



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**PURIFICACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE
LA LARVA INFECTIVA DE *Trichinella spiralis*
Y SU USO EN ENSAYOS DE PROTECCION Y
DIAGNOSTICO.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
RAMON MAURICIO CORAL VAZQUEZ

SAN JUAN IZTACALA MEXICO

1986

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres en el laboratorio 12 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

A mis Padres, quienes con su amor me han estimulado para seguir adelante.

A mis Hermanos; Gilberto, Maria, Rebeca y David.

A mis Sobrinos, los cuales proporcionan alegría a mi familia

A Araceli, por una infinidad de cosas

A todos mis amigos, por los momentos alegres y tristes

Un agradecimiento especial a la Dra. Ma Guadalupe Ortega
Pierres por haberme instruido y guiado durante la
realización de este trabajo. Además de proporcionarme su
apoyo constante

Un agradecimiento sincero para todos mis compañeros del
laboratorio 12 del Departamento de Genética y Biología
Molecular

Durante el desarrollo de esta tesis el estudiante fue
becario de CONACYT, a quien hace patente su agradecimiento
por la ayuda otorgada

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	12
III. MATERIAL Y METODOS	13
- Reactivos	13
- Material Biológico	14
- Mantenimiento del ciclo de vida de <u>T. spiralis</u>	15
- Obtención de antígenos solubles	16
- Purificación de anticuerpos monoclonales	16
- Conjugación de anticuerpos monoclonales a sefarosa 4B	17
- Purificación de antígenos solubles por cromatografía de afinidad	18
- Análisis electroforético de antígenos purificados	20
- Ensayo de competencia por inmunofluorescencia indirecta	21
- Desarrollo de ensayos para el diagnóstico de triquinosis experimental	22
a) Ensayo de ELISA estándar	23
b) Ensayo de ELISA modificado	24
c) Inmunoelectrotransferencia	25
- Ensayos de protección in vivo	27
IV. RESULTADOS	31
1. Purificación de antígenos de superficie de la larva infectiva de <u>T. spiralis</u>	31
1.1 Purificación del AcM NIM-M1 por precipitación con ácido bórico	31
1.2 Conjugación de NIM-M1 a sefarosa 4b	32
1.3 Purificación de antígenos de la larva infectiva de <u>T. spiralis</u> empleando cromatografía de afinidad	33
1.4 Análisis electroforético de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad	34
2. Determinación de la especificidad de los antígenos purificados	39
3. Empleo de antígenos purificados en el diagnóstico de triquinosis experimental	41
4. Determinación de antígenos de la	

L.I. de <u>T. spiralis</u> en muestras de sueros de animales infectados experimentalmente	47
5. Cinética de reconocimiento antigénico de <u>T. spiralis</u> por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados	52
6. Empleo de antígenos purificados en la inducción de protección en contra de la infección por <u>T. spiralis</u>	55
V. DISCUSION	59
VI. CONCLUSIONES	70
VII. BIBLIOGRAFIA	71

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Esquema del Aparato de Baerman	30
Figura 1. Cromatografía de afinidad	36
Figura 2. Análisis electroforético	38
Tabla I. Determinación de la especificidad de los antígenos purificados	40
Figura 3. Determinación de la respuesta inmune humoral en ratones	44
Figura 4. Determinación de la respuesta inmune humoral en cerdos	46
Figura 5. Detección de antígeno circulante de la L.I.	49
Figura 6. Detección de antígeno circulante de la L.I.	51
Figura 7. Cinética de reconocimiento de antígenos de la L.I. por anticuerpos presentes en sueros de ratones infectados	54
Tabla II. Efecto de los antígenos purificados sobre la infectividad de la larva infectiva de <u>T. spiralis</u>	57
Tabla III. Efecto de los antígenos purificados de la larva infectiva de <u>T. spiralis</u> sobre la expulsión de parásitos adultos	58

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo monoclonal
AFS	Amortiguador fosfato salino (NaCl 0.136 M, KCl 0.0027 M, KH ₂ PO ₄ 0.0015 M y Na ₂ HPO ₄ 0.0013 M, pH 7.2
ASB	Albúmina sérica bovina
AFS-ASB	Albúmina sérica bovina al 0.1% en Amortiguador fosfato salina
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Enzyme-linked immunadsorbent assay
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Kd	Kilodaltones
L.I.	Larva infectiva
L.R.N.	Larva recién nacida
Mr	Migración relativa
PM	Peso molecular
PMSF	fenil metil sulfonil fluoride
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N ^o N ^o N ^o N ^o Tetrametiletilen diamina
TLCK	N -p Tosil-L-lisina clorometil cetona
TPCK	L-1- Tosilamida-2-fenil etil clorometil cetona

RESUMEN

Por medio de la cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 se purificaron cuatro antígenos de la larva infectiva de Trichinella spiralis. Dichos antígenos, fueron los primeros en ser reconocidos por anticuerpos presentes en los sueros de ratones durante el curso de una infección primaria. La inmunización de ratones con estos antígenos indujo un 74 o 52% de protección en la infección por el parásito. El grado de protección fué dependiente de la dosis de antígeno empleada. Además, la inmunización de ratones con antígenos purificados también tuvo un efecto marcado en la expulsión de parásitos adultos.

En el diagnóstico de la triquinosis experimental se, emplearon los antígenos purificados así como los anticuerpos monoclonales en ensayos de ELISA para la detección de la cinética de aparición de anticuerpos o en la detección de antígenos circulantes del parásito en sueros de animales infectados respectivamente. El empleo de los antígenos purificados en estos ensayos permitió obtener una mayor especificidad que cuando se emplearon antígenos crudos. En cuanto a los ensayos realizados con los anticuerpos monoclonales, se mostró que es posible detectar antígenos circulantes en sueros de animales infectados.

I. INTRODUCCION

Una gran cantidad de helmintos viven como parásitos dentro de los tejidos o en los intestinos del hombre, así como en una amplia variedad de animales, ya sea durante alguna fase de su ciclo de vida o en la totalidad de este.

Dentro de estos organismos los nemátodos son probablemente el grupo más exitoso de parásitos (1), constituyendo un problema de salud tanto a nivel médico como veterinario (2).

Trichinella spiralis es un nemátodo que se aloja principalmente en el tejido muscular del huésped, siendo el causante de la triquinosis, enfermedad que ha llamado la atención de los investigadores por más de 100 años (3). En el hombre la principal vía de infección es la carne de puerco contaminada con larvas infectivas viables.

El ciclo de vida de T. spiralis se inicia con la larva infectiva (L.I., 1er estadio) que se encuentra en el músculo esquelético dentro del quiste. Cuando se ingiere carne infectada la larva es liberada del quiste por efecto del medio ambiente estomacal (Pepsina-HCl). Las larvas liberadas pasan al intestino delgado en donde sufren cuatro mudas y maduran a parásitos adultos (2o estadio) (4). Estos se localizan en las cavidades del duodeno y yeyuno donde se lleva a cabo la cópula. Las larvas recién nacidas (L.R.N., 3er estadio) permanecen durante algún tiempo en el útero de la madre. Posteriormente son expulsadas de este penetrando la mucosa intestinal hasta llegar a linfáticos y corriente sanguínea, vía por la cual son

distribuidas al tejido muscular (5), preferentemente músculo esquelético. Las larvas migratorias penetran la membrana de las células musculares, presentando un desarrollo gradual dentro del músculo y junto con la célula del huésped forman una estructura llamada célula nodriza (6). Después de 21 a 28 días se origina la forma enquistada con la cual se completa el ciclo de vida.

El tiempo que transcurre entre ingestión y encapsulamiento en el músculo y la duración de cada estadio del ciclo de vida varía, entre especies de huéspedes y entre razas de una misma especie (7).

En estudios empleando diferentes cepas de ratones se ha podido comprobar que la resistencia a la infección con L. spiralis está altamente influenciada por el acervo genético de los organismos (8,9). Teniendo gran importancia los genes ligados al complejo principal de histocompatibilidad (10,11).

La triquinosis presenta síntomas, así como reacciones fisiopatológicas que dependen de la intensidad de la infección y del desarrollo del ciclo de vida del parásito. Cuando los adultos se encuentran en el intestino delgado se puede presentar diarrea, dolor abdominal, náusea y vómito, lo cual se asocia con una inflamación duodenal que coincide con la infiltración de células cerca del sitio de infección. En esta etapa se pueden detectar primeramente neutrófilos y subsecuentemente un incremento en el número de células cebadas y leucocitos. Dicha inflamación precede a la expulsión de parásitos adultos del intestino. En la etapa de migración de las L.R.N. hacia el tejido muscular y su posterior enquistamiento en músculo, se manifiesta una debilidad

generalizada, fatiga, dolor muscular, edema bilateral de los párpados y congestión conjuntival. Aunado a estos síntomas se produce ensanchamiento del bazo y nódulos linfáticos mesentéricos ocurriendo una destrucción parcial de las áreas corticales y centros germinales de estos, observándose también, un incremento en el número de eosinófilos en la sangre. La larva muscular produce cambios en el tejido circundante, degeneración del tejido cercano a la célula muscular invadida y así mismo ocurre un influjo de células inflamatorias, seguido de macrófagos y la formación de granuloma.

La triquinosis es una enfermedad de difícil diagnóstico, ya que varios de sus síntomas coinciden con aproximadamente 50 padecimientos (12). Aunque, existen algunas características que la hacen distintiva, estas en muchas ocasiones son desconocidas por los especialistas (13). En México la enfermedad es escasamente diagnosticada, pero observaciones recientes de varios brotes sugieren que la frecuencia de la enfermedad esta aumentando (14). Además, se ha sugerido que la urbanización de algunas zonas rurales de nuestro país en los últimos años, pudo haber provocado una interacción entre animales silvestres infectados y ganado porcino, incrementando así la parasitosis en cerdos, lo cual trajo como consecuencia un aumento en la infección en humanos (15).

T. spiralis provee un buen modelo para el estudio de las enfermedades producidas por parásitos helmintos, debido a que su ciclo de vida completo ocurre en un solo huésped. Adicionalmente, el síndrome de la enfermedad en humanos puede ser estrechamente

reproducido en animales experimentales, como son ratas y ratones. De estos se pueden obtener cada uno de los estadios del ciclo de vida del parásito para su estudio in vitro. Los conocimientos que se obtengan de la respuesta inmune que evoca T. spiralis puedan ser aplicados en el estudio de otras enfermedades ocasionadas por helmintos.

La cutícula de T. spiralis reviste un gran interés para el estudio de la infección desde un punto de vista inmunológico, debido a que esta estructura es el primer sitio de interacción entre el parásito y el sistema inmune del huésped. Philipp y col. (16) realizaron un estudio de las proteínas cuticulares por marcaje con Iodo-125 y electroforesis en geles de poliacrilamida duodecil sulfato de sodio, observando que existen cambios antigénicos entre estadios. La L.I. presenta cuatro proteínas cuticulares con un peso molecular de 47,000 55,000, 96,000 y 105,000 daltons. Parásitos adultos de uno a dos días de vida presentan proteínas con pesos moleculares de 56,000, 38,000, 40,000 y 20,000; las proteínas de más bajo peso molecular incrementan su cantidad cuando los adultos tienen seis días de vida. Las L.R.N. expresan dos proteínas mayoritarias de peso molecular de 58,000 y 64,000; y dos proteínas muy escasas con un peso molecular de 28,000 y 30,000. También midieron la proteína radioactiva liberada por parte de parásitos adultos y L.I.. Ambos estadios liberan sus respectivos componentes marcados en el sobrenadante al ser incubados. Cuando se adicionaron neutrófilos de rata (con suero normal o inmune), la tasa de liberación de cada parásito se incrementó.

Estudios más recientes señalan que tales cambios se pueden presentar dentro de un mismo estadio (17-18). Como ocurre con la L.R.N., que durante las primeras seis horas de vida in vitro expresa en la cutícula únicamente la proteína de 64,000, posteriormente es posible detectar las otras tres proteínas ya mencionadas . Estos estudios sugieren que la cutícula de estos parásitos es una estructura dinámica en el sentido de que puede presentar recambio antigénico. Parkhouse y Clark (19) extienden las investigaciones de antígenos estadio específicos a dos componentes más de T. spiralis: secreciones y constituyentes totales del cuerpo. Obteniendo en ambos casos proteínas estadio específicas. Además de que algunas parecen ser inmunogénicas en infecciones naturales de ratones. En un análisis adicional, las glucoproteínas totales de los parásitos fueron resueltas en una electroforesis bidimensional en gel, detectadas por sobrelapamiento de 125-Iodo-concanavalina A y subsecuente autorradiografía. Los resultados revelaron la presencia de varias glucoproteínas estadio específicas para cada uno de los tres estadios del ciclo de vida.

Despommier y Muller (20) encontraron que las células del esticocoma de la L.I. de T. spiralis contiene dos tipos principales de gránulos, alfa y beta. Cada uno de estos contiene antígenos que son idénticos a aquellos derivados de los productos de excreción-secreción, y además son capaces de inducir inmunidad

La infección por T. spiralis induce una respuesta inmune tanto humoral como celular muy marcada. En ratones infectados se induce la producción de diferentes clases de anticuerpos contra

distintos estadios del parásito, así como en contra de distintos antígenos del organismo (21). Se ha reportado que inmunoglobulinas de la subclase IgG1 e IgG2 de ratones reaccionan fundamentalmente con antígenos de células del esticocoma y cutícula, mientras que anticuerpos de la clase IgA e IgM tienden a presentar reactividad con la membrana del parásito.

Una de las características de la infección por T. spiralis es la presencia de una reacción inflamatoria. Estudios in vitro acerca de la interacción entre la superficie del parásito y componentes celulares y humorales de ratones infectados (22) han demostrado que los eosinófilos se adhieren más rápido y por más tiempo a la superficie de las L.R.N. en presencia de suero normal no inactivado o suero inmune, esta adherencia va seguida de degranulación de los mismos. Los macrófagos también se adhieren en presencia de los mismos componentes. Los neutrófilos y células cebadas se adhieren de manera relativamente breve en presencia de suero fresco normal o suero inmune. La adherencia de este último tipo celular ocurre principalmente en presencia de suero inmune tomado a los 17 días post-infección, sugiriendo la participación de una clase definida de anticuerpos. La muerte y destrucción de las L.R.N. se lleva a cabo en presencia de eosinófilos y suero inmune (23). La muerte de las larvas se acrecenta cuando el suero inmune que se emplea es fresco y la suspensión de eosinófilos contiene macrófagos.

Estudios realizados por Kazura (24) sobre el efecto in vitro de granulocitos y suero de pacientes con triquinosis sobre la L.R.N. de T. spiralis, demostraron que eosinófilos y

neutrófilos se adhieren a dicho estadio larval ejerciendo un efecto citotóxico. Este daño fué dependiente de la presencia de anticuerpos IgG estadio específicos que aparecen a las tres semanas de infección. En estos ensayos, el complemento no parece aumentar el efecto citotóxico de los granulocitos.

La actividad de los eosinófilos *in vitro* puede considerarse un mecanismo de defensa del huésped en contra del parásito que ocurre in vivo. Sin embargo, recientes estudios (23) ponen de manifiesto que el número de larvas musculares en ratones "beige", los cuales poseen granulocitos anormales, después de una primera infección, no es significativamente distinto del número encontrado en los controles. Muchos de los eosinófilos de "beige" no se aplanan y desgranulan sobre la superficie de la L.I. de I. spiralis en presencia de suero inmune in vitro. Sin embargo, la adición de sobrenadante de neutrófilos normales, en particular lisozima (enzima que ayuda a desarrollar en los eosinófilos una capacidad adicional para ligarse a IgG), a los eosinófilos de "beige", aumenta su capacidad de adhesión por medio de receptores Fc. Estas observaciones sugieren que el fracaso para adherirse firmemente en presencia de anticuerpos, esta en la incapacidad para desgranularse y no en el proceso de adhesión de ellos mismos. Lo anterior se apoya en las observaciones realizadas por Butterworth y col. (25), los cuales han visto que la adherencia firme de eosinófilos depende de una desgranulación breve después de la unión inicial.

