

## CISTEÍNA PROTEINASAS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CON *TRICHOMONAS VAGINALIS*

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se relaciona a la utilización de cisteína proteinasas moduladas por hierro en un equipo de diagnóstico útil para detectar la infección por *Trichomonas vaginalis*.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

La tricomonosis es una enfermedad de transmisión sexual causada por el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*. Es la enfermedad de transmisión sexual no-viral más común, con un estimado de 250 millones de casos anuales en todo el mundo (Gerbase AC et al. 1998. Sex. Transm. Dis. 74, S12-S16; WHO, 2000). Sin embargo, esta estimación podría ser baja tomando en cuenta que la proporción de infecciones inaparentes es tan alta como 50% en mujeres y aún más alta en hombres (Fouts AC, and Graus SJ. 1980. J. Infect. Dis. 141, 137-143).

20

Esta enfermedad tiene importantes implicaciones médicas, sociales, y económicas. Las mujeres que están infectadas durante el embarazo están predispuestas a una ruptura prematura de las membranas placentarias, parto prematuro, e infantes de bajo peso corporal (Minkodd H et al. 1984. Am. J. Obstet. Gynecol. 150, 965-972; Cotch MF et al., 1997. Sex. Transm. Dis. 24, 353-360). Esta enfermedad también se encuentra ligada al cáncer cervical (Gram I et al. 1992. Cancer Causes Control. 3, 231-236) e infertilidad (Grodstein F et al. 1993. Am. J. Epidemiol. 137, 577-584).

25

30

Como con otras enfermedades de transmisión sexual, la infección con *Trichomonas vaginalis* puede aumentar la predisposición de individuos a la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (Laga M et al. 1994. Lancet. 344, 246-248). Se piensa que la tricomonosis puede aumentar la transmisión del virus de la inmunodeficiencia

humana al causar una acumulación local de células infectadas o susceptibles al virus tales como los linfocitos y macrófagos (Laga M et al. 1991. AIDS. 5, S55-S63; Petrin D et al. 1998. Clin. Microbiol. Rev. 11, 300-317).

5 La tricomonosis presenta una extensa variedad de patrones clínicos. El espectro de la tricomonosis clínica en las mujeres va desde el estado portador asintomático hasta la vaginitis, con una tercera parte de los pacientes infectados asintomáticos que vienen a ser sintomáticos dentro de los 6 meses (Rein MF. 1990. Trichomonads parasitic in humans. Springer-Verlag. New York, NY). *Trichomonas vaginalis* infecta principalmente  
10 el epitelio escamoso en el tracto genital. Una vez establecida, la infección persiste por largos períodos en las mujeres, pero solamente por un corto tiempo en el hombre. La tricomonosis en las mujeres usualmente se presenta durante los años reproductivos. Es rara la infección antes de la menarca o después de la menopausia. De acuerdo con la severidad de la infección, la tricomonosis puede clasificarse como aguda, crónica, o  
15 asintomática.

El patrón clínico en la infección aguda revela una vulvitis difusa debido a una abundante leucorrea. La descarga es típicamente espumosa, amarilla o verde, y mucopurulenta. Se pueden encontrar en la vagina y en la mucosa cervical unos  
20 pequeños puntos hemorrágicos. Este aspecto se conoce como "apariencia de fresa" y se observa únicamente en el 2% de los pacientes (Fouts AC, and Graus SJ. 1980. J. Infect. Dis. 141, 137-143).

En la infección crónica, los síntomas predominantes son ligeros, con prurito y  
25 dispareunia, mientras que la secreción vaginal puede ser muy escasa y mezclada con moco. Esta forma de la enfermedad es particularmente importante desde una perspectiva epidemiológica debido a que esos individuos son la principal fuente de transmisión del parásito.

30 Alrededor del 20-50% de las mujeres infectadas son asintomáticas y tienen un pH vaginal normal de 3.8 a 4.2 y una flora vaginal normal.

