	Pro	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Pro	Pro	
	290					295					300					
Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Pro	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	
305					310					315					320	
Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Pro	Pro	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	
				325					330					335		
Lys	Pro	Ser	Leu	Phe	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Pro	Ser	Pro	
			340					345					350			

ES 2 372 547 T3

Phe Gly Gln Gly Thr Ala Phe Asp Ala Ser Arg Ser Thr Val Phe Ala
 355 360 365

Asn Ala Pro Gly Val Ala Leu Asp Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys
 370 375 380

Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu
 385 390 395 400

Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro
 405 410 415

Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe
 420 425 430

Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg
 435 440 445

Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg
 450 455 460

Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu
 465 470 475 480

Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp
 485 490 495

Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp
 500 505 510

Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser
 515 520 525

Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp
 530 535 540

Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu
 545 550 555 560

Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg
 565 570 575

Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala
 580 585 590

ES 2 372 547 T3

Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys
 595 600 605

Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro
 610 615 620

Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu
 625 630 635 640

Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys
 645 650 655

Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu
 660 665 670

Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro
 675 680 685

Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe
 690 695 700

Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg
 705 710 715 720

Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg
 725 730 735

Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu
 740 745 750

Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp
 755 760 765

Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp
 770 775 780

Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser
 785 790 795 800

Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp
 805 810 815

Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu
 820 825 830

ES 2 372 547 T3

Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg
835 840 845

Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys Glu Ile Ala Ala
850 855 860

Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu Ala Arg Glu Lys
865 870 875 880

Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro Glu Gly Val Pro
885 890 895

Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe Val Ala Met Glu
900 905 910

Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Asp Lys Asp Pro Arg Arg Asn Ala Lys
915 920 925

Glu Ile Ala Ala Leu Glu Glu Ser Met Asn Ala Arg Ala Gln Glu Leu
930 935 940

Ala Arg Glu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ala Phe Leu Asp Gln Lys Pro
945 950 955 960

Glu Gly Val Pro Leu Arg Glu Leu Pro Leu Asp Asp Asp Ser Asp Phe
965 970 975

Val Ala Met Glu Gln Glu Arg Arg Gln Leu Leu Glu His His His His
980 985 990

His His

<210> 3

<211> 722

<212> PRT

<213> T. cruzi

<400> 3

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp

5

10

ES 2 372 547 T3

35	40	45
Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn 50	55	60
Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu 65	70	75
Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser 85	90	95
Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly 100	105	110
Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro 115	120	125
Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln 130	135	140
His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met 145	150	155
Gly Tyr Leu Trp Ile Arg Ile Arg Pro Ser Gly Ala Asp Pro Thr Tyr 165	170	175
Arg Phe Ala Asn His Ala Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Thr Ile His 180	185	190
Glu Val Pro Ser Val Ala Ser Pro Leu Leu Gly Ala Ser Leu Asp Ser 195	200	205
Ser Gly Gly Lys Lys Leu Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Glu Lys His Gln 210	215	220
Trp Gln Pro Ile Tyr Gly Ser Thr Pro Val Thr Pro Thr Gly Ser Trp 225	230	235
Glu Met Gly Lys Arg Tyr His Val Val Leu Thr Met Ala Asn Lys Ile 245	250	255
Gly Ser Val Tyr Ile Asp Gly Glu Pro Leu Glu Gly Ser Gly Gln Thr 260	265	270
Val Val Pro Asp Glu Arg Thr Pro Asp Ile Ser His Phe Tyr Val Gly 275	280	285

ES 2 372 547 T3

Gly Tyr Gly Arg Ser Asp Met Pro Thr Ile Ser His Val Thr Val Asn
 290 295 300

Asn Val Leu Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu Glu Ile Arg Thr
 305 310 315 320

Leu Phe Leu Ser Gln Asp Leu Ile Gly Thr Glu Ala His Met Gly Ser
 325 330 335

Ser Ser Gly Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Ile Pro Val Asp Ser
 340 345 350

Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly
 355 360 365

Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr
 370 375 380

Pro Val Asp Ser Ser Ala His Gly Thr Pro Ser Thr Pro Val Asp Ser
 385 390 395 400

Ser Ala His Gly Lys Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser
 405 410 415

Thr Pro Ser Thr Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Ile
 420 425 430

Pro Ala Asp Ser Ser Ala His Ser Thr Pro Ser Ala Pro Ala Asp Asn
 435 440 445

Gly Ala Asn Gly Thr Val Leu Ile Leu Ser Thr His Asp Ala Tyr Arg
 450 455 460

Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln
 465 470 475 480

Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr
 485 490 495

Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
 500 505 510

Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
 515 520 525

ES 2 372 547 T3

Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg
 530 535 540

Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln
 545 550 555 560

Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr
 565 570 575

Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys
 580 585 590

Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val
 595 600 605

Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His Asp Ala Tyr Arg Pro Val
 610 615 620

Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro Gln Glu Glu Gln Glu Asp
 625 630 635 640

Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His Phe Arg Ser Thr Thr His
 645 650 655

Asp Ala Tyr Arg Pro Val Asp Pro Ser Ala Tyr Lys Arg Ala Leu Pro
 660 665 670

Gln Glu Glu Gln Glu Asp Val Gly Pro Arg His Val Asp Pro Asp His
 675 680 685

Phe Arg Ser Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ile Arg Leu
 690 695 700

Leu Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser
 705 710 715 720

Asn Asn

<210> 4
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> T. cruzi

5

<400> 4

10

Met Gly His His His His His His Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gln

ES 2 372 547 T3

1 5 10 15
 Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gly Gln Ala Ala Glu Pro
 20 25 30
 Lys Ser Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser Lys Ala Ala Ile
 35 40 45
 Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Thr Ala Pro
 50 55 60
 Ala Ser Ser Met Pro Ser Gly Thr Ser Glu Glu Gly Ser Arg Gly Gly
 65 70 75 80

 Ser Ser Met Pro Ala
 85

 <210> 5
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> T. cruzi

 <400> 5

 Gly Asp Lys Pro Ser Pro Phe Gln Ala Ala Ala Gly Asp Lys Pro Ser
 1 5 10 15 .

 Pro Phe Gly Gln Ala
 10 20

 <210> 6
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> T. cruzi

 <400> 6

 Ala Glu Pro Lys Ser Ala Glu Pro Lys Pro Ala Glu Pro Lys Ser
 20 5 10 15

 <210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 25 <213> T. cruzi

 <400> 7

 Lys Ala Ala Ile Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala
 1 5 10 15

 Ala Thr Ala Pro Ala
 20

 30 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> T. cruzi

ES 2 372 547 T3

<400> 8

Ser Ser Met Pro Ser Gly Thr Ser Glu Glu Gly Ser Arg Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ser Met Pro Ala
 20

5

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de *Trypanosoma cruzi* en una muestra de ensayo, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 poner en contacto una muestra de ensayo de un ser humano con los cuatro polipéptidos recombinantes FP3 [ID SECUENCIA NO: 1], FP6 [ID SECUENCIA NO: 2], FP10 [ID SECUENCIA NO: 3] y TcF [ID SECUENCIA NO: 4], y
 10 detectar la unión de los anticuerpos presentes en dicha muestra de ensayo a al menos dos de dichos polipéptidos recombinantes, indicando la presencia de dicha unión de dichos anticuerpos a al menos dos de dichos polipéptidos recombinantes la presencia de *Trypanosoma cruzi* en dicha muestra de ensayo.
2. El método de la reivindicación 1, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal y orina.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de poner en contacto la muestra de ensayo con al menos un polipéptido recombinante adicional seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.
- 20 4. Una fase sólida que tiene inmovilizados sobre ella los cuatro polipéptidos recombinantes FP3 [ID SECUENCIA NO: 1], FP6 [ID SECUENCIA NO: 2], FP10 [ID SECUENCIA NO: 3] y TcF [ID SECUENCIA NO: 4], y un primer control y un segundo control, donde o bien el primer control o bien el segundo control están inmovilizados sobre la fase sólida a una concentración que es menor que la del otro control.
- 25 5. La fase sólida de la reivindicación 4, que tiene inmovilizados adicionalmente sobre ella al menos un polipéptido recombinante adicional seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2, Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.
- 30 6. La fase sólida de la reivindicación 4, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en nitrocelulosa, nailon, plástico y papel.
7. La fase sólida de la reivindicación 4, donde dicha fase sólida es una tira que tiene dichos polipéptidos inmovilizados sobre ella.
- 35 8. La fase sólida de la reivindicación 4, donde dichos polipéptidos están dispuestos en forma de bandas separadas sobre dicha fase sólida.
9. Un método para diagnosticar *Trypanosoma cruzi* en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
- 40 poner en contacto una muestra de ensayo obtenida de un sujeto con una fase sólida, donde dicha fase sólida tiene inmovilizados sobre ella los cuatro polipéptidos recombinantes FP3 [ID SECUENCIA NO: 1], FP6 [ID SECUENCIA NO: 2], FP10 [ID SECUENCIA NO: 3] y TcF [ID SECUENCIA NO: 4] en forma de
 45 bandas de ensayo separadas, y un primer control y un segundo control, donde adicionalmente o bien el primer control o bien el segundo control están inmovilizados sobre la fase sólida a una concentración que es menor que la del otro control con el fin de comprender un control bajo;
 poner en contacto la fase sólida con al menos un reactivo de detección;
 detectar la unión de los anticuerpos presentes en la muestra de ensayo identificando la presencia de una
 50 señal en cada una de las bandas de ensayo;
 comparar la intensidad de cualquier señal identificada en una banda de ensayo para un polipéptido recombinante con la intensidad de la señal del control bajo;
 donde la identificación de una señal en al menos dos bandas de ensayo de los polipéptidos recombinantes indica la presencia de *T. cruzi* en dicha muestra de ensayo, siempre que al menos una de las señales
 55 identificadas en una banda de ensayo para un polipéptido recombinante tenga una intensidad comparable a la del control bajo.
10. El método de la reivindicación 9, donde la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, saliva, fluido cerebroespinal y orina.
- 60 11. El método de la reivindicación 9, donde dicha fase sólida se selecciona del grupo que consiste en nitrocelulosa, nailon, plástico y papel.
12. El método de la reivindicación 9, donde la fase sólida que tiene adicionalmente inmovilizados sobre ella al menos un polipéptido recombinante adicional seleccionado del grupo que consiste en JL8, TCR27, JL7, TCR39, PEP-2,

