



# EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE MICRONEMA 10 (MIC 10) DE *Toxoplasma gondii* PARA SERODIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS Y SU UTILIDAD PARA DISTINGUIR ENTRE INFECCIÓN RECIENTE Y CRÓNICA EN HUMANOS



Aracelis Miranda<sup>1</sup>, José E. Calzada<sup>1</sup>, Azael Saldaña<sup>1</sup>, Juan Castillo<sup>1</sup>, Makoto Igarashi<sup>2</sup>

1:Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

2: National Research Center for Protozoan Diseases, University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japón

## Introducción:

*Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario intracelular obligado que causa la toxoplasmosis, una infección que puede conducir en mujeres embarazadas a aborto espontáneo, muerte del feto y retardo mental o coriorretinitis en el recién nacido. Además, produce infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos como los que padecen de SIDA. El diagnóstico se realiza tradicionalmente por serología, pero la alta prevalencia de anticuerpos IgG específicos contra *T. gondii* en individuos asintomáticos y la alta persistencia en algunas personas de anticuerpos IgM específicos a *T. gondii* por infecciones pasadas, ha complicado la interpretación de dichas pruebas para el diagnóstico de la infección aguda. Por ello, se requieren marcadores diagnósticos más precisos que permitan distinguir confiablemente entre infección reciente y crónica.

Las proteínas del micronema de *T. gondii* son cruciales para la adhesión e invasión a la célula hospedera. Debido a que estas proteínas son expresadas tempranamente durante la fase inicial de la infección y además son antígenos circulantes, estas moléculas podrían ser buenas candidatas como antígenos de diagnóstico, particularmente para discriminar entre infecciones agudas y crónicas de la toxoplasmosis.

Por ello, el objetivo de este estudio fue producir y evaluar la utilidad de una proteína recombinante del micronema de *T. gondii* (Tg MIC10) para el serodiagnóstico de toxoplasmosis humana.

## Métodos

El gen que codifica a la proteína Tg MIC10 se clonó en el plásmido de expresión pGEX. Inicialmente se comprobó la integridad de este plásmido recombinante (pGEX-MIC10) digiriéndolo con la enzimas de restricción *Bam* HI y *Xho* I que cortan el inserto correspondiente al gen MIC10 (Figura 1). Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α con el plásmido recombinante pGEX-MIC10 mediante “choque térmico”; y las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina (Figura 2). La producción de la proteína recombinante GST-MIC10 fue inducida con IPTG (1 mM por 3 horas). La proteína recombinante se purificó empleando glutathione–Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia,Sweden) y su concentración se cuantificó mediante un kit comercial (Bicinchoninic Acid Kit, Sigma).

## Resultados

Se logró purificar a homogeneidad la proteína recombinante (GST-MIC10). Ésta se encuentra en la fracción soluble y tiene un tamaño de 49 KD (26 corresponden a la proteína de fusión GST y 23 a la proteína recombinante TgMIC10) (Figura 3). La proteína fue empleada como antígeno para estandarizar una prueba serológica de ELISA empleando diferentes concentraciones del mismo, sueros controles (positivos y negativos) y conjugado antihumano IgG. Los resultados preliminares mostraron que esta proteína empleada como antígeno en la prueba de ELISA es útil para reconocer a los sueros positivos a toxoplasmosis (Figura 4).

Los mejores resultados para discriminar entre sueros positivos y negativos se obtuvieron con las siguientes condiciones del ELISA: GST-MIC10 (100 µg/ml), sueros controles (diluidos 1/100) y conjugado anti-IgG humano (diluido 1/1000). Para la siguiente fase de estandarización se evaluarán 100 sueros positivos y 100 sueros negativos a *T. gondii* de pacientes procedentes de áreas endémicas del país.

A su vez se evaluarán sueros de pacientes con toxoplasmosis aguda. Para determinar la especificidad de esta prueba, también se analizarán sueros positivos a otros patógenos con similitud antigénica a *T. gondii*.

## Discusión

Los antígenos recombinantes disminuyen el costo de producción y permiten el desarrollo de reactivos estandarizados, reduciendo de esta forma la variabilidad entre resultados y mejorando, por tanto, el serodiagnóstico de infecciones.

Nuestros resultados preliminares son prometedores. La proteína del micronema MIC10 resultó ser una buena candidata como antígeno para el diagnóstico de toxoplasmosis. Queda por determinar su capacidad para diferenciar entre infección aguda y pasada, y evaluar su especificidad frente a sueros positivos a otros patógenos similares.