Algunos trabajos se han realizado para relacionar la adherencia de eosinófilos y el reconocimiento de antígenos de

superficie del parásito por parte del huésped. Philipp y col. (26) encontraron que los anticuerpos obtenidos de ratas infectadas , que precipitan moléculas de la superficie de I. spiralis marcadas con 125-Iodo, aparecen en la circulación en paralelo con aquellos que median adherencia de eosinófilos a parásitos adultos y L.R.N.. Así mismo, se detectaron anticuerpos dirigidos en contra de antígenos de la L.I., los cuales median adherencia de células al parásito hasta el día 20 post-infección. Posteriormente el título de estos desciende gradualmente, mientras que el título de anticuerpos que precipitan componentes de la superficie del parásito persiste. En ratones, el patrón de producción de anticuerpos es más complejo. Jungery (23) comparó la respuesta de dos cepas de ratones: NIH, los cuales expulsan rápidamente parásitos adultos del intestino, y ratones C3H, en los cuales el mismo estadio persiste por 30 días o más. En ambas cepas los anticuerpos que median la adherencia de los eosinófilos hacia la L.I. aparecen después de los 30 días de infección. Dichos anticuerpos no se detectan en reacciones de adherencia a parásitos adultos. Todos los antígenos de superficie de los tres estadios del ciclo de vida de I. spiralis marcados con 125-Iodo fueron inmunogénicos, medido esto por un ensayo de inmunoprecipitación. Sin embargo, el suero de ratones NIH contiene anticuerpos que reconocen antígenos de superficie radiomarcados de los tres estadios del parásito, en etapas iniciales de la infección, mientras que el suero inmune de ratones C3H reconoce más tardíamente estos antígenos. Los resultados anteriores sugieren que la acción de las células

inflamatorias y reconocimiento inmunológico de antígenos del parásito puede estar asociado con el desarrollo de la capacidad para controlar la infección por T. spiralis in vivo.

Durante la fase intestinal T. spiralis es capaz de inducir una gama de respuestas protectoras. Bell y col. (27) realizaron varios experimentos en los cuales llevaron a cabo infecciones abreviadas con productos químicos o transplantaron parásitos de una edad determinada en el intestino de ratas normales e inmunes. Estos estudios definieron cuatro respuestas que operan en el intestino de ratas: (1) rápida expulsión, (2) inmunidad anti-preadulto, (3) inmunidad anti-adulto y (4) efecto de antifecundidad. Wakelin y Lloyd (28) encontraron que estas respuestas también se presentan en ratones de la cepa NIH.

Una serie de trabajos en modelos experimentales (ratón y rata) han mostrado que la expulsión rápida de adultos constituye el principal mecanismo de defensa en contra de la infección por T. spiralis (29,30,31). Aunado a esto, se ha observado que los estadios de preadulto y L.I. son más eficaces que el estadio de adulto en estimular una rápida expulsión del parásito (32).

En ensayos de transferencia de inmunidad empleando células de animales infectados, se ha demostrado que las células B o T de ratones infectados son capaces de transferir inmunidad a ratones normales (33). Teniendo un mayor efecto las células T. La inmunidad transferida a ratones receptores se manifestó por un efecto de antifecundidad y por una rápida expulsión de parásitos del intestino.

En trabajos similares, Grenais y col. (34) encontraron que

las células de nódulos linfáticos mesentéricos provenientes de ratones, a los cuales únicamente se les enfrento con el estadio de L.I. o preadulto, presentaron una alta actividad blástica. Así mismo, estas células son capaces de transferir un grado mayor de inmunidad a ratones normales, detectado por la expulsión acelerada de adultos, que las células provenientes de ratones a los cuales se les transplantaron quirúrgicamente adultos de cinco días de vida.

Recientemente, el avance en técnicas inmunológicas ha permitido un mejor estudio de antígenos parasitarios. Entre estas podemos mencionar la tecnología de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales (35).

Ortega-Pierres y col. (18) obtuvieron dos anticuerpos monoclonales, dirigidos contra antígenos de superficie, para cada estadio de T. spiralis. En cada caso, los dos anticuerpos (dos por estadio) reconocen los mismos componentes de la preparación solubilizada de antígenos de superficie. Sin embargo, solo uno de los dos fué capaz de reaccionar con la superficie del parásito vivo, aquellos que no lo hacen estan dirigidos contra epítopes no expuestos en la superficie. La inducción de anticuerpos contra estos determinantes puede lograrse si estos componentes de superficie son liberados por el parásito. Y, de esta manera se exponen al sistema inmune del huésped. En otros estudios de los mismos autores (36) se obtuvo un anticuerpo monoclonal que promueve adherencia de eosinófilos a la superficie de la L.R.N. de T. spiralis in vitro, esta asociación trae como consecuencia la muerte del parásito. Este fenómeno se incrementa

en presencia de suero normal de ratón. Es interesante destacar que el mismo anticuerpo reduce significativamente (36-51%) la infectividad de la L.R.N. in vivo.

Existen una serie de técnicas bioquímicas de separación de proteínas que han sido empleadas (37) con la finalidad de obtener antígenos de T. spiralis aislados. Con el advenimiento de la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales, reactivos que presentan una alta especificidad y homogeneidad, la purificación de antígenos parasitarios se puede realizar de una manera más eficaz empleando cromatografía de afinidad.

La importancia de contar con antígenos purificados radica en el hecho de que estos pueden ser probados de manera más específica en pruebas para determinar su capacidad de inducir inmunidad en modelos experimentales, utilizarlos en técnicas inmunológicas con la finalidad de desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles o evaluar su participación en otros atributos de la relación huésped-parásito.

II. OBJETIVOS

- Purificación de antígenos de superficie de la larva infectiva del nemátodo parásito Trichinella spiralis por medio de cromatografía de afinidad empleando anticuerpos monoclonales.
- Empleo de anticuerpos monoclonales y antígenos purificados en el desarrollo de métodos de diagnóstico más sensibles para la triquinosis, utilizando como modelo experimental a ratones.
- Evaluación de la capacidad de los antígenos purificados en inducir protección en ratones normales.

III. MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS

Baker:

Acido bórico
Bicarbonato de sodio
Carbonato de sodio
Cloruro de potasio
Cloruro de sodio
Diethylamina
Etanol
Eter
Fosfato de potasio monobásico
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado
Glicerol
Hidróxido de sodio
Isopropanol
Metanol

Bio-Rad:

Acrilamida
Azul brillante de coomassie R-250
Bisacrilamida
N^oN^oN^oN^o-tetrametiletildiamina

Calbiochem:

Aquazida

Difco:

Adyuvante completo de Freund
Bacto-Agar

Merck:

Acetato de sodio
Acetonitrilo
Acido acético glacial
Acido clorhídrico
B-mercaptoetanol
Folin-cioocalteau
Sulfato de cobre heptahidratado
Tartrato de sodio y potasio

Palikan:

Tinta india

Pharmacia:

Estándares de peso molecular
Sefarosa-4B

Sigma:

Albúmina sérica bovina	Tween-20
Azida de sodio	Urea
Bromuro de cianógeno	
2-4-Cloronaftol	
Deoxicolato de sodio	
Dodecil sulfato de sodio	
Fenil metil sulfonyl fluoruro	
Negro de asido	
O-fenilendiamina	
Peróxido de hidrógeno	
Persulfato de amonio	
(L-)Tosilamida 2feniletíl clorometil cetona	
N-p-tosil-1-L lisina clorometil cetona-HCl	
Tris-ácido clorhídrico	
Tris-base	

MATERIAL BIOLÓGICO

Animales:

Ratones de la cepa Balb/c de 2 a 3 meses de edad, ya sea hembras o machos, fueron empleados en los diversos experimentos que se llevaron a cabo, así como en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito. Este último también fue obtenido en ratas de la cepa Wistar de 2 a 5 meses de edad.

Los organismos fueron albergados en cajas de plástico con aserrín esterilizado a 120°C durante 20 minutos en autoclave. Se alimentaron con alimento comercial para ratas y ratones, el cual fue esterilizado por calor seco a 150°C durante 30 minutos. El agua que se les proporcionó era acidificada y suplementada con vitaminas.

Parásitos:

La cepa de Trichinella spiralis que se empleó en este

trabajo fue originalmente donada por la Q.B.F. Rosario Chapa de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-I.P.N.. El ciclo de vida de este parásito se ha mantenido por 2 años en el Lab. de la Dra. Ortega del Depto. de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-I.P.N..

MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE Trichinella spiralis

El aislamiento de las L.I. se llevó a cabo de acuerdo a los métodos descritos por Dennis y col. (37) y Mackenzie y col. (38). Ratas y ratones con 28 o más días de infección fueron sacrificados con éter, posteriormente se les quitó la piel y se sangraron del corazón para obtener suero inmune. Las extremidades y la cabeza fueron cortadas, y se extrajeron las vísceras, quedando únicamente músculo esquelético y tejido óseo. Estos últimos fueron macerados en trozos muy pequeños. El material así obtenido se colocó en una solución de pepsina-HCl al 1% y se incubó 3 hrs. a 37°C. Subsecuentemente la mezcla de digestión fue tamizada y vertida en un embudo grande al cual se le tapó el tallo con parafilm. Después de 10 minutos las L.I. fueron colectadas del fondo del embudo en tubos falcon cónicos de 15 ml. y se centrifugaron a 1200 rpm 3 minutos en una centrifuga clínica (Damon IEC/Division). El sobrenadante se decantó y las L.I. fueron lavadas con AFS.

La determinación del número de L.I. obtenidos se realizó por el conteo de larvas en un volumen definido (10 μ l), el cual se tomó de una dilución (1:100) de L.I. en bacto-agar al 0.2%. Para esto se empleó el objetivo de 10X de un microscopio óptico (BHA, Olympus Tokyo). Las larvas que se utilizaron para

infectar ratas y ratones se resuspendieron en bacto-agar al 0,2%, para evitar que se sedimentaran. La infección se realizó por vía intragástrica con cánula y jeringa. Las dosis empleadas fueron 600-700 L.I./ml por ratón y 6000-6500 L.I./ml por rata.

OBTENCION DE ANTIGENOS SOLUBLES

El extracto antigénico de L.I. de T. spiralis se obtuvo siguiendo el protocolo reportado por Parkhouse y col. (39). Un paquete considerable de L.I. (aproximadamente 300,000-600,000) se resuspendió en amortiguador tris-base 10 mM pH 8.3, el cual contenía inhibidores de proteasas (TPCK 50 ug/ml diluido en etanol, TLCK 25 ug/ml diluido en agua y PMSF 174 ug/ml diluido en isopropanol). Los parásitos se homogenizaron durante 20 minutos a 4°C en un homogenizador manual (Wheaton). Con la finalidad de solubilizar proteínas se agregó a la suspensión de larvas deccicolato de sodio a una concentración del 4% y esta se dejó reposar durante 20 minutos. Pasado el tiempo se homogenizó nuevamente por otros 20 minutos. El extracto fue clarificado mediante centrifugación, 12,000 rpm 30 minutos a 4°C en una centrífuga eppendorf 5414. La cuantificación de los antígenos proteínicos se hizo mediante el método de Lowry (40).

PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los AcM dirigidos contra la superficie de la L.I. de T. spiralis, obtenidos por Ortega y col. (18), fueron precipitados con ácido bórico al 2% a partir del líquido ascítico extraído de ratones inoculados con la clona híbrida productora del AcM (NIM-M1). Por cada 20 ml de ácido bórico se adicionaron por goteo 2 ml del líquido ascítico y se dejó la

solución 2 hrs. en hielo para permitir una precipitación total de las inmunoglobulinas. La solución fue centrifugada a 1200 rpm 20 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC2-E refrigerada con el rotor SS34. La pastilla se resuspendió en el mínimo de volumen con AFS y se dializó extensamente contra el mismo amortiguador para remover el exceso de ácido bórico. El dializado se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente y se determinó la cantidad de proteína contenida en el sobrenadante por el método de Lowry.

CONJUGACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A SEFAROSA 4B

Los AcM purificados se acoplaron a sefarosa-4B por el método de activación con bromuro de cianógeno (41), con el propósito de preparar columnas de afinidad de sefarosa 4B-AcM. Para ello 10 ml de sefarosa-4B (lavada extensivamente con agua bidestilada y desmineralizada) fueron resuspendidos en 10 ml de carbonato de sodio 2 M. La mezcla fue colocada en hielo y se agregaron lentamente con una leve agitación 20 ml mas de carbonato de sodio 2 M. Enseguida se aumento la velocidad de agitación para adicionar 1 ml de la solución de acetonitrilo con bromuro de cianógeno (2 gr/ml) y se mezcló vigorosamente durante 2 minutos. Una vez activada la sefarosa se transfirió a un embudo de filtro poroso colocado en un matraz kitasato y se lavó con 200 ml de cada una de las siguientes soluciones: amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5, agua bidestilada y amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 9.5. Después, la masa de gel húmeda se transfirió a un recipiente de plástico que contenía los AcM disueltos en amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 9.5 y se incubó 20 hrs. a 4°C

Al término de la incubación se procedió a enmascarar los grupos activos del gel que no reaccionaron con la proteína, mediante la adición de 1 ml de glicina 1 M en amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 9.5 e incubando 4 hrs. a 24°C. Antes de agregar la glicina se tomaron 200 μ l del sobrenadante para evaluar el rendimiento de unión de AcM a sefarosa-4B. Posterior a la incubación se lavó nuevamente la resina ya conjugada con el AcM, con las siguientes soluciones: 400 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4, 400 ml de úrea 2 M con cloruro de sodio 0.5 M, 400 ml de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 10 con cloruro de sodio 0.5 M y 400 ml de amortiguador fosfato-salino 0.15 M pH 7.2.

El gel conjugado con AcM fue almacenado en AFS pH 7.2 con azida de sodio 0.1% a 4°C.

Todos los amortiguadores se prepararon de acuerdo a las tablas reportadas en Methods in enzymology (42).

PURIFICACION DE ANTIGENOS SOLUBLES POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

La purificación de los antígenos de la L.I. por columnas de AcM, se llevó a cabo con el objeto de emplear estos antígenos en el desarrollo de ensayos para el diagnóstico de la triquinosis y en ensayos de protección in vivo.

Preparación de la columna:

Un volumen (5 ml) de la sefarosa 4B-AcM fue empaquetado en una columna de 1.3 x 30 cm (Bio-Rad). La columna de afinidad se lavó con 1 volumen de agua, 1 volumen de amortiguador alk-strip (dietilamina 50 mM, 2% de deoxicolato de sodio pH 11.5) y se equilibró con varios volúmenes de amortiguador de columna (tris-

HCl 20 mM, deoxicolato de sodio al 0.5% pH 8.3) hasta que el pH de la resina fue igual al de la solución.