Aunque la infección con *Trichomonas vaginalis* es considerada principalmente como una enfermedad de mujeres, esta infección también se presenta en los hombres. La tricomonosis en los hombres es extensamente asintomática, y esos hombres se consideran como portadores asintomáticos de *Trichomonas vaginalis*. La tricomonosis urogenital en los hombres se puede categorizar en tres grupos: un estado portador asintomático, identificado por la investigación de contactos sexuales con mujeres infectadas; tricomonosis aguda, caracterizado por una uretritis profusa purulenta; y enfermedad sintomática ligera, la cual es clínicamente indistinguible de otras causas de uretritis no-gonocócica. En los hombres sintomáticos, es común la descarga clara y purulenta, disuria, y ligero prurito o sensación de ardor inmediatamente después de un acto sexual.

Hasta recientemente, el metronidazol era el antibiótico utilizado por excelencia para tratar la tricomonosis; sin embargo, se ha estimado que aproximadamente entre un 2.5 a 5% de todos los casos de tricomonosis presentan algún nivel de resistencia al tratamiento con este antibiótico (Schmid G et al. 2001. J. Reprod. Med. 46, 545-549). El tinidazol, un 5-nitroimidazol que está químicamente relacionado al metronidazol, ha sido utilizado también en el tratamiento de la tricomonosis. En este sentido, también diversos estudios han evaluado diversas dosis del tinidazol para el tratamiento de la tricomonosis resistente al metronidazol (Hamed and Studemeister. 1992. Sex. Transm. Dis. 19, 339-340; Saurina G et al. 1998. Clin. Infect. Dis. 26, 1238-1239; Sobel J et al. 2001. Clin. Infect. Dis. 33, 1341-1346).

Numerosos estudios han demostrado las actividades tricomonocidas *in vitro* de compuestos no-imidazol. Esos compuestos incluyen agentes para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas y derivados específicos para el tratamiento de la tricomonosis.

La Hamycina es un polímero aromático relacionado a la Amfotericina B. este compuesto induce la muerte celular del parásito y es útil para destruir cepas de *Trichomonas vaginalis* resistentes o sensibles al metronidazol. Desafortunadamente, se

han reportado efectos colaterales tanto en pacientes como en animales (Lushbaugh WB et al. 1995. J. Antimicrob. Chemother. 36, 795-802).

La aplicación intravaginal de paramomicina ha sido utilizada exitosamente para tratar la tricomonosis recurrente. Sin embargo, diversos efectos colaterales, incluyendo dolor y ulceración mucoide, lo hace un candidato improbable para la terapia clínica (Poppe WA. 2001. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 96, 119-120).

El nitrito de sodio y el nitroprusiato de sodio, utilizados tradicionalmente para prevenir la contaminación de alimentos, presentan actividad tricomonocida y son muy activos contra cepas de *Trichomonas vaginalis* resistentes y sensibles al metronidazol (Ryu and Lloyd. 1995. FEMS Microbiol. Lett. 130, 183-188).

Otros medicamentos investigados para su actividad antitricomonal incluyen el sulfimidazol (Malagoli m et al. 2002. Pharmacol. Res. 46, 469-472), nifuratel, sulfato de berberina (Kaneda Y et al. 1991. Ann. Trop. Med. Parasitol. 85, 417-425), tetraciclinas lipofílicas (Katiyar and Edlind. 1991. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 2198-2202), y disulfiram (Bouma MJ et al. 1998. J. Antimicrob. Chemother. 42, 817-820).

El diagnóstico de la tricomonosis ha dependido tradicionalmente de la observación microscópica del protozooario móvil en secreciones vaginales o cervicales. Las tricomonas se pueden diferenciar en base a su movilidad característica. La sensibilidad de esta técnica varía desde tan bajo como 38% a tan alto como 82% (McCann JS. 1974. Br. J. Vener. Dis. 50, 450-452). Aunque este método es ciertamente la prueba principal de diagnóstico costo-efectiva, esta lejos de ser óptima en términos de su confiabilidad debido a su baja sensibilidad. Esto puede deberse a la pérdida de movilidad distintiva después de que el protozooario ha sido removido de la temperatura corporal.