Figura 1

Construcción y análisis enzimático del clon p-GEX-MIC10

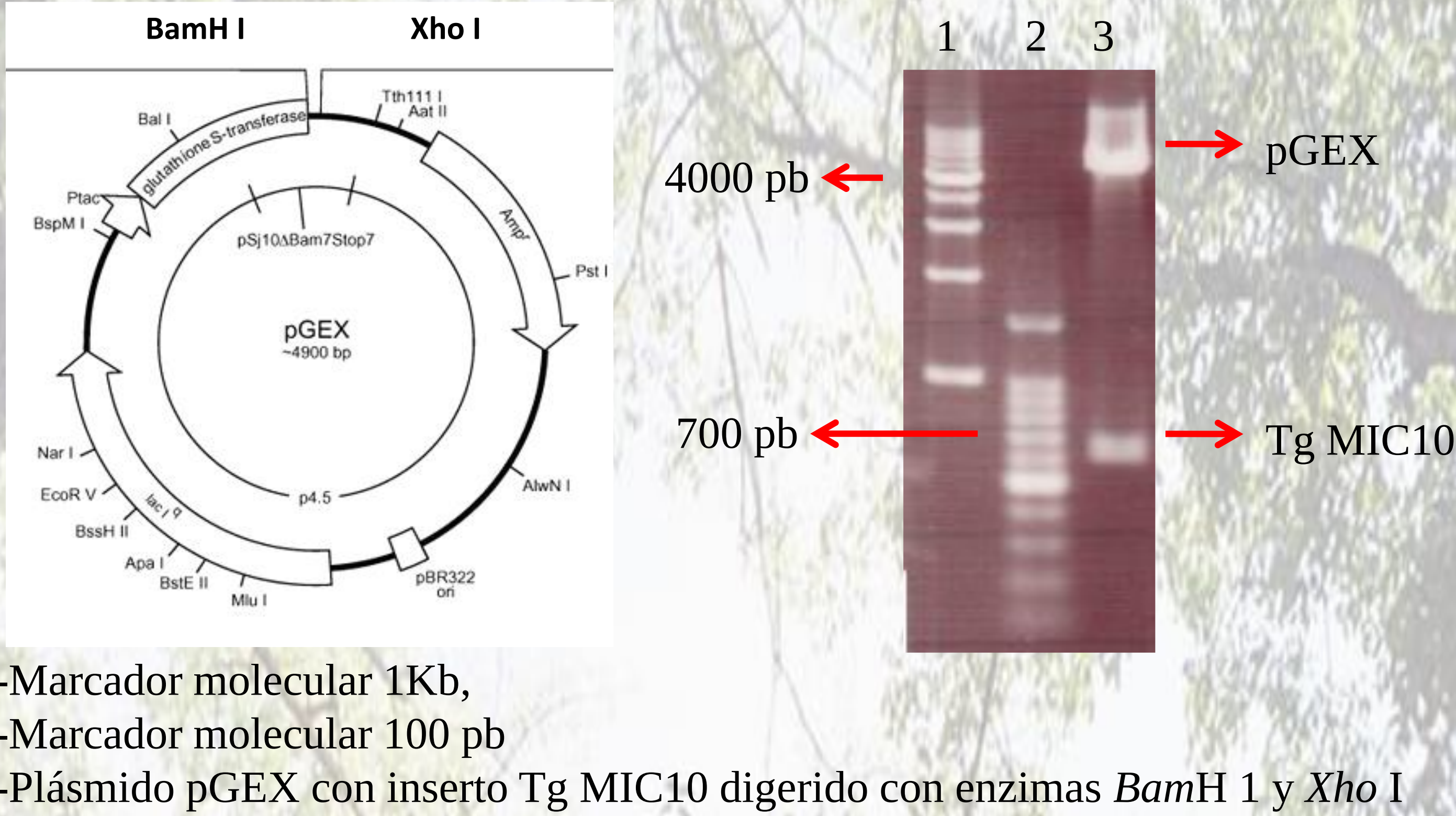
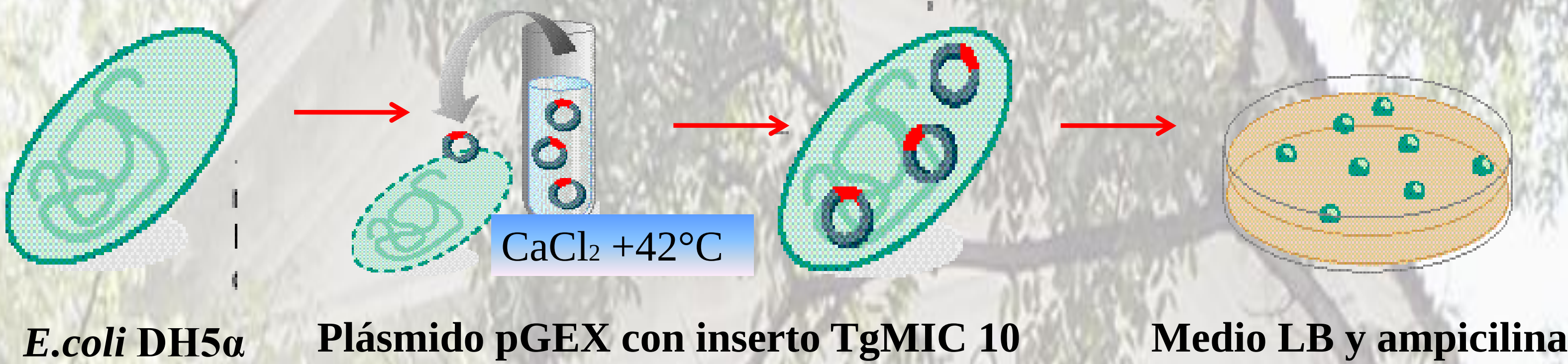