Preparación de la muestra de antígenos de L.I. y elución de antígenos de la columna:

El extracto soluble total de L.I. (20-24 mg ver método de obtención de antígenos solubles) fue centrifugado a 100,000 rpm 15 minutos en una microcentrífuga (Air-Fuge Beckman), para descartar precipitados que pudieran interferir con la cromatografía. El sobrenadante se paso por la columna tres veces y esta se lavó con el amortiguador de columna hasta que la D.C. de las fracciones colectadas fue 0, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Carl Zeiss PMQII). La elución del antígeno adherido a la columna se llevó a cabo en condiciones de pH básico, empleando dos tipos de amortiguadores; pre-strip (glicina 50 mM, deoxicolato de sodio al 2% pH 9.3) y alk-strip. El cambio de amortiguador se realizó de acuerdo a la D.C. de las fracciones colectadas. El material eluido fue colectado en fracciones de 0.5 ml y la cantidad de proteína se monitoreo por la absorbancia a 280 nm. Las fracciones eluidas que contenian los antígenos purificados se llevaron a un pH de 8.3, con una solución de tris-HCl 1 M. Al término de la elución la columna se reconstituyo lavando con 2 volúmenes de amortiguador de columna, 2 volúmenes de agua bidestilada y con AFS hasta que el pH de la resina igualó al de éste. El gel se preservó en AFS con azida de sodio al 0.1%. De acuerdo al patrón de elución, las fracciones que contenian proteína se juntaron y se dializaron extensivamente contra una solución de tris-HCl 20 mM pH 8.3. La concentración de

proteína en las muestras colectadas se determinó por el método de Lowry. En algunos casos se requirió concentrar las muestras, para lo cual se empleó aquazida.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ANTÍGENOS PURIFICADOS

Para determinar el peso molecular de las proteínas obtenidas en cada pico de elución, se hicieron geles verticales de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS de acuerdo al método de Laemmli (44). Los geles se prepararon en placas de vidrio con separadores de 1.5 mm, de acuerdo al siguiente formato:

Gel espaciador: 10 ml de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) 11.25 ml de tris-base 1 M pH 8.8, 0.15 ml de SDS al 20%, 8.4 ml de agua desmineralizada, 13 μ l de TEMED y 90 μ l de persulfato de amonio al 10%. La mezcla fue colocada entre los cristales e inmediatamente se agregaron 2 ml de isopropanol puro, para evitar que se curvara el gel al polimerizar. La polimerización se concluyó a los 30 minutos.

Gel concentrador: 1.7 ml de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 ml de tris-base 1 M pH 6.8, 50 μ l de SDS al 20%, 7.5 ml de agua desmineralizada, 10 μ l de TEMED y 50 μ l de persulfato de amonio al 10%. Al término de la polimerización del gel separador se lavó el isopropanol y se colocó entre los cristales un peine de 20 pozos. Enseguida se aplicó la solución formadora del gel concentrador, la cual se dejó polimerizar por lo menos durante 30 minutos.

El amortiguador para electroforesis consistió de 3.02 gr de tris-base, 14.41 gr de glicina y 5 ml de SDS al 20% aforado a 1 L y llevado a un pH de 8.8. Las alícuotas de los picos de la

Cromatografía se aplicaron a una cantidad de 10-50 μ g en amortiguador de muestra (0.302 gr de tris-base, 0.4 gr de SDS, 5 gr de glicerol, 0.004 gr de pironina Y y 0.75 ml de 2-mercaptoetanol aforado a 1 L con pH 6.8). La electroforesis se realizó en una cámara vertical (ERL) con una fuente de poder 1800 (modelo 493), a un voltaje inicial de 100 volts, hasta que todas las muestras penetraron el gel concentrador, posteriormente se disminuyó el voltaje a 50-60 volts y se realizó la corrida durante toda la noche a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos durante 1 hora con una solución de metanol al 50%, ácido acético al 10% y azul de coomassie al 0.1%. El exceso de colorante se removió con etanol al 50%, cuando se hicieron evidentes las bandas de proteína la solución decolorante se cambió a metanol al 5% y ácido acético al 7%, hasta obtener la nitidez deseada en el patrón proteico.

La determinación de la Mr de las proteínas eluidas se realizó por medio de los siguientes estándares de peso molecular: fosforilasa b (94 Kd), albumina (67 Kd), ovoalbumina (43 Kd) anhidrasa carbonica (30 Kd), inhibidor de tripsina (20 Kd) y lactoalbumina (14 Kd).

ENSAYO DE COMPETENCIA POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Con la finalidad de determinar la especificidad de los antígenos purificados se llevaron a cabo ensayos de competencia por IFI (18). Por medio de estos se determinó la reactividad del AcM NIM-M1 con las fracciones antigénicas purificadas versus los antígenos de superficie de la L.I.

En el desarrollo de estos ensayos primeramente se determinó

la dilución mínima de AcM que daba reacción positiva con los parásitos vivos. Esta se obtuvo por ensayos de IFI con L.I. viables y fue de 1:800. A continuación se describen los pasos que se siguieron para los ensayos de competencia:

Se tomaron alícuotas (50 μ g de proteína) de algunas fracciones colectadas en la cromatografía de afinidad y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el AcM diluido 1:800 en AFS-ASB. Posterior a la incubación la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm 3 minutos en una centrifuga eppendorf 5414. El sobrenadante de cada muestra se colectó y se agregó individualmente a tubos eppendorf, los cuales contenían 150 L.I. previamente lavadas con una solución de AFS-ASB. En este paso se incluyeron los controles positivo (L.I. + AcM 1:800) y negativo (L.I. + AFS-ASB). Los parásitos se incubaron 1 hora a 4°C. Al término de esta las L.I. se centrifugaron a 1000 rpm 2 minutos en una centrífuga clínica refrigerada (Beckman modelo TJ-6). Se removió el sobrenadante y se lavaron los parásitos con AFS-ASB. Estos se centrifugaron nuevamente y después de remover el sobrenadante se agregó el conjugado fluorescente (Ig de cabra anti Ig de ratón acopladas a isotiocianato de fluorescina), diluido 1:2000 con AFS-ASB. Después de incubar 20 minutos a 4°C las L.I. se lavaron y se resuspendieron en 20 μ l de AFS-ASB. De esta suspensión se montaron preparaciones para observarlas al microscopio de fluorescencia (Zeiss).

DESARROLLO DE ENSAYOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TRIGUINOSIS EXPERIMENTAL

En estos ensayos se emplearon básicamente tres técnicas:

a) Ensayo de ELISA estándar (46), b) Ensayo de ELISA modificado (47) y c) Inmunolectrotransferencia (48). En cada una de estas se utilizaron sueros de 5 ratones infectados con 200 L.I. por vía intragástrica. Los sueros fueron colectados durante un período de 3 meses, sangrando a los ratones semanalmente de la vena ocular con pipeta pasteur, a partir del día de infección. Los sueros control provenían de 5 ratones no infectados, pero sangrados de igual manera que el grupo experimental.

a).- Ensayo de ELISA: Este ensayo se empleó para determinar la cinética de aparición y niveles de anticuerpos presentes en el suero de animales infectados. La determinación se llevó a cabo en muestras de sueros colectadas semanalmente y se emplearon tanto el extracto soluble total como los antígenos purificados, con la finalidad de comparar especificidad y sensibilidad de los ensayos.

Los antígenos puros o el extracto soluble total fueron diluidos en amortiguador de carbonatos (0.150 gr de carbonato de sodio más 0.293 gr de bicarbonato de sodio aforado a 100 ml.) pH 9.6, a una concentración de proteínas de 10-20 μ g/ml. Los pozos de placas de polistireno (Dinotech laboratories) se cubrieron con 200 μ l de la solución anterior y se incubaron 4 hrs. a temperatura ambiente. Después de la incubación la solución con antígeno fue desechada y los pozos se cubrieron totalmente con una solución de ASB al 0.5%, tween 20 al 0.5% en AFS pH 7.2 (amortiguador diluyente), para bloquear los sitios donde no se adhirió el antígeno. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y los pozos se lavaron tres veces con tween

20 al 0.5% en AFS (amortiguador de lavados). Posteriormente estos fueron llenados con las diluciones seriadas de los sueros en el amortiguador diluyente y se incubaron 1 hora a 37°C. Después de la incubación la solución se desechó y los pozos se lavaron tres veces con el amortiguador de lavados. Enseguida se agregaron 100 μ l de una dilución 1:800 o 1:2000 del conjugado Ig de cabra anti Ig de ratón-peroxidasa. Las placas se incubaron 3 hrs. a temperatura ambiente. La solución se desechó y los pozos se lavaron tres veces con el amortiguador de lavados, y se llenaron con 200 μ l de la solución de sustrato preparada al momento de usarse. Dicha solución consistió de 10 ml de amortiguador citrato fosfato (29.3 ml de ácido cítrico 0.1 M más 25.7 ml de fosfato de sodio heptahidratado 0.2 M aforado a 100 ml) pH 4.5 , 4 mg de O-fenilendiamina y 4 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%.

b).- Ensayo de ELISA modificado: En esta técnica se aprovechó la gran interacción entre la avidina y la biotina (47), en combinación con el AcM NIM-M1, para la detección de antígeno circulante en el suero de ratones infectados.

Las placas de microtitulación fueron cubiertas con 200 μ l, por pozo, del AcM diluido en amortiguador de carbonatos, a una concentración de proteína de 10 μ g/ml y estas se incubaron 4 hrs. a temperatura ambiente. Posteriormente, los sitios donde no se adhirió el AcM, se bloquearon llenando completamente los pozos con el amortiguador de lavados. Las muestras de suero, a las diluciones requeridas en el amortiguador diluyente, fueron agregadas en alícuotas de 50 μ l por pozo y las placas se

incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente los pozos se lavaron tres veces con el amortiguador de lavados y se les adicionaron 100 μ l de biotina-AcM, diluido a 2 μ g/ml en amortiguador diluyente. Las placas se incubaron 3 hrs. a temperatura ambiente y los pozos se lavaron nuevamente. Posteriormente se agregó el conjugado avidina-peroxidasa diluido 1:4000 en el amortiguador diluyente, 100 μ l por pozo. Después de incubar 3 hrs. a temperatura ambiente se hicieron los tres últimos lavados y se adicionaron a cada pozo 200 μ l de la solución de sustrato.

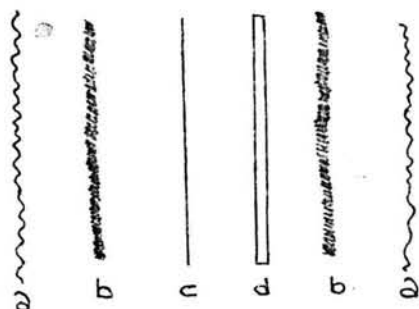
Los resultados de los ensayos de ELISA fueron obtenidos por lecturas de absorbancia a 492 nm (D.O. para ensayos en donde se emplea peroxidasa) 20 minutos después de adicionar el sustrato, empleando para ello un lector de ELISA (Dynatech laboratories). La densidad óptica de los sueros del mismo día se promedió y se graficó contra el tiempo.

p).- Inmunolectrotransferencia: Por medio de esta técnica se obtuvo el patrón antigénico de reconocimiento por anticuerpos presentes en el suero de animales infectados. Para ello, se llevó a cabo la electroforesis del extracto soluble total de la L.I. en geles de poliacrilamida al 10% como se describió anteriormente. La única diferencia consistió en que se hicieron solamente dos carriles; uno que abarcaba casi todo el ancho del gel y uno más angosto. En el primero se colocó 1 μ g del extracto soluble total y en el segundo los marcadores de peso molecular.

Una vez que la electroforesis terminó se cortaron dos tiras del gel, una del carril de los marcadores y otra del carril del

antígeno, con el objeto de teñir la proteínas y verificar la presencia de las bandas. Por otro lado, para llevar a cabo la inmunoelectrotransferencia el gel fué colocado en el amortiguador de transferencia (12.11 gr de tris-base, 57.68 gr de glicina y 800 ml de metanol, aforado a 4 l) y se equilibró durante 30 minutos, con un cambio de la solución a los 15 minutos.

La transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad) se colocaron como se muestra en el diagrama, empleando papel filtro del número tres y fibra scotch brite.



- a) Fibra scotch brite
- b) Papel filtro, Watman No 3
- c) Papel de nitrocelulosa
- d) Gel

Con el objeto de verificar la transferencia de proteínas, se cortaron cuatro tiras del papel de nitrocelulosa, dos tiras de la región de los marcadores de peso molecular y dos tiras de la región del antígeno. Estas se tiñeron por dos diferentes métodos: negro de amida y tinta india (ver al final de la descripción del método), determinandose así la presencia de bandas. El resto del papel se cubrió con una solución de ASE al 3% en AFS pH 7.2, durante 6 hrs. a temperatura ambiente, con el propósito de bloquear los sitios del papel que no contenían proteína. Después de realizar el bloqueo, el papel se cortó en tiras de 4 mm y estas se almacenaron a 4°C para su uso posterior. Para llevar a cabo la determinación de la reactividad de Ac, las tiras de nitrocelulosa se incubaron 3 hrs. a temperatura ambiente con 1 ml

de los sueros obtenidos de animales infectados, diluidos 1:100 en una solución de ASE al 3% en AFS. La incubación se realizó en tubos de tapón de rosca de 10 ml con agitación constante, mediante un agitador de balanceo (Bellco Glass). Las tiras se lavaron tres veces con tween 20 al 0.05% en AFS, dejando 15 minutos entre lavado y lavado. Al término de los lavados las tiras se incubaron 3 hrs. a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo, Ig de cabra anti Ig de ratón-peroxidasa, diluido 1:2000 en AFS. Después de la incubación las tiras se lavaron nuevamente y se les agregó 1 ml de la solución de sustrato (30 ml de AFS, 6 ml 2-4-cloronaftol diluido a una concentración de 3 mg/ml en metanol y 12 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. La solución sustrato se dejó hasta que las bandas se hicieron visibles y la reacción se paró lavando las tiras con agua.

Procedimientos de tinción para la verificación de la transferencia. Tinción con negro de amido: Las tiras se tificaron con negro de amido al 0.1% (disuelto en una solución de metanol 5%/ácido acético 10%) durante 5 minutos. Posteriormente se destificaron con una solución de metanol 5%/ácido acético 10% hasta que las bandas se hicieron notorias. Tinción con tinta india: Las tiras se lavaron con 100 ml de tween 20 al 0.05% en AFS durante 20 minutos, haciendo un cambio de solución a los 10 minutos. Al término del lavado se agregaron 100 μ l de tinta india en la solución y las tiras se dejaron así hasta que las bandas fueron evidentes.

