

Implementación de una técnica inmunoenzimática para el diagnóstico de la paragonimiasis humana

Luana Gabriele Andrade Gomes^{1,2}, Frank Solano Campos³, Gaby Dolz^{1,2}

1 Maestría en Enfermedades Tropicales, PCVET, Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica

2 Laboratorio de Docencia e Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA, Heredia, Costa Rica

3 Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Escuela de Ciencias Biológicas, UNA, Heredia, Costa Rica

Correo electrónico: luagab20@yahoo.com.br



Introducción

La paragonimiasis es una enfermedad zoonótica parasitaria que se considera desatendida y subdiagnosticada en nuestro país. El hombre se infecta al ingerir cangrejos de río crudos o mal cocinados que contienen el tremátodo. Debido a que no existe prueba diagnóstica inmunológica para determinar la presencia de paragonimiasis extrapulmonar en la población humana de Costa Rica, el objetivo del presente estudio fue analizar diferentes cisteínas-proteasas recombinantes del parásito, para determinar su uso potencial como antígenos en una prueba inmunoenzimática.

Metodología

Las cisteínas-proteasas CP4, CP7 y CP9 de *Paragonimus westermani* fueron sintetizadas en un vector pET-28a(+) para la expresión heteróloga en *Escherichia coli* BL21. Para el inmunoblot las proteínas purificadas fueron separadas en SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF utilizando un sistema de electrotransferencia en seco. Se bloqueó la membrana con 3 lavados de 20 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS 1X, Tween 20 0.05%, 0,25% de I-block). La incubación con los anticuerpos primarios (sueros humanos positivos a *P. westermani*, *Paragonimus mexicanus*, fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis y sueros negativos) diluidos 1:50 en solución de bloqueo se realizó a 4°C durante toda la noche. Luego de 3 lavados de 20 minutos con solución de lavado (PBS, 0.05% Tween 20) a temperatura ambiente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-humano IgG-Peroxidasa diluido 1:10.000 en solución de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 20 minutos con solución de lavado, se realizó la detección con el sustrato Diaminobenzidine (DAB en DMSO, 0.01M Tris pH7.2, 3% H₂O₃).

Resultados

La proteína CP7 resultó ser la más específica en el inmunoblot, ya que reaccionó fuerte con sueros positivos de *P. westermani* y *P. mexicanus*, y solamente reaccionó débil con sueros de pacientes con fascioliasis, toxocariasis y esparganosis (Figura 1). En contraste, la proteína CP4 reaccionó fuerte con *P. westermani* y débil con *P. mexicanus*, y presentó reacción débil con sueros de pacientes con fascioliasis, esquistosomiasis, toxocariasis, leishmaniosis y amebiasis (Figura 2), mientras que la proteína CP9 reaccionó fuerte con sueros positivos de *Paragonimus* spp. y otras parasitosis, encontrándose además reacciones contra otras proteínas (Figura 3)