Figura 2

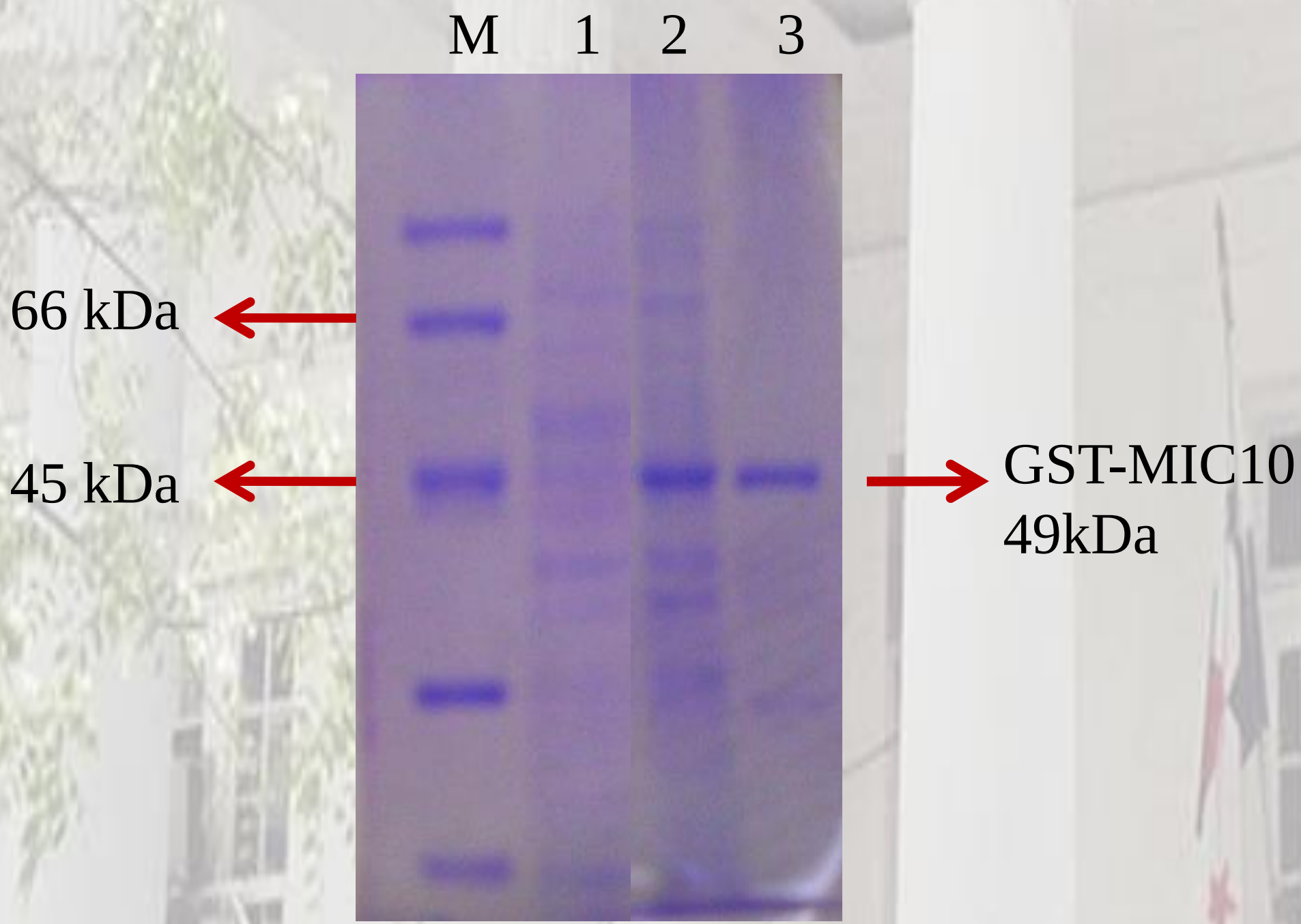
Transformación de plásmido pGEX-MIC 10 en células *E coli* (DH5α)