ENSAYOS DE PROTECCION in vivo

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los antígenos

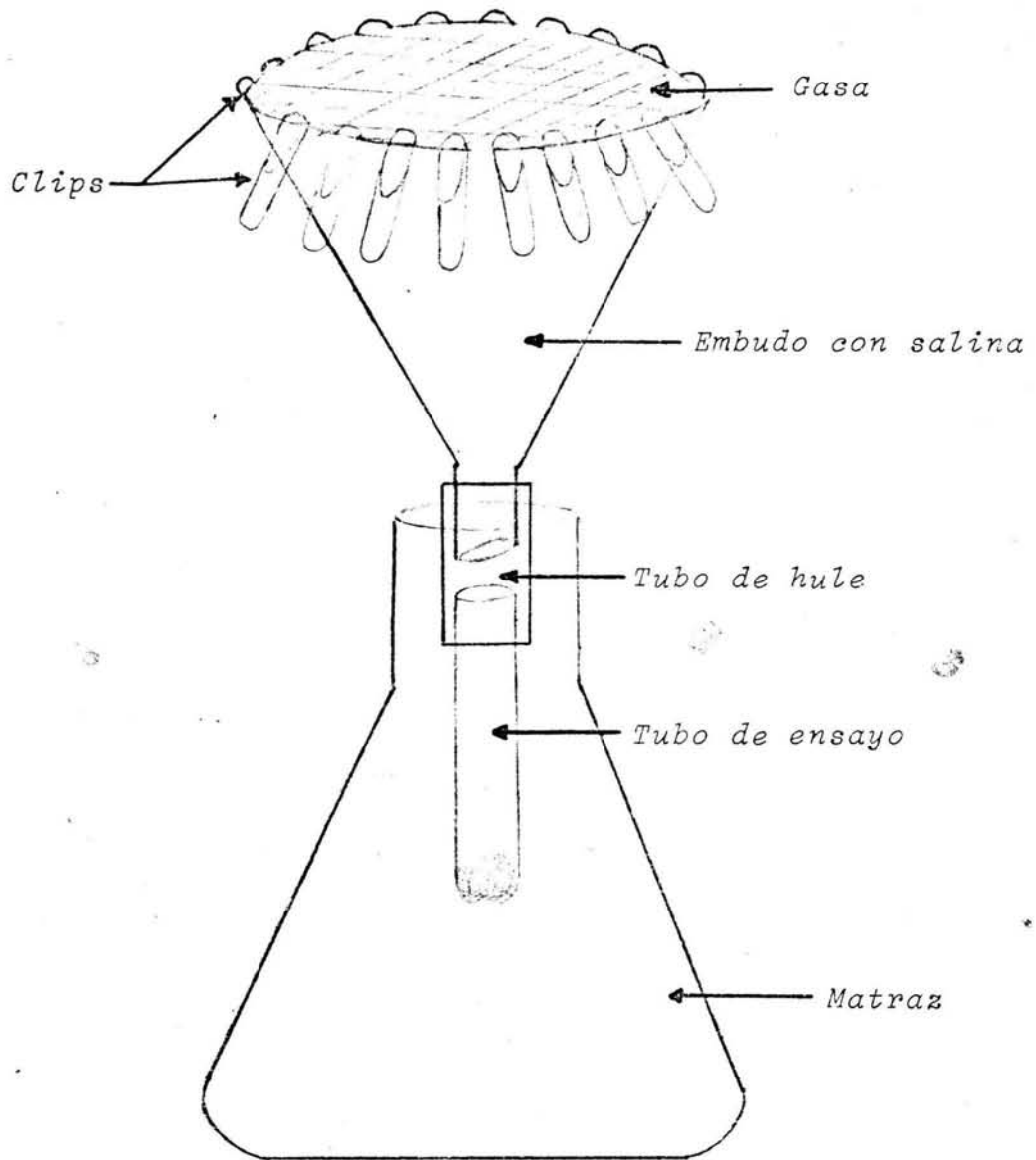
purificados para inducir una respuesta inmune protectora, grupos de 5 ratones hembras normales fueron inoculados intraperitonealmente con diferentes cantidades de antígeno de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo de ratones	Cantidad total de antígeno administrada por ratón (μg)	Dosis semanal de antígeno (μg)
1	50	16.6
2	100	33.3
3	150	50

El antígeno purificado fue emulsificado en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (49) y se administró a los ratones semanalmente, por tres semanas, de acuerdo al esquema descrito. Los grupos control solo recibieron el diluyente (tris-HCl 0.02 M pH 8.3) a intervalos similares. A la cuarta semana todos los ratones de los grupos experimentales y controles se desafiaron con 200 L.I. por vía intragastrica. Después de 30 días se determinó el número de L.I. por ratón y se comparó el número de parásitos en ambos grupos. Para observar la significancia de los resultados se llevó a cabo la prueba de T student.

La determinación del número de L.I. de cada ratón se realizó de la siguiente manera. El músculo esquelético de cada ratón se sometió a digestión con 200 ml de pepsina-HCl al 1% en matraces Erlenmeyer y estos se incubaron a 37°C por 3 hrs. Después de la incubación se tomaron de cada matraz 5 alícuotas de 10 ml y se colocaron en tubos falcons de 15 ml. Las alícuotas se centrifugaron a 1500 rpm 3 minutos en una centrífuga clínica. El

sobrenadante fué eliminado y la pastilla se resuspendió en 10 ml de AFS. De cada tubo falcon se tomaron 5 muestras de 50 μ l y se contó el número de parásitos por muestra. El promedio de las 5 muestras se tomó en cuenta para obtener el número de L.I. en los 200 ml. Este último dato se tomó en cuenta como el número de L.I. por ratón. Una vez obtenidos estos valores, se procedió a determinar el número de L.I. por grupo. Por otro lado, se evaluó si los mismos antígenos purificados eran capaces de acelerar la expulsión de los parásitos adultos del intestino de ratones infectados. Para ello, un grupo de 5 ratones se inculó con 100 μ g del antígeno puro siguiendo el esquema anterior, con la excepción de que los animales fueron sacrificados al día 10 post-infección. Con la finalidad de determinar el número de parásitos adultos, se extrajeron los intestinos delgados de cada ratón, los cuales se colocaron en un aparato de Baerman (27) (ver diagrama) y se incubaron 3 hrs. a 37°C con una solución salina (0.85% NaCl). Posteriormente los parásitos se colectaron del fondo del tubo de ensayo y se contaron en un microscopio invertido (Olympus, Tokyo). Así mismo, se obtuvo un promedio del número de parásitos adultos por ratón y se comparó, empleando la prueba de T' student, con el número de parásitos adultos por ratón del grupo control.



APARATO DE BAERMAN

IV. RESULTADOS

1. Purificación de antígenos de superficie de la larva infectiva de T. spiralis.

La purificación de antígenos de superficie de la larva infectiva se llevó a cabo por cromatografía de afinidad empleando el AcM NIM-M1 (18) acoplado a sefarosa-4B. Una vez que se obtuvieron dichos antígenos, estos se analizaron por electroforesis en presencia de SDS. Determinada la pureza de las fracciones antigénicas obtenidas, se procedió a realizar ensayos con la finalidad de desarrollar métodos de diagnóstico para triquinosis, empleando muestras obtenidas de ratones y de cerdos que fueron infectados experimentalmente con T. spiralis. Por otro lado los antígenos purificados se utilizaron para realizar ensayos con la finalidad de determinar su papel en la inducción de mecanismos de protección en la infección producida experimentalmente con T. spiralis.

1.1. Purificación de AcM NIM-M1 por precipitación con ácido bórico.

La purificación de AcM se realizó por el método de precipitación con ácido bórico debido a que NIM-M1 es de la clase IgM. Este método permite una recuperación más eficiente de este isotipo de anticuerpo en comparación con la precipitación con sulfato de amonio (43).

A partir de 90 ml de líquido ascítico previamente obtenido

de ratones inoculados con la clona híbrida productora del NIM-M1 se obtuvieron 87.8 mg de proteína. La pureza del AcM se muestra en el carril 13 de la figura 2. En esta se observan las dos bandas (cadena ligera y pesada) con una Mr de 18 y 80 Kd. En ocasiones se detectaron algunas otras bandas adicionales (ver fig. 2) lo cual puede deberse a productos de la degradación de NIM-M1 o a contaminantes del líquido ascítico.

1.2. Conjugación de NIM-M1 a sefarosa 4B.

La conjugación del NIM-M1 a sefarosa 4b se hizo por el método de activación con bromuro de cianógeno, el cual reacciona con los grupos hidroxilo de la sefarosa, convirtiéndolos principalmente a grupos imidocarbonato. Estos grupos son capaces de unirse covalentemente a las proteínas.

El empleo de dicho método de activación dio un rendimiento de conjugación del NIM-M1 a sefarosa 4B de 73.28%. El rendimiento se calculó cuantificando por la técnica de Lowry (40) la cantidad de NIM-M1 (100 mg) que se puso a conjugarse con la sefarosa y la cantidad de proteína que quedó en el sobrenadante después de la conjugación. Por consiguiente, de los 100 mg de proteína que se aplicaron inicialmente, 73.28 mg se adhirieron a la sefarosa, obteniéndose una relación de 7.33 mg de NIM-M1 por ml de resina.

1.3. Purificación de antígenos de la larva infectiva de T. spiralis empleando cromatografía de afinidad.

Los antígenos de superficie de la L.I. se aislaron por medio de columnas de sefarosa 4E-NIM-M1, aplicando de 20-24 mg del extracto soluble total a la columna. La elución se realizó con amortiguadores de diferente pH (ver método de purificación de antígenos solubles por cromatografía de afinidad).

Primeramente se lavó la columna con el amortiguador de columna, para extraer todas las proteínas que no se adhirieron al AcM, en la fig. 1 se muestran los tres picos obtenidos en este paso (fracciones 1, 2 y 3). Posteriormente se eluyeron los antígenos específicos para NIM-M1 empleando dos amortiguadores. La elución con el amortiguador pre-strip (pH 9.3) proporcionó dos fracciones minoritarias (fracciones 4 y 5). Cuando se aplicó el amortiguador alk-strip (pH 11.5) se eluyó una fracción mayoritaria (fracción 7) y otras fracciones menores (fracciones 6-10).

La saturación de una columna de sefarosa 4E-NIM-M1 de 5 ml se alcanzó con 20 mg de extracto soluble total. La saturación se corroboró mediante las líneas 3 y 4 de la fig. 2. Estas representan a las fracciones 1 y 2 no adherentes (fig. 1) obtenidas con el amortiguador de columna, las cuales presentaron entre sus componentes a los cuatro antígenos reconocidos por el AcM NIM-M1, pero que ya no se adhirieron a la columna. Otra evidencia, es el hecho de que aún cuando se aplicaron más de 20 mg del extracto soluble total a la columna, la cantidad de antígenos que se recuperaba fue constante. El rendimiento en el

proceso de purificación se determinó por la cuantificación de proteína eluída, obteniéndose un porcentaje del 10%. Esto correspondió a 2 mg de antígenos purificados (fracciones 6, 7 y 8 (fig 1, líneas 10, 11 y 12 fig 2).

1.4. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad.

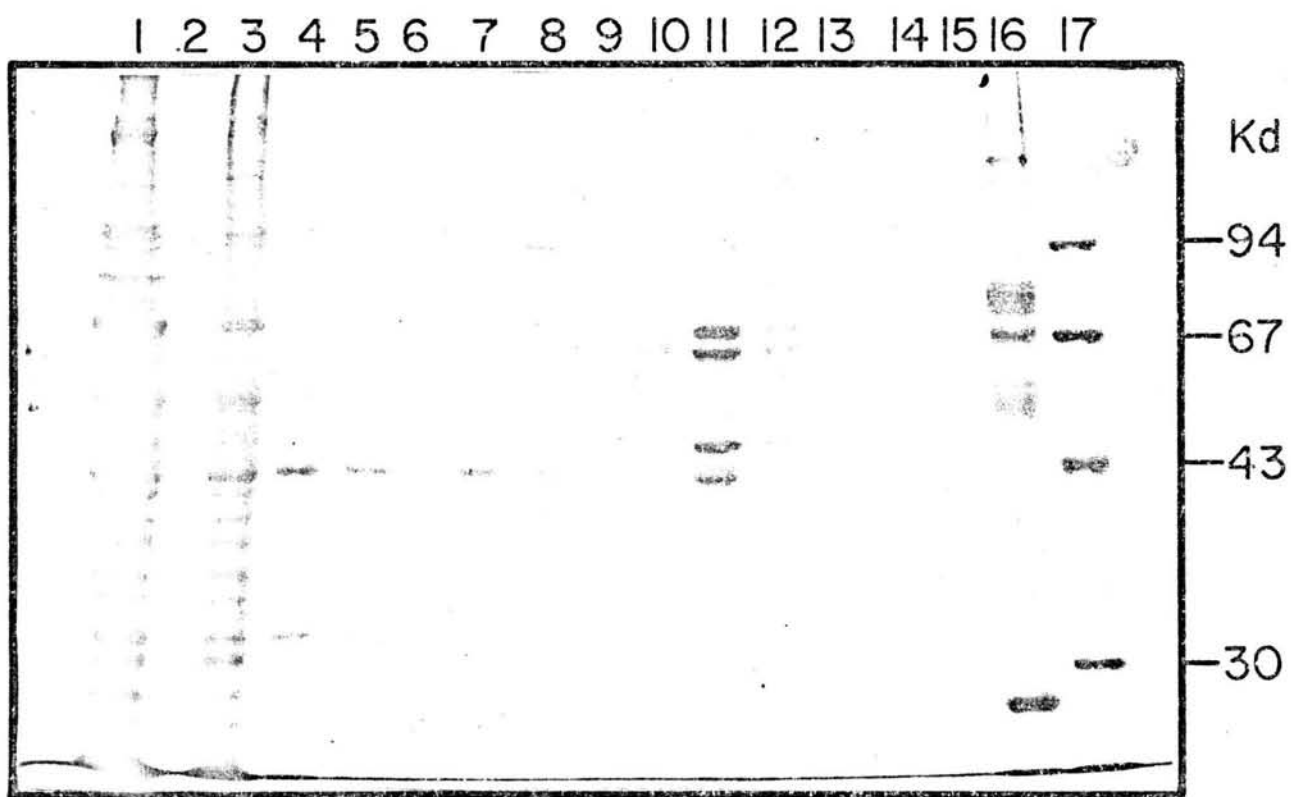
Para determinar el número de componentes proteícos obtenidos en cada fracción, alícuotas de todas las fracciones fueron sometidas a electroforesis en gels de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (fig 2). En la línea 1 se puede ver la complejidad del extracto soluble total, representada por aproximadamente 36 bandas de proteínas. La fracción extraída con el amortiguador de columna (línea 3), presentó un patrón de bandas similar al extracto soluble total, mientras que las fracciones 2 y 3 (líneas 4 y 5), extraídas con el mismo amortiguador presentaron un número reducido de bandas. En las líneas 7 y 8 (fracciones 4 y 5 respectivamente, eluídas con el amortiguador pre-strip) solamente se evidenció una banda minoritaria, siendo su Mr de 47 Kd. Las fracciones 6, 7 y 8 (líneas 10, 11 y 12 respectivamente), eluídas con el amortiguador alk-strip, contenían los cuatro antígenos específicos para el AcM NIM-M1, coincidiendo estos con los reportados anteriormente por Ortega et al (18). La Mr de los antígenos fue de 72, 65, 53 y 45 Kd. En la fracción 7 se observó,

Fig. 1. Cromatografía de afinidad en seferosa 4B-NIM-M1 del extracto soluble total de L.I. Perfil de elución obtenido con amortiguadores de diferente pH.

Falta página

N° 36

Fig. 2. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gels de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. La tinción de las bandas proteínicas se realizó con azul brillante de coomassie R-250. Línea 1 : extracto soluble total de L.I.; Líneas 3-5; fracciones 1, 2 y 3 respectivamente, extraídas con amortiguador de columna; Líneas 7 y 8: fracciones 5 y 6 respectivamente, eluidas con amortiguador pre-strip pH 7.3; Líneas 10-14: fracciones 4, 7, 8, 9 y 10 respectivamente, eluidas con amortiguador alk-strip pH 11.5



en algunas ocasiones, una banda minoritaria adicional, producida tal vez a causa de un reconocimiento inespecífico por parte del AcM. A pesar de la eficiencia de este método, el empleo de condiciones básicas para la elución de los antígenos específicos, provocó en ocasiones la elución de pequeñas cantidades del AcM conjugado (líneas 11, 12, 12, y 13; fracciones 7, 8, 9 y 10 respectivamente).

2. Determinación de la especificidad de los antígenos purificados.

La reactividad de los antígenos purificados se determinó mediante los ensayos de competencia por IFI empleando parásitos vivos y el AcM NIM-M1 (ver material y métodos, sección de los ensayos de competencia). Los resultados se resumen en la tabla I. Se observa que no se detectó una reacción fluorescente en las muestras de parásitos que fueron incubadas con las fracciones 1, 2, 6, 7, 8, las cuales presentaban los cuatro antígenos específicos para el AcM (fig. 2), mostrando así la alta especificidad de los antígenos de estas fracciones. Los ensayos realizados con las fracciones 4 y 5, eluidas con el amortiguador pre-strip, si presentaron una tinción fluorescente sobre la superficie de las L.I. vivas, indicando que no hubo consumo del AcM en la primera fase de incubación. La funcionalidad del método se corroboró por medio de los controles positivo (AcM NIM-M1) y negativo (AFS-ASB al 0.1%), presentando únicamente fluorescencia las larvas incubadas con el primero.

Tabla I. Determinación de la especificidad de los antígenos purificados de L.I., utilizando ensayos de competencia por Inmunofluorescencia indirecta.