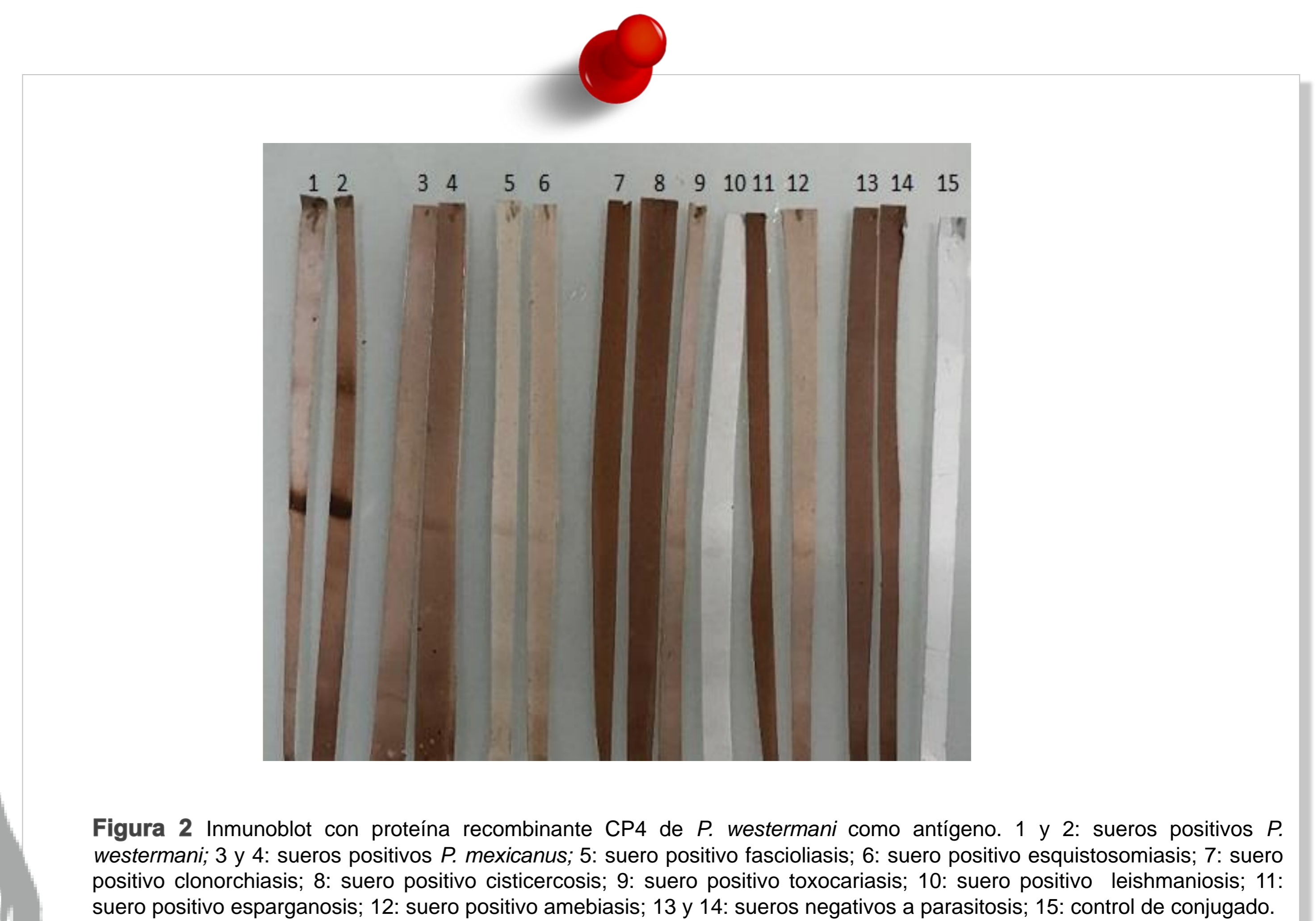


Figura 2 Inmunoblot con proteína recombinante CP4 de *P. westermani* como antígeno. 1 y 2: sueros positivos *P. westermani*; 3 y 4: sueros positivos *P. mexicanus*; 5: suero positivo fascioliasis; 6: suero positivo esquistosomiasis; 7: suero positivo clonorchiasis; 8: suero positivo cisticercosis; 9: suero positivo toxocariasis; 10: suero positivo leishmaniosis; 11: suero positivo esparganosis; 12: suero positivo amebiasis; 13 y 14: sueros negativos a parasitosis; 15: control de conjugado.