El método de caldo de cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico de la tricomonosis debido a la simpleza de interpretación y requiere alrededor de 300 a 500

tricomonas/mililitro de inóculo para iniciar el desarrollo en cultivo (Garber GE et al. 1987. J. Clin. Microbiol. 25, 1275-1279). Sin embargo, existen limitaciones inherentes al diagnóstico en cultivo. Usualmente es necesario un período de incubación de 2 a 7 días para identificar *Trichomonas vaginalis* en cultivo, tiempo durante el cual los pacientes infectados pueden continuar transmitiendo la infección. Para mejorar la aceptación del diagnóstico por cultivo, se creó un método de cultivo en envoltura plástica el cual permite la inmediata examinación y cultivo (Beal C et al. 1992. J. Clin. Microbiol. 30, 2265-2268). Los resultados son comparables a aquellos de las técnicas de preparación en fresco y cultivo. Similar al método de envoltura plástica el sistema InPouch es una bolsa de dos cámaras que permite efectuar un montaje en fresco inmediato por examinación microscópica a través de la bolsa, así como un cultivo. Se ha demostrado que el sistema InPouch es al menos tan sensible como el medio modificado de Diamond para la detección de *Trichomonas vaginalis* (Levi MH et al. 1996. Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society of Microbiology).

Las técnicas de cultivo celular utilizan una variedad de líneas celulares para recuperar *Trichomonas vaginalis* de especímenes clínicos. Por ejemplo, han sido utilizadas células McCoy y se ha observado que este método es superior al caldo de cultivo y a las preparaciones en fresco ya que es capaz de detectar *Trichomonas vaginalis* a una concentración tan baja como 3 microorganismos/mililitro (Garber GE et al. 1987. J. Clin. Microbiol. 25, 1275-1279). Sin embargo el cultivo celular no se efectúa rutinariamente debido a que es costoso y no conveniente para un rápido diagnóstico.

Debido a que los métodos de cultivo son relativamente lentos y la preparación en fresco carece de sensibilidad, se han introducido las técnicas de tinción de parásitos en frotis fijados y no fijados. Por ejemplo, se han introducido técnicas de tinción tales como la naranja de acridina (Fripp PJ et al. 1975. J. Parasitol. 61, 966-967), Leishman (Levett PN. 1980. Med. Lab. Sci. 37, 85-88), ácido periódico de Schiff (Rodríguez-Martínez HA et al. 1973. Am. J. Clin. Pathol. 58, 741-746), y Fontana (Nagesha CN et al. 1970. Am. J. Obstet. Gynecol. 106, 933-935). Las técnicas de tinción tienen sus limitaciones ya que *Trichomonas vaginalis* no siempre aparece en su forma típica de forma de pera

con flagelo. A menudo aparece como formas redondeadas recordando la morfología de leucocitos polimorfonucleares, y ocasionalmente las características típicas morfológicas se pierden durante la fijación y teñido haciendo difícil la identificación etiológica.

5 Se han observado un estimado de 8 serotipos en *Trichomonas vaginalis*, sin embargo, por análisis de inmunotransferencia se ha observado una extensa variedad de marcadores antigénicos (Garber GE et al. 1986. Infect. Immun. 51, 250-253). Varias técnicas incluyendo la aglutinación, fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, difusión en gel, anticuerpo fluorescente, y ensayo tipo ELISA han sido  
10 utilizadas para demostrar la presencia de anticuerpos antitricomona (Sibau L et al. 1987. Sex. Transm. Dis. 14, 216-220). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos locales hacia un patógeno depende de diversos factores, tales como la naturaleza del antígeno o patógeno, su forma viva o inactivada, su concentración local, y la frecuencia y longitud de la estimulación del sistema inmunológico. Esto tiene diversas desventajas  
15 inherentes.

La detección directa de antígenos de *Trichomonas vaginalis* en especímenes clínicos al utilizar anticuerpos monoclonales promete ser un rápido método en el diagnóstico de la tricomonosis. Por ejemplo, se obtuvieron 2 anticuerpos monoclonales ampliamente  
20 reactivos los cuales identifican todas las 88 cepas de *Trichomonas vaginalis* obtenidas de diversas áreas geográficas de los Estados Unidos de Norteamérica (Krieger JN et al. 1985. J. Infect. Dis. 152, 979-984). Por otro lado, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas inmunógenas de 62 y 65 kDa dieron resultados similares a aquellos obtenidos en las preparaciones en fresco (Lisi PJ et al. 1988. J. Clin.  
25 Microbiol. 26, 1684-1686). Los sistemas de inmunoensayo de enzima directa y fluorescencia directa, los cuales utilizan cócteles de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo o peroxidasa son tan sensibles y específicos como las técnicas de cultivo (Thomason JL, and Gelbart SM. 1989. Obstet. Gynecol. 74, 536-  
30 541).