Fracción ^a	Presencia de antígenos específicos para NIM-M1	Tinción de la superficie de las L.I. ^b
1	si	- - +
2	si	- - +
3	no	- + +
4	no	+ + +
5	no	+ + +
6	si	- - +
7	si	- - +
8	si	- - +
NIM-M1 ^c	—	+ + +
AFS-ASB	—	- - -

- a. Fracciones 1-3: obtenidas con amortiguador de columna pH 8.3.
 Fracciones 4 y 5: eluidas con amortiguador pre-strip pH 9.3.
 Fracciones 6-8: eluidas con amortiguador al-strip pH 11.5.
- b. El grado de fluorescencia se evaluó observando el número de L.I. que presentaban fluorescencia en la superficie y la intensidad de esta. (-) Ausencia de fluorescencia, (+) presencia de fluorescencia.
- c. Control positivo (NIM-M1) y negativo (AFS-ASB)

3. Empleo de antígenos purificados en el diagnóstico de triquinosis experimental.

Con el objeto de evaluar el uso de los antígenos purificados en el diagnóstico de triquinosis, se eligió la técnica de ELISA estandar debido a la sensibilidad del ensayo, así como a la posibilidad de su uso en pruebas de campo. En estos ensayos se comparó el empleo del extracto soluble total del parásito (L.F.) con el uso de antígenos purificados. Ambas muestras fueron probadas con sueros obtenidos de ratones a diferentes tiempos después de la infección.

Previo al desarrollo de los ensayos, se realizaron experimentos preliminares para determinar las diluciones a las cuales se trabajaron los sueros. En estos, los sueros de ratones infectados se emplearon por duplicado a las diluciones de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200.

La fig. 3 representa el promedio de los resultados de las pruebas seriadas de detección de anticuerpos, obtenidos en sueros individuales de cinco ratones infectados con T. spiralis y en sueros de cinco ratones normales a una dilución 1:400. Esta dilución fue representativa de los resultados obtenidos con las demás diluciones. a partir del día 7 post-infección se detectaron anticuerpos anti-T. spiralis en los sueros de ratones infectados, ya sea empleando el extracto soluble total o los antígenos purificados. En los dos casos las curvas de detección de anticuerpos tuvieron un comportamiento similar, siendo ascendentes hasta por el día 56, posteriormente se vio un

descenso en el título de anticuerpos. Aún así, los niveles de anticuerpos se mantuvieron altos hasta el día 77. A pesar de que los niveles detectados con el extracto soluble total fueron mas altos con respecto a los detectados por los antígenos purificados, los sueros de animales no infectados reaccionaron menos inespecíficamente con los últimos, dando valores de T.O. muy bajos.

Como es sabido, los cerdos son la principal vía de transmisión de la triquinosis en humanos. Por lo cual, es importante contar con métodos de diagnóstico aplicables en estos organismos, que sean confiables y sensibles. En ensayos preliminares se empleó el extracto soluble total del parásito (L.I.) y sueros obtenidos por punción yugular de cerdos infectados con 10,000 L.I. per os y sueros de cerdos normales. La detección de anticuerpos contra T. spiralis en estos sueros, durante el curso de la infección, se realizó por el método de ELISA estandar (ver métodos). Como se observa en la gráfica (fig 4), a los 7 días post-infección no hay diferencias en los niveles de anticuerpos en los sueros de cerdos infectados y normales. A partir del día 14, hubo un aumento considerable de los niveles de anticuerpos en los sueros de cerdos infectados. Dichos niveles disminuyeron en los nueve días subsiguientes y se incrementaron nuevamente en el día 28, llegando a su máximo aproximadamente por el día 50. A tiempos más avanzados, se observó un ligero descenso y estabilización de los títulos de anticuerpos. Las curvas obtenidas con todas las diluciones empleadas siguieron un mismo comportamiento, aunque a menor

Fig. 3. Determinación de la respuesta inmune humoral en ratones infectados con 200 L.I. de *I. spiralis*. La detección de anticuerpos en contra de antígenos de la L.I. en sueros de ratones infectados con *I. spiralis* se realizó por el ensayo de ELISA, empleando antígenos totales y antígenos purificados de L.I. Los datos incluidos representan el promedio de los valores obtenidos de 3 ratones a una dilución de suero 1:400.

---●---●--- Sueros inmunes + antígeno total
 ---●---●--- Sueros normales + antígeno total
 ---○---○--- Sueros inmunes + antígeno purificado
 ---○---○--- Sueros normales + antígeno purificado

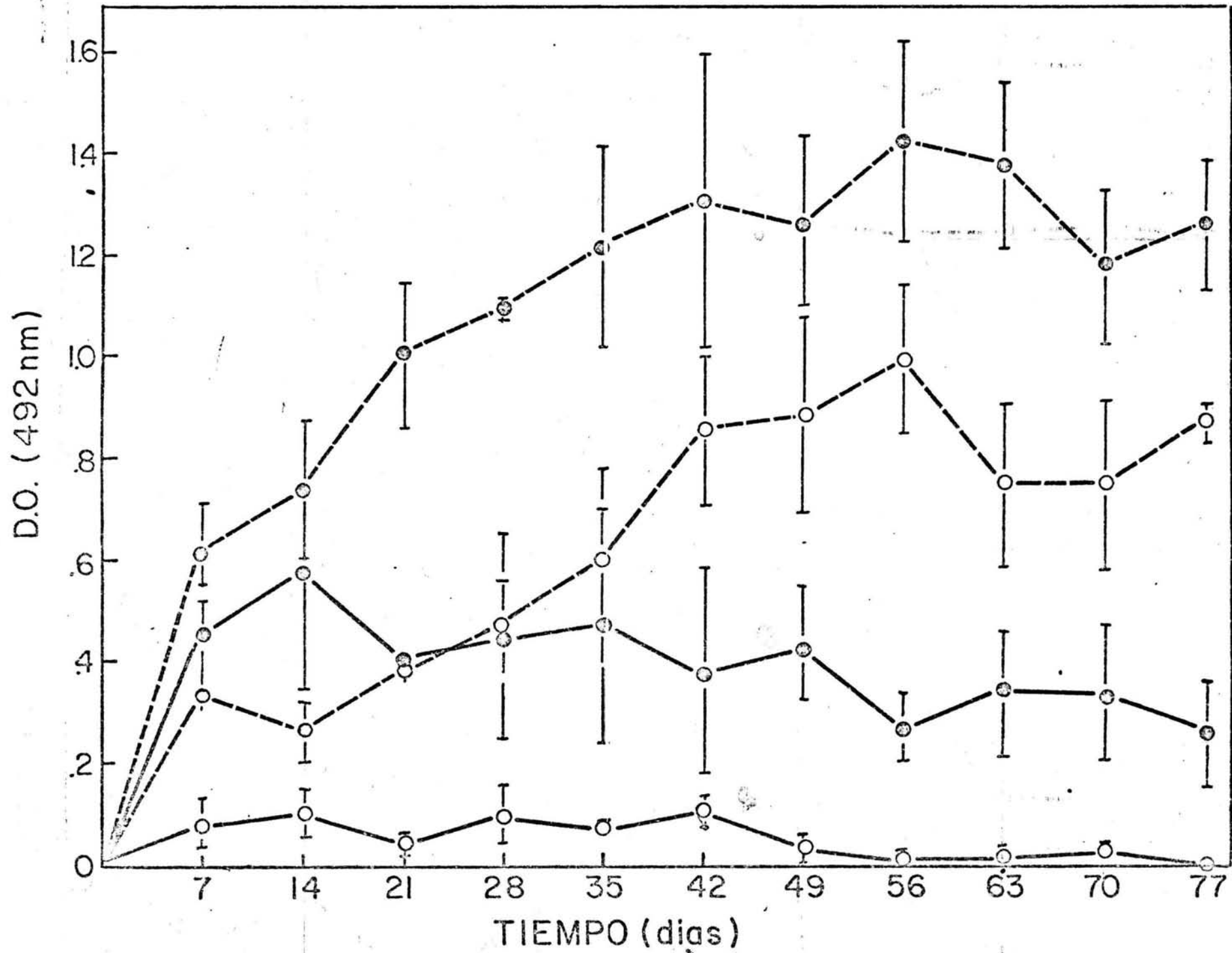
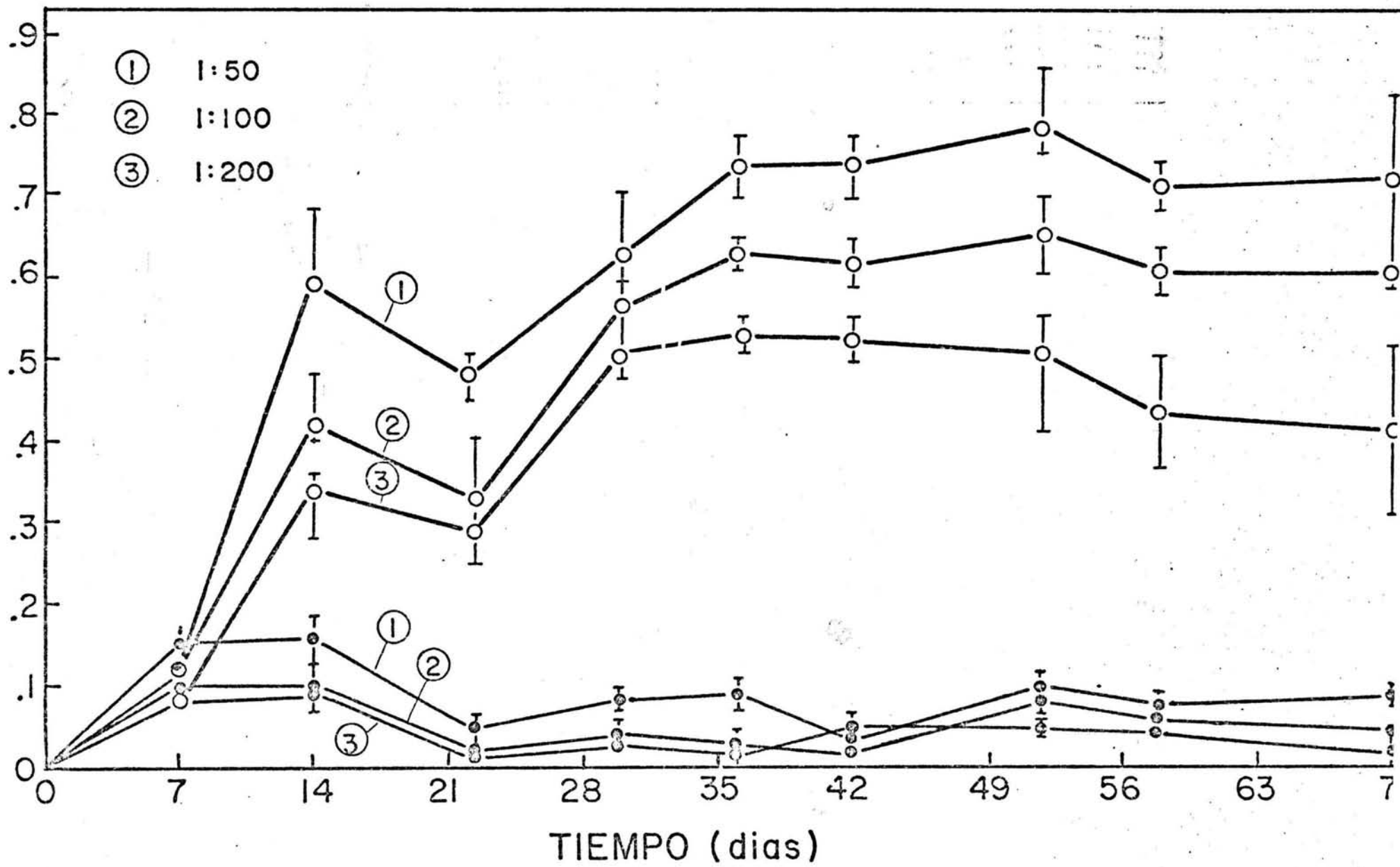


Fig. 4. Determinación de la respuesta inmune humoral en cerdos infectados con 10.000 L.I. de T. spiralis. La detección de anticuerpos en contra de antígenos de la L.I. presentes en sueros de cerdos infectados con T. spiralis se realizó mediante el ensayo de ELISA, empleando antígenos totales. Los datos incluidos representan el promedio de los valores obtenidos en sueros de 3 ratones empleando diferentes diluciones de suero (1, 2 y 3).

—○—○— Sueros inmunes + antígeno total
—●—●— Sueros normales + antígeno total



dilución hubo una mayor detección de anticuerpos. Los sueros de cerdos normales dieron lecturas bajas, manteniéndose así durante todos los sangrados y siendo muy similares a todas las diluciones trabajadas.

4. Determinación de antígenos de L.I. de T. spiralis en muestras de sueros de animales infectados experimentalmente.

La detección de antígenos circulantes del parásito en el suero de los hospederos, puede proporcionar un diagnóstico altamente específico, indicando la presencia del parásito en el huésped. Con este fin, fué que se diseñaron los ensayos de ELISA modificados con el sistema avidina-biotina (ver método de ELISA modificado). En estos, la detección de antígenos circulantes se llevó a cabo por el método de "sandwich" empleando anticuerpos monoclonales. En la segunda reacción, el AcM NIM-M1 llevaba acoplada la biotina, con el objeto de que se uniera al complejo avidina-peroxidasa. Debido a que la avidina presenta una afinidad extremadamente alta por la biotina, se amplifica la reacción antígeno anticuerpo. Los resultados se ilustran en las figuras 6 y 7, las cuales representan las gráficas de detección de antígenos circulantes obtenidas en diferentes grupos experimentales. En los dos grupos se encontró que los niveles de antígenos circulantes en el suero de ratones infectados, presentaron un ascenso en el día 7 y 28, correlacionándose con la maduración de las L.I. a parásitos adultos y con el enquistamiento de las L.I. en el músculo esquelético respectivamente. Sin embargo, en la fig. 7 se observa que después

Fig. 5. Detección de antígeno circulante de L.I.³ en sueros de ratones infectados con 200 L.I. de T. spiralis. La determinación de antígeno en muestras de sueros de ratones infectados con el parásito se realizó mediante el ensayo de ELISA modificado, empleando el sistema avidina-biotina y AcM. Los datos graficados representan el promedio de los valores obtenidos en 5 ratones a una dilución de suero 1:25.

—o—o—o— Sueros inmunes

Todos los sueros del grupo control dieron lecturas de 0.