Ag36, JL9, TCNA, TcLo1.2, TS, TcD, TcE, FCaBP, Tc-28, Tc-40, FL-160, CEA, CRP, TcP2 β _N-C29 y SA85-1.1.

13. El método de la reivindicación 9, donde dicha fase sólida es una tira que tiene dichos polipéptidos inmovilizados sobre ella.

5

Figura 1

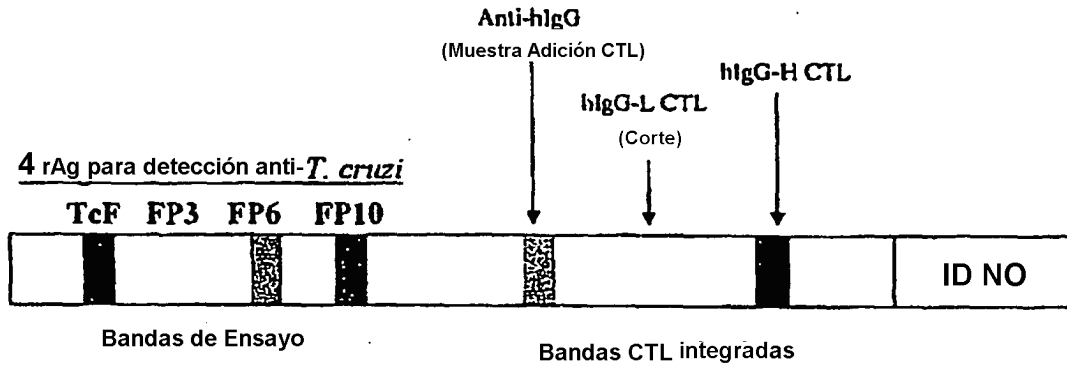


Figura 2

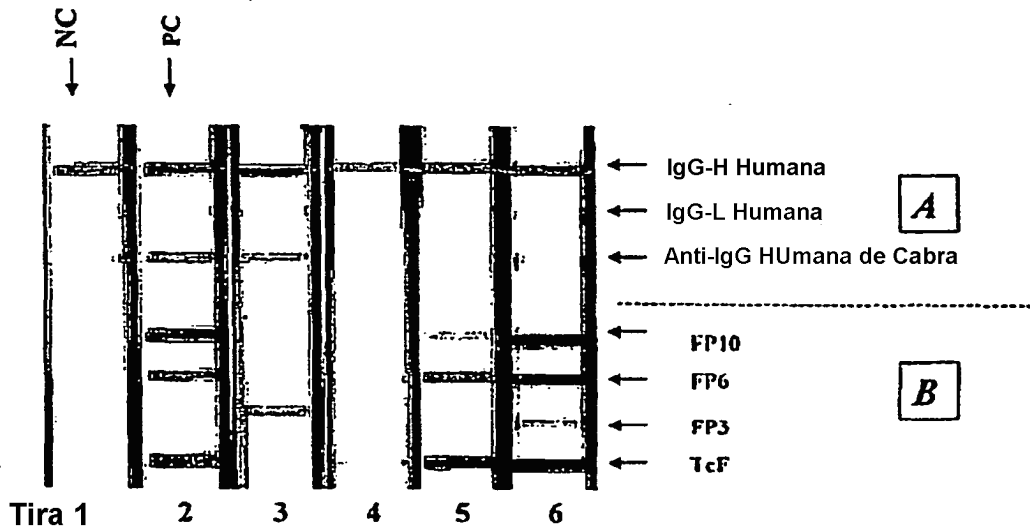


Figura 3