Las técnicas de ADN recombinante ha ido aumentando en uso en los laboratorios clínicos para mejorar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. El uso de los métodos de PCR ayuda a detectar organismos no viables y también tiene la habilidad de detectar células y secuencias blanco en muestras clínicas que han sufrido una fijación o una degradación parcial (Riley DE et al. 1992. J. Clin. Microbiol. 30, 465-472). El sistema Affirm VP, disponible comercialmente, utiliza sondas de oligonucleótidos sintéticos para la detección de *Trichomonas vaginalis* a partir de un simple raspado vaginal (Briselden AM et al. 1994. J. Clin. Microbiol. 32, 148-152). Esta técnica es superior a la preparación en fresco; sin embargo, se pueden encontrar resultados falsos negativos cuando dicha técnica se compara con la técnica de cultivo (80% de sensibilidad comparada con muestras positivas en cultivo (Briselden AM et al. 1994. J. Clin. Microbiol. 32, 148-152).

La técnica de hibridación denominada dot-blot, la cual utiliza como una sonda un fragmento de ADN de 2.3 kb de *Trichomonas vaginalis* puede detectar al ADN del parásito a partir de un exudado vaginal. Sin embargo, debido a la inestabilidad de la sonda y al cuidado especial necesario para el manejo y disponibilidad del material radioactivo, la técnica tiene inconvenientes significativos (Rubino S et al. 1991. J. Clin. Microbiol. 29, 702-706).

El diagnóstico de esta infección es mucho más difícil para el hombre, siendo el cultivo el mejor diagnóstico ya que se pueden obtener buenos resultados al combinar en el cultivo muestras obtenidas a partir de raspado uretral y sedimento urinario (Krieger JN et al. 1993. J. Urol. 149, 1455-1458). El PCR parece tener una mayor sensibilidad comparada con el cultivo, ya que en un estudio se demostró que el 17% de los pacientes varones eran detectados en muestra combinada de raspado uretral y sedimento urinario, mientras que la técnica de cultivo demostró un 5% utilizando la misma combinación de muestras. La sensibilidad del PCR con especímenes urinarios en dicho estudio fue del 100%, en contraste a la sensibilidad del 80% de los especímenes de raspado (Schwebke and Lawing. 2002. J. Clin. Microbiol. 40, 3681-3683). En un segundo estudio, se analizó el diagnóstico utilizando microscopía en

fresco, cultivo uretral, así como PCR utilizando muestras de raspado uretral. La prevalencia de la infección entre varones sintomáticos y asintomáticos fue de 21 y 125, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR fue de 82 y 95%, respectivamente (Hobbs M et al. 1999. Sex. Transm. Dis. 26, 381-387).

5

Dadas las implicaciones de salud de la tricomonosis y la relativa inhabilidad de métodos de diagnóstico para detectar *Trichomonas vaginalis*, existe una clara necesidad de una prueba sensible y específica que pueda ser utilizada en el diagnóstico de la tricomonosis.

10

En la vagina, el ciclo menstrual parece jugar un papel clave en la modulación de la disponibilidad de las fuentes de hierro y otros nutrientes (Cohen MS et al. 1987. Am. J. Obstet. Gynecol. 157, 1122-1125) esenciales para la viabilidad y colonización óptima del parásito. A pesar del hecho de que ambientes en concentraciones bajas y altas de hierro son encontrados en la vagina (Lehker and Alderete. 1992. Mol. Microbiology. 6, 123-132), la mayoría de las tricomonas durante la infección están en concentraciones altas en hierro (Alderete JF. 1999. Infect. Immun. 66, 4924-4931). Sorpresivamente, nosotros encontramos que las cisteína proteinasas son moduladas por el hierro y que estas son de gran utilidad para el diagnóstico de tricomonosis tanto en hombres como en mujeres, y que su detección es factible tanto en muestras conteniendo al antígeno (raspado vaginal y orina) como en muestras conteniendo anticuerpos (suero, plasma, o saliva).