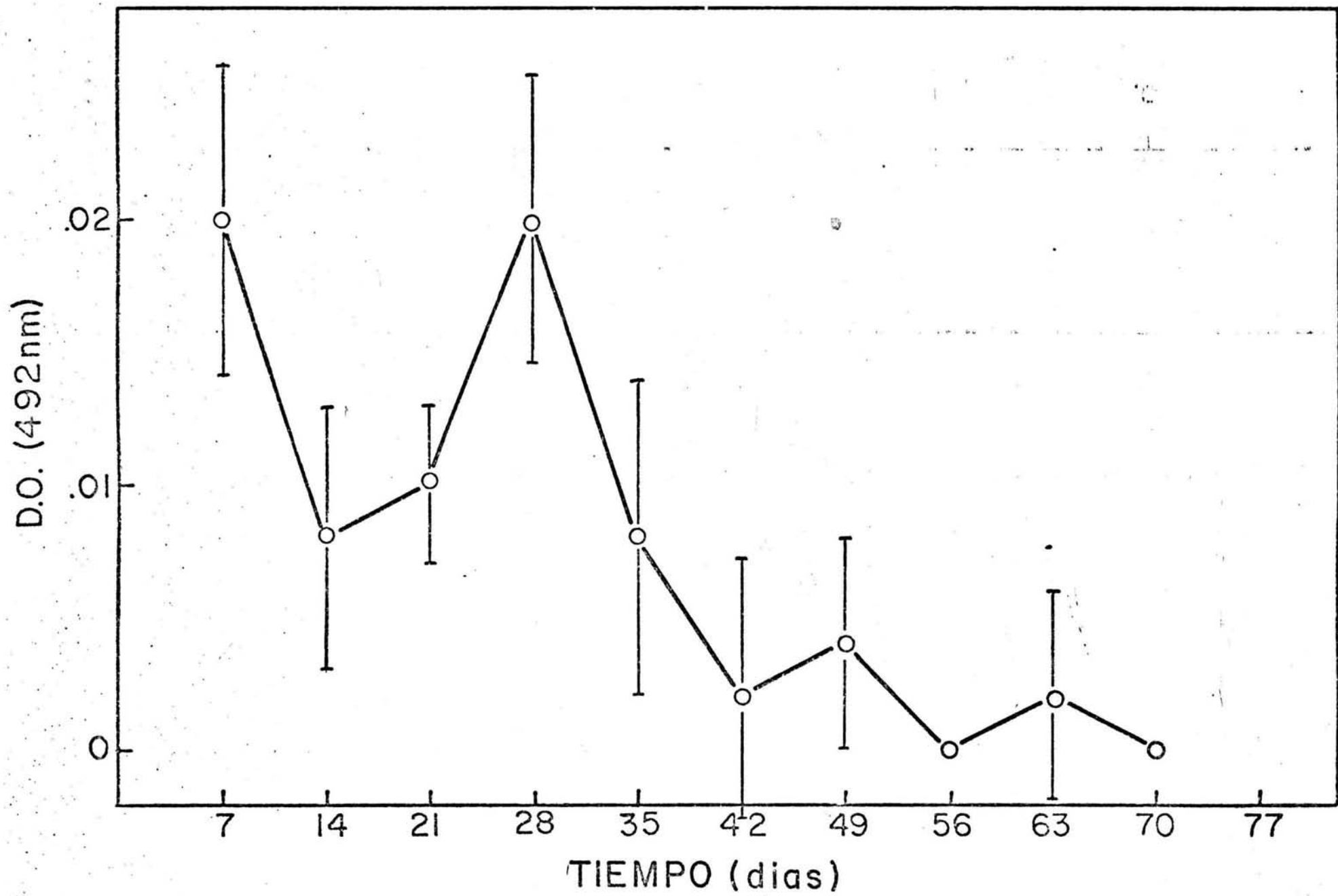
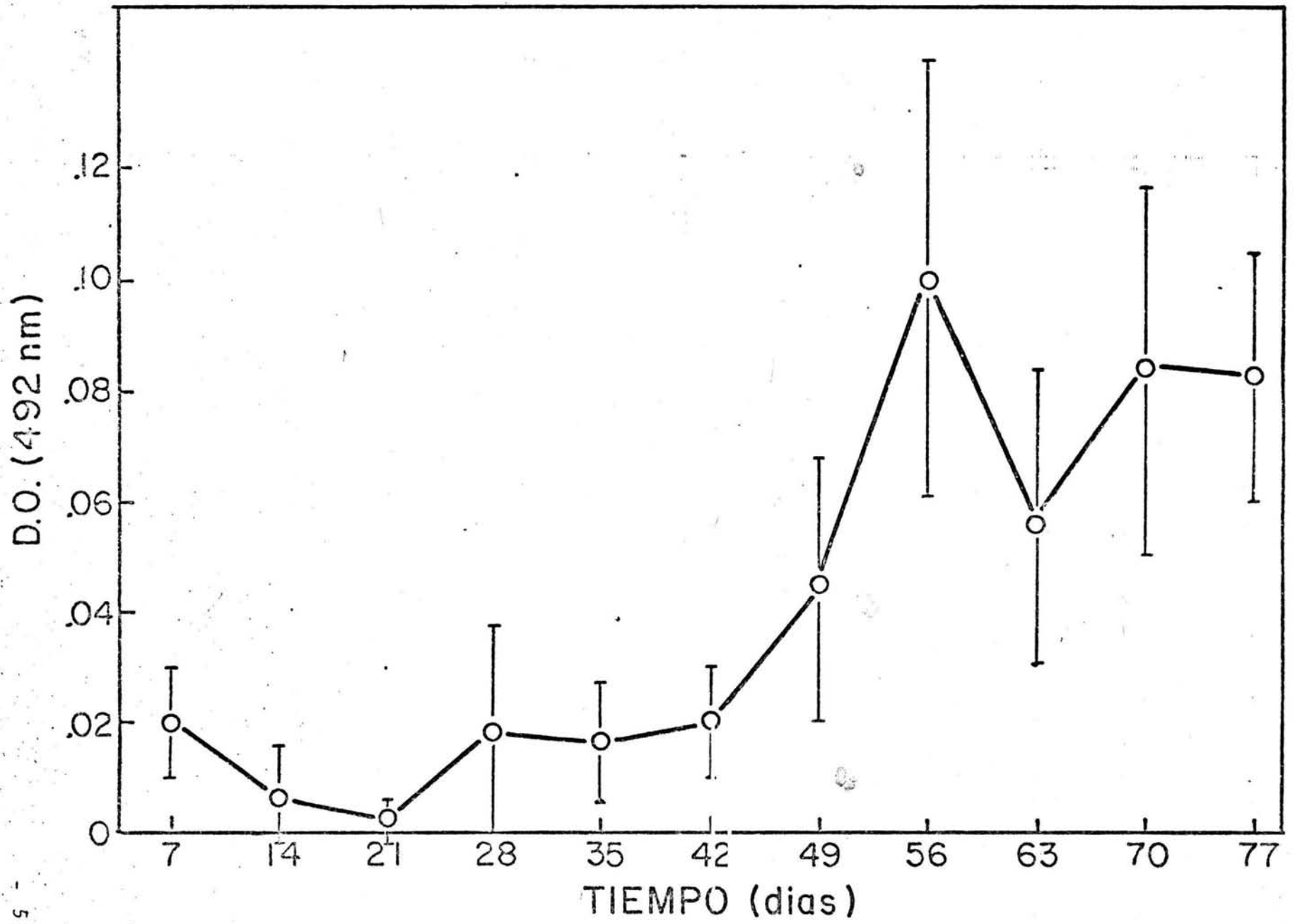


Fig. 6. Detección de antígeno circulante de la LPI. en sueros de ratones infectados con 200 L.I. de T. spiralis. La determinación de antígenos en muestras de sueros de ratones infectados con el parásito se realizó mediante el ensayo de ELISA modificado, empleando el sistema avidina-biotina y AcM. Los datos mostrados corresponden al promedio de un grupo experimental de 5 ratones, diferente al de la figura 5 y a una dilución de suero 1:10.

—o—o—o— Sueros inmunes

Todos los sueros del grupo control dieron lecturas de 0.



del día 28, los niveles de antígeno circulante en lugar de disminuir, como sucedió con el grupo experimental representado por la fig. 6, sufrieron un aumento considerable, llegando a su máximo nivel en el día 56. En los días posteriores se manifestó un descenso, pero aún así los niveles de detección permanecieron altos. A pesar de esto, es evidente que las lecturas obtenidas en ambos grupos experimentales no fueron muy elevadas, ya que nunca se obtuvieron valores de D.O. mayores de 0.1.

Los sueros de ratones normales no reaccionaron en ningún caso.

5. Cinética de reconocimiento antigénico de T. spiralis por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados

La elucidación de la secuencia de reconocimiento de los antígenos parasitarios en una infección primaria, ayuda a establecer que componentes moleculares del parásito pueden tener un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune.

Con el objeto de determinar la cinética de reconocimiento de antígenos de la L.I. de T. spiralis, se empleó el método de inmunoelectrotransferencia (ver método de inmunoelectrotransferencia) con sueros de animales infectados, los cuales fueron obtenidos a diferentes tiempos después de la infección con T. spiralis. Los resultados se resumen en la fig 4. Inicialmente (día 7 o 14) se reconoció un solo antígeno, con una Mr de 47 Kd. Posteriormente (días 21 y 28) se detectaron antígenos con una Mr de 47 y 34 Kd. En el día 35 se incluyeron en

Fig. 37. Cinética de reconocimiento diferencial de antígenos de L.I. por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados con T. spiralis. Los antígenos totales de L.I. fueron separados por electroforesis y transferidos a papel de nitrocelulosa. Tiras de este fueron incubadas con sueros de animales infectados y colectados a diferentes tiempos después de la infección con el parásito. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló por la adición de una dilución apropiada (1:2000) del conjugado Ig de cabra anti-Ig de ratón acoplado a peroxidasa.

Diag 7

14

21

28

35

42

49

56

63

70

77

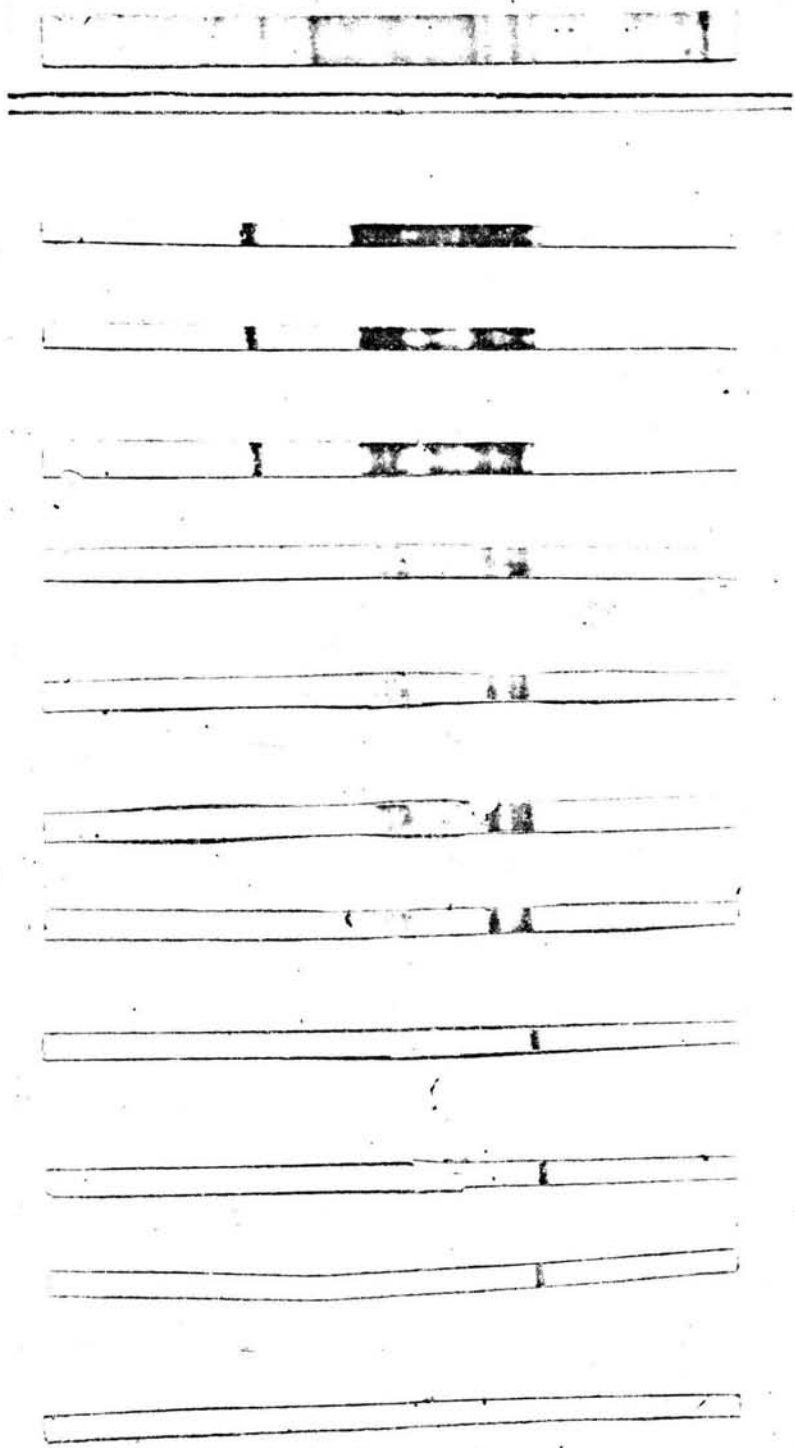
P.M.
(K.d)

94-

67-

43-

30-



el reconocimiento antigénico otros componentes que presentaron una Mr de 72 y 65 Kd. A partir del día 42 en adelante, se reconocieron también otras proteínas de Mr 57, 60 y 98 Kd.

Es importante destacar, que los primeros cuatro antígenos que fueron detectados por los sueros de ratones infectados (días 7-35) tuvieron una Mr correspondiente a la Mr de los cuatro antígenos purificados por el AcM NIM-M1. Además, cuando se probaron sueros de los mismos ratones, obtenidos a los 6 meses post-infección, únicamente fueron reconocidos los cuatro antígenos ya mencionados.

6. Empleo de antígenos purificados en la inducción de protección en contra de la infección por I. spiralis.

Uno de los aspectos relevantes en la enfermedad producida por I. spiralis es la identificación de antígenos del parásito que sean capaces de inducir respuestas inmunes protectoras en el hospedero. La purificación de estos antígenos se ha logrado en algunos casos mediante el empleo de AcM. Estos antígenos ya purificados se puedan emplear en el desarrollo de métodos inmunoprolécticos. En este trabajo los antígenos aislados mediante cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales fueron probados en modelos experimentales, para evaluar su capacidad en inducir protección. Para ello, ratones Balb/c fueron inmunizados con diferentes dosis de antígenos purificados (50, 100 y 150 μ g) y posteriormente se evaluó el nivel de protección conferido por estos antígenos a los 30 días después de la

infección de los ratones con I. spiralis. Esto se realizó mediante la cuantificación de L.I. que se establecieron en el tejido muscular de animales inmunes. Los valores obtenidos de los grupos experimentales se compararon con aquellos determinados en animales del grupo control (Tabla II). En los experimentos realizados se observó que la única dosis que indujo una respuesta protectora significativa fue la de 100 μ g, produciendo niveles de reducción del número de L.I. en músculo del 50 al 70%. Mientras que a la dosis de 150 y 50 μ g los resultados no fueron significativos.

La posibilidad de que la reducción del número de L.I. que se establecen en tejido muscular de los animales inmunizados, se deba a una expulsión temprana de los parásitos adultos, se analizó mediante la inmunización de ratones con antígenos purificados. En estos experimentos se eligió la dosis de antígeno (100 μ g/ratón) que indujo una reducción significativa en el número de L.I. en los animales experimentales (Tabla II). La determinación del número de parásitos adultos en el intestino de animales inmunes, se comparó con aquel obtenido de animales del grupo control. En la tabla III se muestran los resultados que se obtuvieron tanto de ratones inmunes como de animales control, ambos desafiados con L.I. y sacrificados a los 10 días postinfección. En estos experimentos se determinó que en los animales que recibieron una dosis de 100 μ g de antígenos antes de la infección con I. spiralis, se presentó una disminución considerable (82%) en el número de parásitos adultos recuperados con respecto a los controles.

TABLA II

EFECTO DE LOS ANTIGENOS PURIFICADOS SOBRE LA INFECTIVIDAD DE LA LARVA INFECTIVA (L₃) DE T. SPIRALIS

EXPERIMENTO	INMUNIZACION	NO. DE LARVAS MUSCULARES (L ₃) (MEDIA+SD)	SIGNIFICANCIA ^c	REDUCCION DE * LA INFECTIVIDAD (%)
1	50 µg	a 25312 + 12091	-	-
		b 23904 + 9131	NS	5
2	100 µg	a 57126 + 26341	-	-
		b 14400 + 5361	P < 0.025	74
3	100 µg	a 30456 + 5827	-	-
		b 14560 + 3252	P < 0.005	52
4	150 µg	a 21600 + 4449	-	-
		b 13920 + 7250	NS	36

* % de reducción de la infectividad =
$$\frac{\text{grupo control } L_3 - \text{grupo experimental } L_3}{\text{grupo control}} \times 100$$

a Grupo control (5 ratones inmunizados tres veces a intervalos semanales con adyuvante completo de Freund únicamente).

b Grupo experimental (5 ratones inmunizados tres veces a intervalos semanales con antígeno purificado + adyuvante completo de Freund).

c Los valores de P fueron calculados utilizando la prueba de t'Student. Valores menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

NS No significativo.