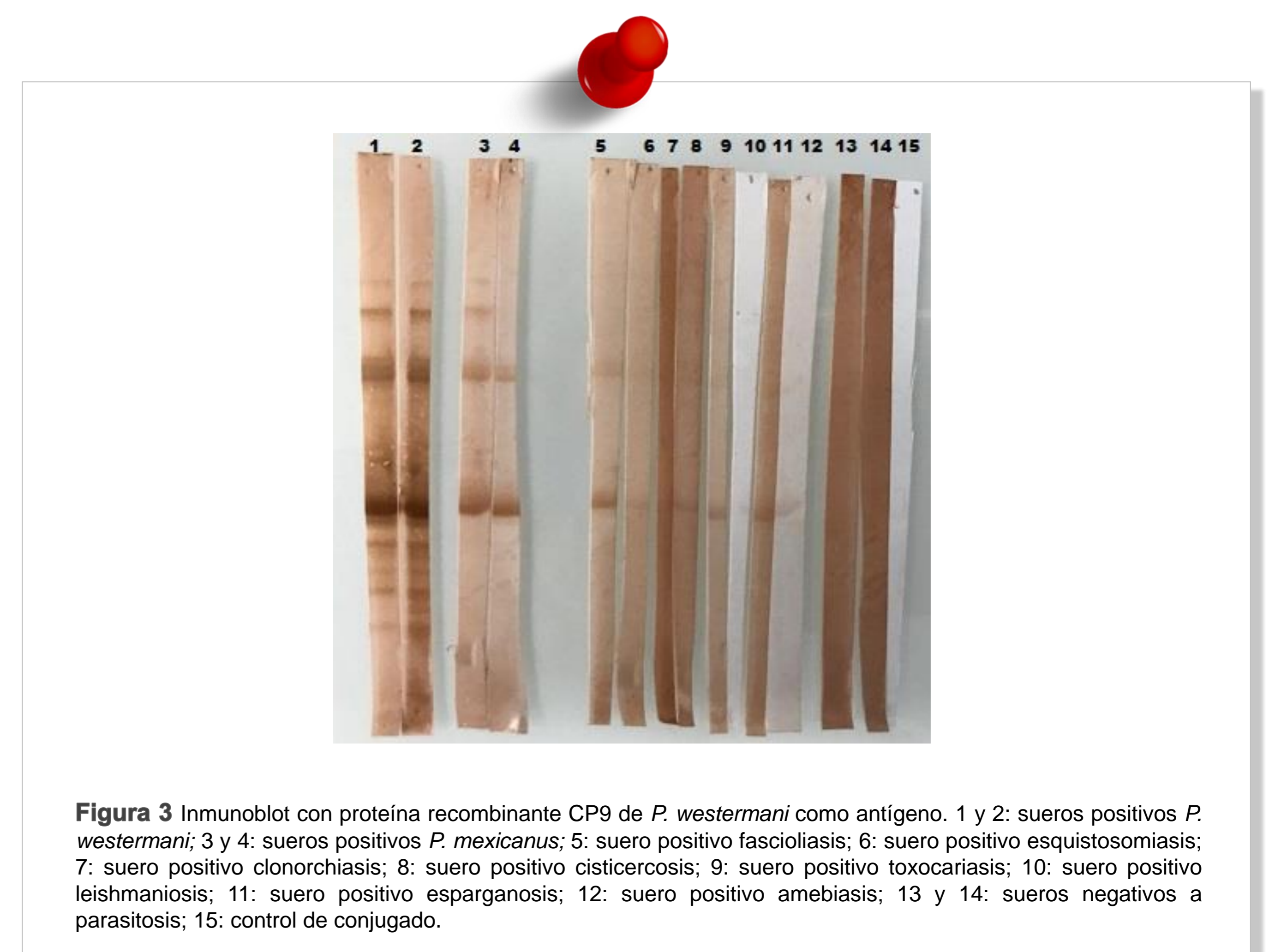


Figura 3 Inmunoblot con proteína recombinante CP9 de *P. westermani* como antígeno. 1 y 2: sueros positivos *P. westermani*; 3 y 4: sueros positivos *P. mexicanus*; 5: suero positivo fascioliasis; 6: suero positivo esquistosomiasis; 7: suero positivo clonorchiasis; 8: suero positivo cisticercosis; 9: suero positivo toxocariasis; 10: suero positivo leishmaniosis; 11: suero positivo esparganosis; 12: suero positivo amebiasis; 13 y 14: sueros negativos a parasitosis; 15: control de conjugado.

Conclusiones

La proteína CP7 demostró ser la más específica para ser utilizada como antígeno en pruebas inmunológicas como Western Blot.

Recomendaciones

Utilizar la proteína CP7 como antígeno en el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar anticuerpos contra *P. mexicanus*.

Agradecimientos

Al Doctor Sugiyama Hiromu del Departamento de Parasitología del National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku Ward, Tokyo, Japón por la donación de las muestras de sueros para el presente trabajo. Al Doctor Javier Alvarado Mesén, coordinador del Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Proteínas de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional por compartir su conocimiento técnico-científico en la técnica de SDS-PAGE, además por brindarnos el uso de su laboratorio y equipos para el desarrollo del trabajo.



Figura 1 Inmunoblot con proteína recombinante CP7 de *P. westermani* como antígeno. 1 y 2: sueros positivos *P. westermani*; 3 y 4: sueros positivos *P. mexicanus*; 5: suero positivo fascioliasis; 6: suero positivo esquistosomiasis; 7: suero positivo clonorchiasis; 8: suero positivo cisticercosis; 9: suero positivo toxocariasis; 10: suero positivo leishmaniosis; 11: suero positivo esparganosis; 12: suero positivo amebiasis; 13 y 14: sueros negativos a parasitosis; 15: control de conjugado.