15

20

25

## SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con un anticuerpo específico contra una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo anticuerpo-cisteína proteinasa.

30



En otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de suero, plasma, o saliva, la cual se contacta con una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, para formar un complejo cisteína proteinasa-anticuerpo.

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con un polinucleótido que codifica para una cisteína proteinasa modulada por hierro, para formar un complejo polinucleótido-polinucleótido.

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con anticuerpo dirigido contra la cisteína proteinasa modulada por hierro, para formar un complejo célula-anticuerpo.

Aún en otro aspecto, la presente invención incluye proporcionar un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano utilizando una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, la cual se contacta con polinucleótido que codifica para una cisteína proteinasa modulada por hierro, para formar un complejo célula-polinucleótido.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción anticuerpo-cisteína proteinasa modulada por hierro.

Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios

para medir la interacción polinucleótico-polinucleótido codificante de la cisteína proteinasa modulada por hierro.

5 Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción anticuerpo-célula conteniendo cisteína proteinasa modulada por hierro.

10 Aún en otro aspecto, la invención incluye un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano. El equipo incluye los medios necesarios para medir la interacción polinucleótido-célula conteniendo cisteína proteinasa modulada por hierro.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la infección en humanos con *Trichomonas vaginalis* puede detectarse con alta sensibilidad mediante la formación de un complejo inmunológico entre una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, o un fragmento reactivo de la misma, y un anticuerpo que sea inmunoespecífico contra dicha proteína. Una ventaja importante de esta prueba, es que se ha encontrado que dicha cisteína proteinasa modulada por hierro está presente en cantidades detectables en los raspados vaginales, en virtualmente todas las mujeres infectadas por tricomonas que se han puesto a prueba.

25 En la práctica del método, se obtiene primero una muestra de fluido corporal del sujeto humano. En donde, como en la modalidad preferida una muestra de fluido corporal es una secreción, o raspado vaginal de cérvix o tracto vaginal o uretral, o conducto cervical, o frotis de Papanicolao en mujeres, o una muestra de orina en mujeres y  
30 hombres: otro fluido corporal adecuado incluye suero, sangre y saliva. En forma

alternativa, la muestra puede consistir de células del paciente, por ejemplo de cualquier sitio de infección.

5 Las pruebas de la invención pueden ser directas o competitivas. En una prueba de unión competitiva, el analito objetivo (cisteína proteinasa modulada por hierro) compite con un análogo del analito marcado por sitios de unión específicos sobre un agente de unión preferiblemente inmovilizado, por ejemplo anticuerpos que unen específicamente la cisteína proteinasa modulada por hierro, unido a una superficie sólida adecuada, por ejemplo, superficies de nitrocelulosa, nylon, PVC o poliestireno. La concentración del analito marcado unido al reactivo de captura, es inversamente proporcional a la cantidad de analito libre presente en la muestra, la cual puede detectarse cualitativamente en forma unida o en solución o puede cuantificarse, por ejemplo, mediante determinación espectrofotométrica de la cisteína proteinasa marcada en solución.

15 Las pruebas directas son típicamente pruebas tipo sándwich, en las cuales el analito objetivo se une a un agente de unión marcado, por ejemplo, anticuerpo marcado, y un anticuerpo de captura inmovilizado, formando un complejo en sándwich marcado inmovilizado que puede detectarse. El formato exacto de la prueba depende en general de la sensibilidad o el carácter específico esperado para la prueba. En algunas pruebas, particularmente para aquellas pruebas que usan reactivos lábiles, puede añadirse un reactivo de control para confirmar la eficacia del reactivo marcado o el reactivo de captura.

25 En otro formato de prueba de unión directa, usado particularmente para análisis de frotis de Papanicolao, se trata una muestra de raspado cervical de un sujeto femenino para remover sustancias de interferencia, y se deposita sobre un sólido, en donde los componentes del raspado, por ejemplo cisteína proteinasas moduladas por hierro, son inmovilizados, por ejemplo, por unión a la superficie tratada de un portaobjetos. Un agente de unión marcado, por ejemplo un anticuerpo anti-cisteína proteinasa marcado fluorescentemente, se aplica entonces al portaobjetos, se deja que se una a objetivos

30

específicos, seguido de lavado, para remover el anticuerpo no unido. La presencia o ausencia del analito en la muestra, puede determinarse entonces mediante examen microscópico de fluorescencia en el portaobjeto.