TABLA III

EFECTO DE LOS ANTIGENOS PURIFICADOS DE LA LARVA INFECTIVA (L₃) DE T. SPIRALIS SOBRE LA EXPULSION DE PARASITOS ADULTOS

INMUNIZACION	NO. DE PARASITOS ADULTOS (MEDIA+SD)	SIGNIFICANCIA ^c	REDUCCION DE LA INFECTIVIDAD* (%)
100 µg	^a 12 ± 6	-	-
	^b 2 ± 1	P < 0.005	82

* % de reducción de la infectividad =

$$\frac{\text{parásitos adultos grupo control} - \text{parásitos adultos grupo experimental}}{\text{grupo control}} \times 100$$

^a Grupo control (5 ratones inmunizados tres veces a intervalos semanales con adyuvante completo de Freund únicamente).

^b Grupo experimental (5 ratones inmunizados tres veces a intervalos semanales con antígeno purificado + adyuvante completo de Freund).

^c Los valores de P fueron calculados utilizando la prueba de t'Student. Valores menores de 0.05 fueron considerados como significativos.

V. DISCUSION

Uno de los aspectos más relevantes en el estudio de la relación huésped-parásito, es la identificación de antígenos del parásito que participen en la inducción de respuestas inmunes claves para el huésped. En años recientes se han realizado estudios tendientes a la identificación de antígenos relevantes de T. spiralis. En particular, aquellos que son capaces de inducir protección en contra de la infección con este parásito.

En el presente trabajo se purificaron cuatro antígenos de superficie de la L.I. de T. spiralis, empleando cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. La inmunización de ratones con estos antígenos, dió como resultado una reducción del número de L.I. en músculo y una expulsión acelerada de parásitos adultos de los intestinos de animales inmunes en una infección de desafío (Tablas II y III).

La purificación de antígenos de T. spiralis se ha abordado de diferentes maneras, empleando para esto diversas técnicas bioquímicas de separación (39, 50 y 51). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se han obtenido mezclas antigénicas muy complejas o son muchos los procesos requeridos para aislar una proteína. En este estudio se emplearon AcM específicos para antígenos de superficie, los cual ofrece ventajas en cuanto a otros métodos de purificación que se han empleado. Estos anticuerpos fueron obtenidos por Ortega y col. (18) y son del isotipo IgM. El epítipo que reconoció este anticuerpo se encontró presente en cuatro proteínas con una Mr de 45, 52, 65 y

72 Kd (fig. 2), determinado esto en en condiciones reductoras. Los investigadores anteriormente mencionados, han propuesto que estas proteínas cuticulares del parásito pueden originarse de un solo gen, debido a la similitud en sus mapas peptídicos, y a que en condiciones no reductoras únicamente son detectadas dos bandas. Estas proteínas pueden sufrir un procesamiento diferencial antes de incorporarse a la cutícula, ya que solamente una de ellas presenta glucosilación (39).

El método de inmunopurificación empleado, produjo un alto rendimiento (10%) de purificación de las proteínas de superficie, comparandolo con los trabajos anteriormente mencionados, en los cuales se fraccionaron los componentes del parásito mediante bioquímicas de separación (39, 50 y 51). Dada la gran afinidad del AcM NIM-M1, las proteínas aisladas presentaron un alto grado de pureza y especificidad, como se demostró por los estudios electroforéticos (fig. 2) y de competencia por inmunofluorescencia (Tabla I). Otros investigadores han aislado antígenos del esticosoma y de productos de excreción-secreción de la L.I., siguiendo una estrategia similar a la empleada en este estudio, reportando resultados semejantes a los aquí descritos (52 y 53).

En los experimentos de inmunopurificación se obtuvieron 2 mg de antígenos purificados a partir de 20 mg del extracto soluble total. Este alto rendimiento puede deberse a que el AcM no solo reconoce antígenos de superficie sino que también presenta reactividad con el esticosoma (53). Ya que este último es un constituyente mayoritario de la L.I. y los componentes

antigénicos que lo constituyen se encontrarían en alta proporción en el extracto soluble.

Estudios recientes han sugerido que la cutícula de T. spiralis es una estructura importante en la interacción entre el huésped y el parásito. Mackenzie y col. (54), reportaron características importantes de la cutícula de los diferentes estadios de T. spiralis. En el caso del adulto y la L.I. los componentes de la superficie son capaces de activar el complemento, lo cual no ocurre con las L.R.N.. Así mismo, se encontró que cada estadio del ciclo de vida del parásito estimula la producción de anticuerpos específicos para la superficie del mismo estadio. Estudios in vitro realizados por los mismos autores, demostraron que en presencia de estos anticuerpos células de una reacción inflamatoria, especialmente eosinófilos, son capaces de unirse al parásito y causarle la muerte. Estos estudios fueron extendidos por Ortega y col (35), los cuales demuestran que un anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos de superficie de la L.R.N. fue capaz de mediar la adherencia de eosinófilos a las mismas. Ocasionando la muerte y destrucción de los parásitos. Trabajos posteriores efectuados por una serie de investigadores (16, 17 y 18) demuestran que la cutícula de T. spiralis es una estructura que expresa moléculas proteínicas que cambian cualitativamente entre los estadios y cuantitativamente durante el crecimiento del parásito dentro de un mismo estadio. Debido a la importancia de los antígenos de superficie, resultó interesante determinar la inmunogenicidad de estos componentes durante el curso de una infección natural, en particular de las

L.I.. Cuando se estudio la cinética de reconocimiento antigénico por sueros de ratones infectados, se mostró que las cuatro proteínas que son reconocidas inicialmente y por más tiempo (fig. 7) en una respuesta primaria, presentan una Mr muy similar a la de los antígenos inmunopurificados, dando evidencia de que dichas moléculas son inmunógenos importantes del parásito. Estos datos correlacionan con algunos trabajos realizados al respecto por Philip et al (55), en donde reportan que en una reacción primaria hacia T. spiralis, se detectan en los sueros de ratones infectados, anticuerpos que precipitan componentes de la superficie de la L.I. marcada con I-125. Este tipo de anticuerpos se sintetizan más rápidamente en ratones que desarrollan una respuesta inmune más efectiva contra el parásito (56).

La infección primaria con T. spiralis confiere una fuerte inmunidad en una reinfección (57 y 58). El número de larvas que se establecen en el músculo de animales inmunizados depende de varios factores (27), muchos de los cuales pueden estar controlados por el acervo genético de los huéspedes (59). En el estudio realizado en este trabajo, se demostró que los cuatro antígenos purificados por columnas de sefarosa 4B-AcM NIM-M1, fueron capaces de inducir niveles altos de protección (Tabla II), reduciendo el número de larvas infectivas que alcanzan el enquistamiento en células musculares cuando se inocularon con adyuvante completo de Freund. La inoculación de estos antígenos no induce una respuesta inmune anti-T. spiralis cuando se administran sin el adyuvante (Parkhouse, comunicación personal). Estos datos sugieren la necesidad de investigar el uso

de adyuvantes aplicables al humano como potenciadores de la respuesta inmune, en combinación con antígenos relevantes del parásito. El grado de protección inducido por los antígenos purificados resultó ser dosis-dependiente (Tabla II), siendo una de sus manifestaciones a nivel intestinal, acelerando la expulsión de parásitos adultos (Tabla III).

Estudios anteriores han detectado antígenos protectores del esticosoma y de productos de excreción-secreción de la L.I., aislados por técnicas bioquímicas (60, 61 y 62), por columnas de afinidad con anticuerpos policlonales (63) o con anticuerpos monoclonales (49 y 52). Los antígenos obtenidos empleando columnas de anticuerpos monoclonales presentan un P.M. de 45-49 y de 50/55 Kd, muy similar a la Mr de dos de las proteínas aisladas con el AcM NIM-M1. Animales inmunizados con aquellos antígenos presentan una expulsión acelerada de parásitos adultos. Además, dichos antígenos tienen un efecto reductor de la fecundidad en las hembras de T. spiralis.

No se conoce con exactitud la relación entre antígenos del esticosoma y antígenos cuticulares. Aunque es factible suponer que las proteínas superficiales procedan de los productos del esticosoma, lo cual podría explicar la similitud en los P.M. de las proteínas de ambas estructuras. Aunado a esto, como se mencionó con anterioridad, el AcM NIM-M1 puede reaccionar con células del esticosoma (53). Así mismo, los AcM producidos contra proteínas de excreción-secreción y del esticosoma (49 y 52) reconocen la superficie de la L.I.

El hecho de que antígenos de la L.I. sean capaces de inducir

una respuesta inmune que afecta a otro estadio, correlaciona con los resultados obtenidos por varios investigadores (27 y 32), los cuales establecieron que los estadios de L.I. preadulto son más eficaces en inducir una respuesta protectora, acelerando la expulsión de parásitos adultos del intestino de ratones infectados y disminuyendo la fecundidad de las hembras. Posiblemente, la expulsión acelerada de los parásitos adultos estimulada por la inmunización con los antígenos purificados, antes que estar dirigida específicamente contra el estadio adulto este dada por una alteración en la fisiología (64 y 65) de los intestinos de animales infectados, ocasionando un microambiente no propicio para el establecimiento de los parásitos. En contraposición, el efecto reductor de la fecundidad reportado en otros trabajos (49 y 52) con antígenos purificados es más factible que sea una respuesta específica. Estudios inmunocitoquímicos realizados por Mc Laren (53), mostraron que el AcM NIM-M1 reconoce antígenos de los intestinos y del esticocoma de los parásitos adultos. Si estos antígenos se secretaran podrían ser el blanco de la respuesta estimulada por los antígenos de la L.I.

El estudio de los componentes aislados de T. spiralis, además de proporcionar perspectivas para la creación de métodos inmunoprolifáticos, hace posible el estudio más detallado de los componentes parasitarios, en función de los mecanismos inmunes que generan en el huésped. Una perspectiva interesante, es el análisis de las células inmunes que son estimuladas por los diferentes antígenos aislados, así como de los factores que se

producen durante esta estimulación y su efecto en los mecanismos de eliminación del parásito. Este enfoque permitiría la disección de la respuesta inmune dirigida contra T. spiralis. Y, los datos que se pudieran obtener empleando como modelo experimental a este parásito, podrían ser extrapolados y aplicados a otras enfermedades ocasionadas por parásitos nemátodos.

La diagnóstico de la triquinosis generalmente se lleva a cabo utilizando triquinoscopia o métodos de digestión. Con estos métodos fácilmente se pueden obtener falsos negativos, según la porción de muestra que se analice. Por esta razón se hace necesaria la investigación de nuevas técnicas para el diagnóstico de la enfermedad. Actualmente se han propuesto técnicas inmunoenzimáticas que podrían ser altamente aprovechables (66). El ensayo de ELISA es una técnica inmunoenzimática que ha resultado ser muy sensible en el diagnóstico de la triquinosis en comparación con los métodos anteriormente señalados (67 y 68). A pesar de esto, el empleo de extractos antigénicos crudos del parásito puede conducir a problemas de especificidad, reproducibilidad y estandarización (69). En este estudio se probaron tanto el extracto soluble total como los antígenos purificados de la L.I. en ensayos de ELISA, para la detección de anticuerpos en sueros de animales infectados experimentalmente con T. spiralis. El uso de los antígenos purificados dio una mayor especificidad en el diagnóstico de la triquinosis experimental en ratones, disminuyendo los falsos positivos en sueros de ratones normales (fig. 3). No obstante, es más importante evaluar la utilidad de la técnica en el principal

organismo transmisor de la enfermedad hacia el hombre, el cerdo. Tomando en cuenta esto, se llevaron a cabo los ensayos preliminares de ELISA, empleando extractos solubles de T. spiralis y sueros obtenidos de cerdos infectados experimentalmente con T. spiralis, teniendo como control sueros obtenidos de animales normales. Mediante estas pruebas se demostró nuevamente la alta especificidad de la técnica, ya que se obtuvieron bajos niveles de detección de anticuerpos con los sueros de cerdos no infectados (fig. 4) en comparación con aquellos determinados en los cerdos infectados. La reacción detectada en los cerdos sanos, se pudo deber a que en sueros procedentes de animales no infectados se pueden encontrar al menos dos clases de inmunoglobulinas que reaccionan con antígenos del parásito (70), proporcionando falsos positivos en los ensayos de detección de anticuerpos. Trabajos posteriores realizados en el laboratorio con sueros de cerdos normales e infectados indicaron una especificidad aun mayor cuando los ensayos de ELISA se realizaron con los antígenos purificados, en comparación con el uso del extracto soluble total (71). Así mismo, para verificar que los antígenos purificados no presentaban reacción cruzada con sueros obtenidos de animales infectados con otros parásitos, se analizaron sueros de cerdos en los cuales se detectó la infección con Histrongylus rubidus, Ascaris suis, Estrongyloides mansoni, Trichuris suis y Oesophagostomun dentatum. Las lecturas de D.O. obtenidas en los ensayos con estos sueros, resultaron ser considerablemente más bajas que las lecturas determinadas en los ensayos realizados con

sueros de cerdos infectados con T. spiralis (72).

La utilidad de los antígenos purificados en el diagnóstico de la triquinosis también ha sido evidenciada por otros autores. Gamble y Graham (73) estudiaron dos proteínas del esticocoma (53 y 49 Kd), obtenidas por cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales, en ensayos de ELISA para el diagnóstico de la triquinosis. El uso de estos antígenos eliminó los falsos positivos y detectó a todos los cerdos infectados. Resultados similares han sido obtenidos en microensayos inmunoenzimáticos con antígenos purificados por cromatografía de afinidad con anticuerpos policlonales (74).

Los métodos de diagnóstico basados en la detección de anticuerpos, no proveen información acerca de la presencia o ausencia de la infección. Debido a lo anterior, es importante buscar alternativas para un diagnóstico más preciso. A este respecto la detección de antígenos circulantes del parásito puede proporcionar una diagnosis más específica y proveer datos en relación con la etapa de infección. De esta forma se puede saber si un individuo presenta una infección activa o el período de infección, lo cual hace más precisa la aplicación de un tratamiento con medicamentos, dirigido a la eliminación del parásito.

Tomando en cuenta las características de especificidad y homogeneidad del AcM NIM-M1, en combinación con la gran afinidad que tiene la avidina por la biotina, estos se emplearon para la medición de antígenos circulantes de la L.I. en el suero de animales infectados. Los resultados obtenidos en estos ensayos

demonstraron la presencia de antígenos circulantes de L.I. en sueros de animales infectados, aunque en niveles muy bajos. Datos similares han sido reportados por Gamble y GraHam (75) con un anticuerpo monoclonal que reconoce antígenos del esticocoma.

La detección de niveles bajos de antígenos circulantes en los sueros de ratones infectados, se pudo deber principalmente a dos factores: primero, a la formación de complejos inmunes en los sueros y como consecuencia una interferencia en la detección de antígeno circulante libre (76) y segundo, a la alta inmunogenicidad de los antígenos que reconoce el AcM NIM-M1 (fig. 7), conduciendo a la rápida eliminación de estas moléculas. A este respecto, sería interesante el tratar de detectar productos del parásito que por su poca inmunogenicidad no fueran removidos de la circulación con gran rapidez. De esta manera se permitiría su detección con mayor facilidad.

Otra característica de los ensayos, fue la poca reproducibilidad entre diferentes grupos experimentales. Aún dentro de un mismo grupo experimental hubo mucha disparidad en los valores obtenidos para cada ratón. Esto se pudo deber a una respuesta muy heterogénea entre los distintos individuos empleados. Adicionalmente, en los dos grupos de ratones ensayados (fig 5 y 6) se cuantificó un aumento en los niveles de antígeno circulante a los días 7 y 28, correlacionándose con la reciente maduración de las L.I. al estadio adulto o a la presencia de las L.I. en la célula muscular respectivamente. En la fig. 6 se muestra que después del día 28, posterior al enquistamiento en tejido muscular, hay un aumento todavía mayor de antígeno

circulante en el suero de animales infectados. Estos resultados podrían correlacionarse con las observaciones reportadas por Fritchard (77), quien ha demostrado la liberación de antígenos de la L.I. en el tejido muscular que circunda al quiste.