Las células competentes con CaCl<sub>2</sub> +42°C permiten la entrada de el plásmido. Las bacterias que contienen el plásmido crecen en el medio LB/ampicilina, ya que estos tienen un gen que confiere resistencia a la ampicilina

Figura 3

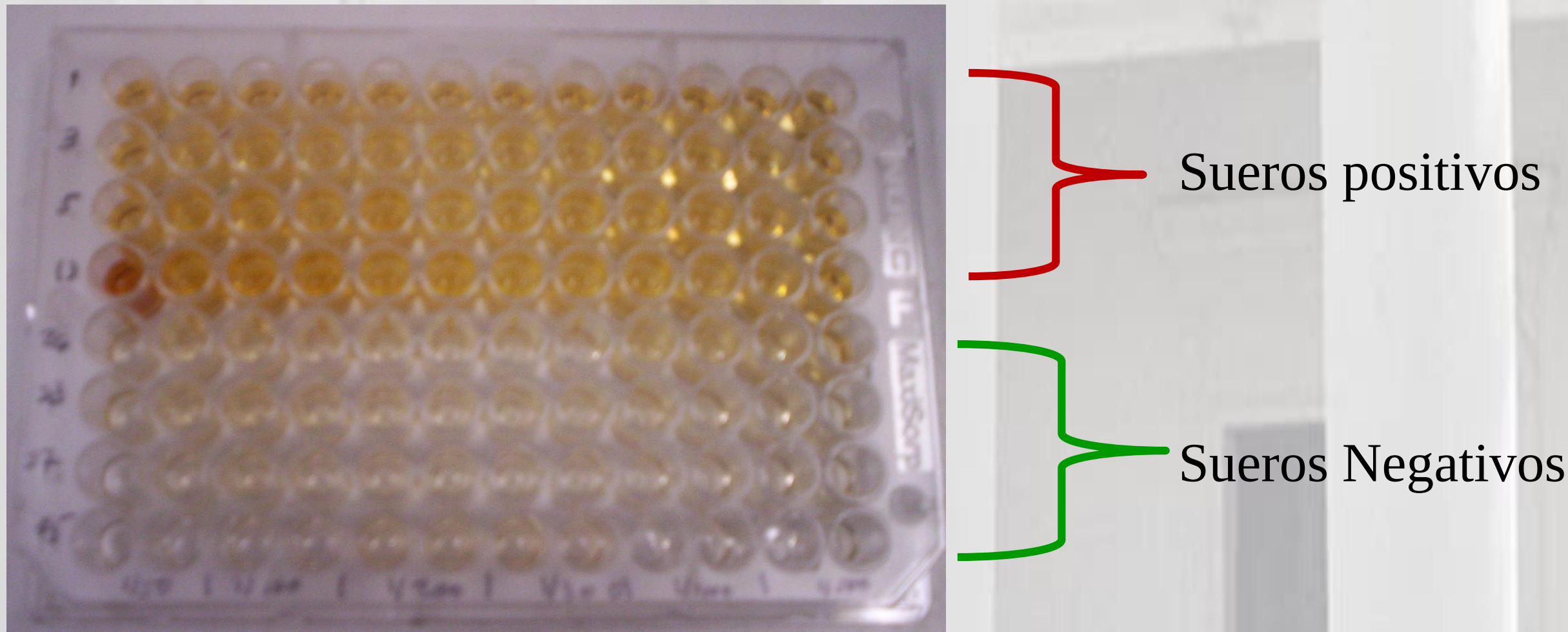
Análisis de la producción de proteína recombinante en gel SDS



- 1- *E.coli* DHα sin inserto
- 2- *E.coli* DH5α con inserto TgMIC 10, inducido, no purificado
- 3- *E.coli* DH5α con inserto TgMIC 10, inducido, purificada

Figura 4

Estandarización de ELISA para detectar anticuerpos IgG anti-TgMIC10



Se evaluaron 4 sueros controles positivos y 4 sueros negativos con antígeno recombinante GST-MIC10 a diferentes diluciones. Se observan diferencias en las absorbancias entre positivos y negativos.