5 Existe una amplia variedad de marcas que pueden usarse con una porción de unión (anticuerpo o antígeno) para formar un reactivo marcado. La elección de la marca depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con la porción de unión, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las provisiones de  
10 disposición. Las marcas de la presente invención pueden ser solubles o estar en partículas, pueden ser metálicas, orgánicas o inorgánicas, y pueden incluir marcas espectrales tales como proteína fluorescente verde, colorantes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, biotina, avidina y estreptavidina), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, luciferina y luminol); y enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.), marcas  
15 colorimétricas espectrales tales como oro coloidal, o partículas de carbono, o perlas coloreadas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

La marca puede acoplarse directa o indirectamente a un componente de la porción de unión de acuerdo a métodos bien conocidos en el estado de la técnica, tales como los  
20 que se describen en las patentes US 4,863,875 y US 4,373,932. Las marcas no radioactivas se unen con frecuencia mediante medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) es unida covalentemente a la porción de unión. El ligando se une entonces a una molécula de anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina), la cual es inherentemente detectable, o se une covalentemente a un  
25 sistema de señales tales como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. La marca puede unirse a la porción de unión mediante un enlazador químico. Los dominios del enlazador son típicamente secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-glicina o poli-L-lisina que tienen entre  
30 aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Los enlazadores preferidos son con frecuencia subsecuencias de aminoácidos flexibles. Dichos enlazadores flexibles son ampliamente conocidos, por ejemplo, esta disponible comercialmente poli(etilenglicol). La porción de

detección puede conjugarse también directamente con el compuesto generador de señales, por ejemplo, mediante conjunción con una enzima o fluoróforo.

De preferencia, las marcas dan una señal visible que es inmediatamente discernible después de inspección visual, o mediante detección de fluorescencia. Las marcas preferidas incluyen las que pueden observarse como: 1) quimioluminiscencia (usando peroxidasa de rábano y/o fosfatasa alcalina con substratos que producen fotones como productos de degradación); 2) cambio de color (oro coloidal, que produce un precipitado coloreado con el evento inmunoreactivo), y 3) fluorescencia (usando, por ejemplo, fluoresceína, y otras marcas fluorescentes).

Los anticuerpos pueden ser de tipo monoclonal o policlonal. Los anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos, son también útiles como porciones de unión. De esta manera, el término anticuerpo, como se usa en la presente, incluye también anticuerpo de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros, o los sintetizados *de novo* utilizando tecnologías de ADN recombinante.

La porción de unión de los reactivos marcados y de captura, son cisteína proteinasas moduladas por hierro de *Trichomonas vaginalis* y fragmentos inmunológicamente reactivos de las mismas. Para uso en la prueba de la invención, las cisteína proteínasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis* puede ser nativa, puede sintetizarse químicamente o puede reproducirse en forma recombinante, o bien puede ser una molécula entera, o fragmentos de la misma. En una modalidad, la cisteína proteínasa se prepara mediante métodos recombinantes. Los métodos para preparar inmunógenos recombinantes que contienen por lo menos un epítipo inmunoreactivo, son bien conocidos por los expertos en la técnica (US 5,876,985 y US 5,922,563). En resumen, el inmunógeno recombinante puede prepararse usando un vector de expresión que contenga uno o varios genes que codifiquen para el antígeno. Los genes de codificación pueden seleccionarse de una colección de expresión de ADNc de *Trichomonas vaginalis*, seleccionando la colección con un anticuerpo policlonal que ha

sido enfrentado contra una preparación cruda del antígeno de interés. Los insertos de ADNc de esos plásmidos de expresión, que expresan el antígeno de interés, son entonces subclonados y secuenciados. Los diferentes insertos que codifican para el antígeno de interés, que codifican para los diferentes miembros de una familia de inmunógenos, o de varios inmunógenos no relacionados, son agrupadas y clonadas en un vector de expresión y usadas para transformar *E. coli* u otras células hospederas adecuadas.