Los resultados obtenidos en este estudio dan las bases para un uso más generalizado del ensayo de ELISA como método de diagnóstico para triquinosis, ya que además de ser sensible y específico, puede ser aplicables en las condiciones que prevalecen en el campo, haciendo posible estudios epidemiológicos sobre la infección por I. spiralis.

La aplicación de técnicas de ingeniería genética y DNA recombinante al estudio de estos antígenos, podría permitir la clonación de genes específicos, que codifican para estos componentes, en sistemas bacterianos. De esta manera se podría tener la expresión de los genes clonados en bacterias, permitiendo así una producción a gran escala de los antígenos de interés.

VI. CONCLUSIONES

1. El empleo de columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales en la purificación de antígenos parasitarios resulta ser un método eficiente en lo que respecta al rendimiento y pureza de antígenos específicos.
2. Los antígenos de superficie de la larva infectiva son preferencialmente reconocidos por anticuerpos generados durante el curso de la infección.
3. Los antígenos de superficie de la larva infectiva purificados mediante columnas de anticuerpos monoclonales son capaces de inducir protección en triquinosis experimental, teniendo una de sus manifestaciones en la expulsión acelerada de parásitos adultos.
4. El uso de antígenos purificados en ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos circulantes ofrece ventajas en cuanto a especificidad en relación al empleo de antígenos crudos.
5. El empleo de anticuerpos monoclonales en contra de *T. spiralis* en ensayos de ELISA permite la detección de antígeno circulante en animales infectados, existiendo correlación entre el tiempo de detección y el curso de la infección.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Leid, W.R. and Williams, F.J. (1979). Helminth parasites and host inflammatory system. *Chemical Zoology*, 11: 243.
- 2.- Maizel, R.M., Philipp, M. and Ogilvie, E.M. (1982). Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* 61: 109.
- 3.- Kazura, J.W. Triquinosis. en Cohen, S. and Warren, S.K. (1982). *Immunology of parasitic infections*. 2nd. ed. Blackwell Scientific Publications, 654.
- 4.- Dennis, D.T., Despommier, D.D. and Davis, N. (1970). Infectivity of the newborn larvae of Trichinella spiralis in the rat. *J. Parasitol.* 56: 974.
- 5.- Harley, J.P. and Galicchio, V. (1971). Trichinella spiralis: migration of larvae in the rat. *Exp. Parasitol.* 44: 11.
- 6.- Despommier, D.D. en Kennedy, C.R. (1976). Ecological aspects of parasitology. North Holland, 269.
- 7.- Beckk, W.J. Trichinosis in domesticated and experimental animals. en Thomas, C.C. (1976). *Trichinosis in man and animals*. Springfield, 61.
- 8.- Wakelin, D. (1980). Genetic control of immunity to parasites. Infection with Trichinella spiralis in inbred congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunology* 2: 85.
- 9.- Bell, R.G., Mc. Gregor, D.D. and Adams, L.S. (1982). Trichinella spiralis: Genetics basis for differential expression of phase-specific intestinal in inbred mice. *Exp. Parasitology* 53: 315.
- 10.- Wakelin, D. and Donachie, A.M. (1983). Genetic control of immunity to Trichinella spiralis: influence of H-2 linked genes on immunity to the intestinal phase of infection. *Immunology* 48: 343.
- 11.- Wasson, D.L., Wakelin, D., Brooks, B.O., Krco, C.J. and Davis, C.S. (1984). Genetic control of immunity to Trichinella spiralis infections of mice. Hypothesis to explain the role H-2 genes in primary and challenge infections. *Immunology* 51: 625.

- 12.- Valenzuela, R.M. Epidemiología de la triquinosis. en Chan, R.M. (1981). Ciencia veterinaria. UNAM 3: 314.
- 13.- Marañón-Martínez, R. (1983). Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. Sal. Pub. Méx. 25: 712.
- 14.- Simposium "La triquinosis clínica, recientes estudios en México", realizado en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales en México el 29 de septiembre de 1978.
- 15.- Marañón-Martínez, R. (1985). Está aumentando la triquinosis en México? Podría ser esto una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo? Sal. Pub. Méx. 27: 40.
- 16.- Philipp, M., Clark, N.W.T. and Parkhouse, E.M.R. and Ogilvie, B.M. (1980). Cloning proteins on the surface of a parasitic nematode. Nature 287: 538.
- 17.- Jungery, M., Clark, N.W.T. and Parkhouse, E.M.R. (1983). A major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of Trichinella spiralis. Molecular Biochemical Parasitology 7: 101.
- 18.- Ortega-Pierres, G., Chayen, A., Clark, N.W.T. and Parkhouse, E.M.R. (1983). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of Trichinella spiralis. Parasitology 88: 359.
- 19.- Parkhouse, E.M.R. and Clark, N.W.T. (1983). Stage specific secreted and somatic antigens of Trichinella spiralis. Molecular Biochemical Parasitology 9: 319.
- 20.- Despomnier, D.D. and Muller, M. (1976). The stichosome and its secretions granules in the mature muscle larvae of Trichinella spiralis. J. Parasitol. 62: 775.
- 21.- Crandall, P.B. and Crandall, C.A. (1972). Trichinella spiralis: immunologic response to infection in mice. Exp. Parasitology 31: 378.
- 22.- Mackenzie, C.D., Jungery, M., Taylor, M.P. and Ogilvie, M.E. (1981). The in vitro interactions of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surface in the presence of complement or antibodies. Pathology 133: 161.

- 23.- Jungery, M. (1981). Parasite surface antigens and host inflammatory cells involved in nematode. Tesis doctoral.
- 24.- Kazura, J.W. (1981). Host defense mechanisms against nematode parasites. Destruction newborn Trichinella spiralis larvae by human antibodies and granulocytes. J. Infect. Dis. 143: 712.
- 25.- Butterworth, A.E., Vadas, M., Wassom, D., Dessen, A., Hogan, M., Sherry, E., Gleich, G. and David, J. (1979). Interactions between human eosinophils and schistosomula of Schistosoma mansoni. II. The mechanism of irreversible adherence. J. Exp. Med. 150: 1456.
- 26.- Philipp, M., Taylor, M.P., Parkhouse, E.M.R. and Ogilvie, M.B. (1981). Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode Trichinella spiralis. J. Exp. Med. 154: 210.
- 27.- Bell, R.G. and Mc Gregor, D.D. (1979a). Trichinella spiralis: role of different cycle phase in induction, maintenance, an expression of rapid expulsion in rats. Exp. Parasitology 48: 51.
- 28.- Wakelin, D. and Lloyd, M. (1976). Immunity to primary and challenge infections of Trichinella spiralis in mice: a reexamination of conventional parameters. Parasitology 72: 173.
- 29.- Love, R.J., Ogilvie, M.B. and Mc Laren, D.J. (1976). The immune mechanisms which expels the intestinal stage of Trichinella spiralis from rats. Immunology 30: 7.
- 30.- Castro, G.A., Eadial-Aceves, F., Adams, P.R., Copeland, E.M. and Dibrick, S.J. (1976). Response of immunized parenterally nourished rats to challenge infection with to nematode Trichinella spiralis. J. Nutrition 106: 1404.
- 31.- Bell, R.G. and Mc Gregor, R.G. (1979b). Trichinella spiralis: expression of rapid expulsion in rats exposed to abbreviated enteral infection. Exp. Parasitology 48: 42.
- 32.- Wakelin, D. and Wilson, M.M. (1979). T and B in the transfer of immunity against Trichinella spiralis in mice. Immunology 37: 103.

- 33.- Grencis, R.K., Lee, T.D.G. and Wakelin, D. (1985). Immunity to Trichinella spiralis in mice: generation of effective cells by different life cycle stages. Inter. J. Parasitol. 15: 195.
- 34.- Fasekas de ST Groth, S. and Scheidegger, D. (1981). Production of monoclonal antibodies, strategy and tactics. J. Immunol. Meths. 35: 1.
- 35.- Ortega -Pierres, M.G., Mackenzie, C.D. and Parkhouse, E.M.R. (1984). Protection against Trichinella spiralis induced by monoclonal antibody that promotes killing of newborn larvae by granulocytes. Parasite Immunology 6: 275.
- 36.- Ortega-Pierres, M.G., Almond, N.W. and Parkhouse, E.M.R. (1986). Applications of biochemically defined antigens of Trichinella spiralis in host immunity, protection and diagnosis. En prensa.
- 37.- Dennis, D.T., Despommier, D.D. and Davis, N.J. (1970). Infectivity of newborn larvae of Trichinella spiralis in the rat. J. Parasitology 56: 974.
- 38.- Mackenzie, C.D., Jungery, M., Taylor, P.M. and Ogilvie, E.M. (1980). Activation of complement, the induction of antibody to the surface of nematode and effect of these factors and cells on worm survival in vitro. Eur. J. Immunol. 10: 594.
- 39.- Parkhouse, E.M.R., Philipp, M. and Ogilvie, E.M. (1981). Characterization of surface antigens of Trichinella spiralis infective larvae. Parasite Immunology 3: 339.
- 40.- Lowry, O.N., Rosenbrauh, N.J., Al Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.
- 41.- March, S.C., Parikh, I. and Cutrecases, P. (1974). A simplified methods for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Ann. Biochem. 60: 149.
- 42.- Gomory, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. In Methods in Enzymology. Academic Press Vol I: 138-146.
- 43.- Parkhouse, E.M.R. (1984). Immunopurification. British Medical Bulletin 3: 297.

- 44.- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
- 45.- Garvey, S.J., Gremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1977). *Methods in immunology*. 3rd. ed. Ed. W. A. Benjamin inc. 313-317.
- 46.- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bratlett, A. (1979). The enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). Ed. Dynatech Laboratories Inc. 22-41.
- 47.- Boorsma, D.M. (1983) Conjugation methods an biotin-avidin systems. en Bullock, G.R. and Petrusz, P. *Techniques in immunocytochemistry*. Ed. Academic Press 155.
- 48.- Towbin, H., Staemlin, T. and Gordon, A. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350.
- 49.- Silverstein, S.D. and Despommier, D.D. (1984). Antigens from Trichinella spiralis that induce a protective response in the mouse. *J. Immunology* 132: 898.
- 50.- Ferrudent-Badoux and Binaghi, R.A. (1974). Isolation and properties of an soluble antigen of Trichinella spiralis. *Immunology* 26: 1217.
- 51.- Despommier, D.D. and Lacetti, A. (1981). Trichinella spiralis: proteins and antigens isolated from a large-particle fraction derived from the muscle larva. *Exp. Parasitology* 51: 279.
- 52.- Gamble, H.R. (1985). Trichinella spiralis: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. *Exp. Parasitology* 59: 398.
- 53.- Mc Laren, D.J., Ortega-Pierres, M.G. and Parkhouse, E.M.R. (1986). Trichinella spiralis: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies probes. En prensa.
- 54.- Mackenzie, C.D., Preston, P.M. and Ogilvie, E.M. (1978). Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature* 276: 826.

- 55.- Philipp, M., Taylor, P.M., Parkhouse, E.M.R. and Ogilvie, E.M. (1981). Immunoresponse to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode Trichinella spiralis. J. Exp. Med. 154: 210.
- 56.- Jungery, M. and Ogilvie, E.M. (1982). Antibody response to stage-specific Trichinella spiralis surface antigens in strong and weak responder mouse strains. J. Immunology 129: 839.
- 57.- Wakelin, D. and Denham, D.A. (1983). The immune response. In William C. Campbell Trichinella and triquinosis. Ed. Plenum Press 265.
- 58.- Murell, K.D. (1985). Trichinella spiralis: acquired immunity in swine. Exp. Parasitology 52: 347.
- 59.- Bell, R.G. and Mc Gregor, D.D. (1980). Variation in anti-Trichinella responsiveness in inbred strains. In Genetic control of natural resistance to infection and malignancy. Ed. Academic Press, 67-73.
- 60.- Durham, C.P., Murell, K.D. and Lee, C.M. (1984). Trichinella spiralis: immunization of rats with an antigen fraction enriched allergenicity. Exp. Parasitology 57: 297.
- 61.- Despommier, D.D. (1981). Partial purification and characterization of protection inducing antigens from the muscle larva of Trichinella spiralis by molecular sizing chromatography and preparative flatbed isoelectric focusing. Parasite Immunology 3: 261.
- 62.- Murell, K.D. and Despommier, D.D. (1984). Immunization of swine against Trichinella spiralis. Vet. Parasitology 15: 263.
- 63.- Despommier, D.D. and Lacetti, A. (1981). Trichinella spiralis: partial characterization of antigen isolated by immuno-affinity chromatography the muscle larvae. J. Parasitology 67: 332.
- 64.- Russell, D.A. and Castro, G.A. (1979). Physiological characterization of biphasic immune response to Trichinella spiralis in the rat. J. Infect. Dis. 139: 304.
- 65.- Smith, J.W. and Castro, G.A. (1978). Relation of peroxidase activity in gut mucosa to inflammation. Am. J. Physiol. 234: 72.

- 66.- Ruitenber, E.J., Ljungstrom, I., Streenber, P.A. and Buys, J. (1975). Application of immunofluorescence and immunoenzyme methods in the serodiagnosis of Trichinella spiralis. Ann. of New York Acad. Sci. 254: 296.
- 67.- Ruitenber, E.J., Streenberg, P.A., Brosi, B.J. and Buys, J. (1976). Realibity of the enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in conventionally raised pigs. J. Immunology 10: 67.
- 68.- Van Kanapen, F., Franchimont, J.H., Ruitenber, E.J., Basidelli, B., Bradley, J., Gilloson, T.E., Gottal, G., Henrikse, S.A., Koheler, G., Skougard, N., Soule, C. and Taylor, S.M. (1980). Comparison of the enzyme linked immoadsorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of Trichinella spiralis infections in pigs. Vet. Parasitology 7: 109.
- 69.- Linder, E. (1986). Developement in immunoassays for diagnosis of parasitic diseases.
- 70.- Clinard, E. (1979). Identification and distribution of swine serum immunoglobulins that react with Trichinella spiralis antigens and may interfere with the enzyme labeled antibody test for trichinosis. Am. J. Vet. Res. 140: 1558.
- 71.- Velázquez, N.M.A. (1986). Diagnóstico serológico en cerdos del Municipio de Paracho Michoacán mediante el empleo del ensayo de ELISA. Tesis de Licenciatura.
- 72.- Sánchez, S.V. (1986). Determinación de anticuerpos en contra de Trichinella spiralis por el método de ELISA, en cerdos de traspatio del Municipio del Paso Ovejas, Veracruz. Tesis de Licenciatura.
- 73.- Gamble, H.R. and Graham, C.E. (1984). Monoclonal antibody purified antigens - the immunodiagnosis of triquinosis. Am. J. Vet. Res. 45: 67.
- 74.- Seawright, G.L., Despommier, D.D., Zimmermann, W. and Isenstein, R.S. (1983). Enzyme-immunodiagnosis for swine trichinellosis usin antigens purified by immunoaffinity chromatography. J. Trop. Med. Hyg. 32: 1275.
- 75.- Gamble, H.R. and Graham, C.D. (1984). Comparison of monoclonal antibody base competitive and indirect enzyme linked immunoabsorbent assay for the diagnosis of swine trichinosis. Vet. Immunol. and Immunopathol. 6: 379.

- 76.- D'Amelio, R. (1980). Circulating immune complexes in infectious tropical diseases. Immunol. Today 112: 113.
- 77.- Pritchard, D.I. (1985). Antigen production by encysted muscle larvae of Trichinella spiralis. J. Helminthol. 59: 71.