La invención también contempla métodos para amplificar una secuencia blanco contenida en ácidos nucleicos derivados de *Trichomonas vaginalis* en la muestra, en donde el método comprende los pasos de: a) contactar la muestra de fluido corporal con al menos un oligonucleótido de amplificación para una cisteína proteinasa modulada por hierro, y b) exponer la muestra a condiciones suficientes para amplificar la secuencia blanco. En este sentido, el método para amplificar una secuencia blanco de ácido nucleico presente en los ácido nucleicos derivados de *Trichomonas vaginalis* incluirán los pasos de: a) contactar la muestra con una sonda de detección la cual hibrida preferencialmente a la secuencia blanco o su complemento bajo condiciones severas de hibridación, formando de esta manera un híbrido estable para detección sonda:blanco; y b) determinar si el híbrido está presente en la muestra como una indicación de la presencia o ausencia de *Trichomonas vaginalis*.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son proporcionados únicamente para propósitos ilustrativos y no son pensados para limitar el alcance de la invención.

**Ejemplo 1.** Detección de *Trichomonas vaginalis* utilizando tecnología PCR.

En orden para aislar ARN de raspado vaginales positivos para *Trichomonas vaginalis*, fue utilizado el Reactivo TRI (Sigma, Cat. No. T9424). El aislamiento se realizó de la siguiente manera, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 0.1

ml de raspado vaginal se mezcló y se reaccionó con 0.1 ml de reactivo TRI a temperatura ambiente por 5 min. La solución resultante se mezcló y reaccionó con 20 ml de BCP (1-bromo-3-cloropropano) a temperatura ambiente por 5 min y luego se centrifugó a temperatura de 4 °C y 12,000 rpm por 15 min. Después de la centrifugación se formaron 3 capas, en donde la capa superior conteniendo el material ARN se transfirió a un nuevo tubo y se le añadieron 50 µl de isopropanol, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La solución resultante se centrifugó a temperatura de 4°C y 12,000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 75% y se disolvió en 20 µl de agua destilada. Aproximadamente 9 µl del ARN así purificado se mezclaron y reaccionaron con 1 µl del primer construido a temperatura de 65°C por 5 min, y la reacción se transfirió a hielo. 4 µl de amortiguador RT, 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de dNTP 10mM, 1 µl de la RTasa, 1 µl de inhibidor RNAsas y 1 µl de agua desionizada fueron añadidos a la solución y la mezcla resultante se hizo reaccionar a 42°C por 1 h y después a 70°C durante 10 min para construir los ADNc. La síntesis de ADNc se realizó con el Sistema ThermoScript RT\_PCR (Invitrogen, Cat. No. 11146-024). 5 µl del ARN purificado, 1 µl de hexamero, 2 µl de dNTP 10 mM, y 4 µl de agua tratada con DECP se mezclaron juntos, reaccionados a una temperatura de 65°C durante 5 min y transferidas a hielo. 5 µl de amortiguador de síntesis ADNc 5X, 1 µl de ThermoScript RT se añadieron a la solución arriba obtenida, se incubaron a 25°C durante 10 min y luego a 50°C durante 50 min y a 85°C por 5 min para detener la reacción. Después, 1 µl de RNasa H se añadió a la solución, y la mezcla resultante se incubó a 37°C por 20 min para remover el ARN libre. Una prueba de PCR se realizó utilizando el ADNc como molde. La reacción de PCR se preparó como sigue: 10 µl de amortiguador Thermopol, 2 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de iniciador 5, 2 µl de iniciador 3, 2 µl de molde de ADN, 81 µl de agua desionizada, 1 µl de ADN polimerasa fueron cargados a cada reacción. Después de mantener a 95°C por 2 min, 40 ciclos de reacción a 95°C por 40 s, 55°C por 30 s y 72°C por 2 min y se finalizó con un ciclo de 72°C por 2 min. Los ADN amplificados se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

**Ejemplo 2.** Detección de *Trichomonas vaginalis* utilizando tecnología ELISA.

En orden para confirmar la infección con *Trichomonas vaginalis*, se realizó el siguiente experimento: Una solución conteniendo la proteinasa CP39 en una concentración de 1.0 µg/ml se diluyó en amortiguador de carbonato 0.1M (pH 9.5) y 100 µl de la solución diluida se añadieron a cada pozo de la placa de 96 pozos de fondo plano. La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 18 h de tal manera que los antígenos añadidos a cada pozo se unieron a la base de la placa. La solución remanente no adherida a la placa se removió y luego se añadieron a cada pozo 300 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) conteniendo BSA 0.5% y se incubó a temperatura ambiente durante 6 h. La solución remanente en los pozos se removió y se añadieron 100 µl de diluyente de muestra conteniendo BSA 1% en PBS Tween 20 0.05%. Posteriormente se añadieron a cada pozo 50 µl de muestra (que contiene anticuerpos anti-CP39) . La mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C. Después los pozos se lavaron 5 veces con 300 µl de PBS conteniendo 0.05% de Tween 20. Un conjugado de CP39-enzima peroxidasa se diluyó en diluyente caseína/PBS conteniendo Tween 20. 100 µl de la dicha dilución se añadió a cada pozo y se incubó a 37°C durante 30 min. Después de completar la reacción, el pozo se lavó 5 veces con PBS/Tween 20 al 0.05%, y 100 µl de solución substrato conteniendo 100 µg/ml de TMB, peróxido de hidrógeno al 0.006% y amortiguador de fosfato-cítrico (pH 4.5) se añadió a cada pozo dejándose desarrollar el color en un cuarto oscuro durante 30 min. 100 µl de solución de paro (ácido sulfúrico 1N) se añadió a cada pozo para detener el desarrollo de color y se midió la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas de 96 pozos (ELISA). Ya que el desarrollador de color, TMB, en la solución de substrato fue catalizado por el conjugado CP39-enzima peroxidasa unido a los anticuerpos, causando de esta forma el desarrollo del color, la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CP39 se detectó al medir el grado de desarrollo de color en términos de densidad óptica.

Estos y otros objetivos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a los expertos en el campo de la descripción de la invención, y de ninguna manera son limitativos de la invención.



**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:
    - a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con un anticuerpo dirigido contra una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.
    - b. Detectar la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-cisteína proteinasa mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

10

  2. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:
    - a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de suero, plasma, o saliva, con una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.
    - b. Detectar la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-cisteína proteinasa mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

15

  3. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:
    - a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con un polinucleótido que codifica una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, seleccionada

20

25

30

del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.

5

b. Detectar la formación de un complejo polinucleótido-polinucleótido mediante técnicas de biología molecular.

4. Un método de detección de la infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano caracterizada por los siguientes pasos:

10

a. Contactar una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina o raspado vaginal, con un anticuerpo dirigido contra una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.

15

b. Detectar la formación de un complejo célula-anticuerpo mediante técnicas colorimétricas o espectrofotométricas.

20

5. Un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, caracterizado porque contiene los medios necesarios para medir la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, en donde la cisteína proteinasa modulada por hierro es seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.

25

6. Un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, caracterizado porque contiene los medios necesarios para medir la formación de un complejo polinucleótido-polinucleótido codificante de la cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, en donde la cisteína proteinasa modulada por hierro es seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.

30

- 5 7. Un equipo para detectar infección por *Trichomonas vaginalis* en un sujeto humano, caracterizado porque contiene los medios necesarios para medir la formación de un complejo inmunológico anticuerpo-célula conteniendo una cisteína proteinasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, en donde la cisteína proteinasa modulada por hierro es seleccionada del grupo de cisteína proteinasa de 30 kDa, cisteína proteinasa de 39 kDa, o cisteína proteinasa de 65 kDa.

**RESUMEN**

En la presente se divulgan métodos y equipo para diagnosticar en un sujeto humano la infección por el protozooario parásito *Trichomonas vaginalis*. En el método, una muestra  
5 de fluido corporal obtenida del sujeto es contactada con anticuerpos anti-cisteína  
proteínasa modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis* o con la cisteína proteínasa  
modulada por hierro o con polinucleótidos codificantes para una cisteína proteínasa  
modulada por hierro de *Trichomonas vaginalis*, para analizar la formación de complejos  
10 proteína-proteína o polinucleótido-polinucleótido si el sujeto está infectado con  
*Trichomonas vaginalis*.