

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“USO DE FAGOS FILAMENTOSOS PARA EL
DESARROLLO DE UN INMUNODIAGNOSTICO Y DE
UNA VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS”**

TESIS

QUE PRESENTA

ERIK GONZALEZ MARTINEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN**

MÉXICO, D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi comité tutorial, el Dr. Abraham Landa Piedra y a la Dra. Luz María López Marín, por sus sugerencias y comentarios al evaluar esta tesis.

Al *CONACyT* por otorgarme una beca con número de registro 167196 para llevar cabo mis estudios de Maestría.

Este proyecto recibió el apoyo 33581-M proporcionado por CONACYT.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian.

Dedico este trabajo a los dos pilares de mi vida.

A mi madre

**Por su inagotable amor
y por ser mí inspiración
de tenacidad y lucha.**

A mi hermano

**Por ser parte de mi guía
en esta vida y por
enseñarme que siempre
hay más, detrás de una
meta.**

Agradecimientos

- Al Dr. Karen Manucharyan por su invaluable guía durante mi desarrollo profesional.
- A la Dra. Gohar Gevorgyan por su inagotable paciencia y enseñanzas que sirvieron para mejorar mi desempeño y superación.
- A Gonzalo Acero Galindo, Natasha Ivanovna Copitin y Mari Elena Munguia por su excelente asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo.
- A mis compañeros del laboratorio Hugo, Gonzalo, Yetzi, y Mariel, por hacerme parte de sus experiencias y alegrías.
- A Alberto y Ángel, por las locuras y la amistad sincera.
- A mis amigos de la Facultad de Ciencias Irma, Pedro, Héctor y Tonatiuh, que siempre me alentaron y apoyaron en las buenas y en las malas.
- A mis amigos de Biomédicas, en especial a la Chulis, Yuko, Prisco y Jorge.
- A Carmen por seguir compartiendo conmigo algo más que solo una parte de su vida.

Uso de fagos filamentosos para el diseño de un inmunodiagnóstico y de una vacuna contra la cisticercosis.

ÍNDICE

1. Resumen.	1
1.1 Abstract	3
2. Introducción.	5
2.1 Diagnóstico de la neurocisticercosis.	7
2.2 Vacuna contra la cisticercosis porcina.	10
2.3 Despliegue en Fago (Phage Display).	15
3. Objetivos.	22
4. Metodología.	
4.1 Material humano.	23
4.2 Construcción de una biblioteca genómica de cisticercos de <i>T. solium</i> .	23
4.3 Selección de la biblioteca genómica de <i>T. solium</i> contra suero de ratón hiperinmune anti- <i>T. crassiceps</i> .	24
4.4 ELISA-Screening de las clonas seleccionadas.	25
4.5 Detección de anticuerpos específicos anti- <i>T. solium</i> mediante ELISA.	26
4.6 Secuenciación del ADN de los fagos y análisis de similitud de secuencias.	27
4.7 Construcción de los fagos recombinantes y secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos.	27

4.8 Inmunización de los cerdos.	29
4.9 Detección de anticuerpos específicos por ELISA.	30
4.10 Ensayos de proliferación celular y cuantificación de citocinas.	31
4.11 Reto de los cerdos con huevos de <i>T. solium</i> .	32
5. Resultados.	
5.1 Generación de la biblioteca de ADN genómico de <i>T. solium</i> y bioselección con el suero de ratón hiperinmune.	33
5.2 Inmunorreactividad de las clonas con líquidos cefalorraquídeos y plasmas de pacientes con NCC.	34
5.3 Construcción de los fagos recombinantes utilizados como componentes de una vacuna (CPhV) anti-cisticercosis porcina.	37
5.4 Respuesta inmune inducida en cerdos inmunizados con fagos.	38
5.5 Efecto de la vacunación con fagos sobre el reto con <i>T. solium</i> .	42
6. Discusión y Conclusiones.	44
7. Referencias.	51
8. Apéndice	67

1. RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad del sistema nervioso central causada por la fase larvaria del céstodo *Taenia solium* que también es el agente causal de la cisticercosis porcina y la taeniasis en humanos. Las enfermedades causadas por *T. solium* son reconocidas como un serio problema de salud a nivel mundial. El diagnóstico de la NCC requiere de técnicas costosas tales como la tomografía computarizada y la resonancia magnética, que no son accesibles a la mayoría de la población de los países en desarrollo donde la enfermedad es endémica. Aunque se cuenta con un método diagnóstico reconocido por la Organización Mundial de la Salud denominado EITB, su empleo no es adecuado en las poblaciones de zonas endémicas, en formatos de ELISA y de Western blot, ni en ensayos de campo. Se han utilizado otras técnicas para detectar anticuerpos y antígenos de *T. solium*. Los antígenos utilizados en estos ensayos son obtenidos a partir de extractos y de fluido de *T. solium*. Debido a la dificultad en la disponibilidad y calidad del material parasitario para obtener los antígenos, se han realizado muchos intentos para producir y evaluar antígenos recombinantes.

Como parte de este estudio, se generó una biblioteca de ADN genómico de cisticercos de *T. solium* donde péptidos o proteínas fueron fusionadas al amino terminal de la proteína pVIII de M13 expresados sobre la superficie del fago. Con el fin de identificar clonas que expresen antígenos derivados del parásito con potencial de inmunodiagnóstico de NCC, la biblioteca fue usada en ensayos de bioselección y su reactividad evaluada en ELISA usando un suero de ratón hiperinmune anti-*T. crassiceps*. Dos clonas fueron seleccionadas para la evaluación de su inmunorreactividad con un panel de muestras de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y plasmas de pacientes con NCC confirmada, y como controles muestras de LCR de pacientes con encefalitis y plasmas de individuos sanos. Usando las clonas recombinantes seleccionadas (EK5 y EK26) para el inmunodiagnóstico de NCC, se obtuvo una sensibilidad del 52%. Además, se observó que estas clonas recombinantes reconocieron anticuerpos presentes en muestras de LCR y plasmas de pacientes con NCC que presentaban arachnoiditis e

hidrocefalia (EK26-50% y EK5-100%, respectivamente) lo que indican que estas moléculas pueden servir como potenciales marcadores moleculares para estas manifestaciones clínicas. De esta forma, se muestra que la identificación de antígenos expresados en fagos aislados de una biblioteca de ADN genómico pueden servir como componentes para el desarrollo de herramientas de inmunodiagnóstico para la NCC.

Por otra parte, el papel del cerdo como huésped intermediario en el ciclo de vida del parásito ofrece la posibilidad de interferir con la transmisión de la enfermedad al diseñar una vacuna que se aplique a los cerdos. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina ha sido el propósito de muchos grupos de investigación. Así, se propuso el uso de fagos para mejorar la inmunogenicidad de una vacuna de péptidos sintéticos así como para reducir los costos de su producción. Se produjeron fagos recombinantes de M13 para expresar los péptidos KETc1, KETc12, GK1 y el antígeno KETc7. El pool de estos cuatro fagos recombinantes fue evaluado en cerdos. Se vacunaron cerdos vía oral y subcutánea induciendo una respuesta inmune celular antígeno específica. Los datos apuntan a la capacidad protectora de esta vacuna de fagos recombinantes contra la cisticercosis porcina. La inmunogenicidad de estos fagos recombinantes, aunado a su bajo costo de producción, los hacen candidatos factibles para ser evaluados en cerdos como una vacuna en un ensayo de campo. Este es el primer reporte de la aplicación de fagos filamentosos como vacunas en animales grandes como el cerdo, el único huésped intermediario de *T. solium*, un parásito de importancia médica y económica en países en vía de desarrollo.

En resumen, se reporta la factibilidad del uso de la tecnología de Phage Display para identificar y producir moléculas que pueden ser útiles en el desarrollo de componentes de un inmunodiagnóstico o de vacuna contra la cisticercosis.

1.1 ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a disease of the central nervous system caused by the larvae stage of *Taenia solium* cestod, which is also the causal agent of pig cysticercosis and taeniasis in humans. The diseases caused by *T. solium* are recognized as a serious health problem at a world-wide scale. The diagnosis of the NCC requires expensive techniques such as computed tomography and magnetic resonance, which are not accessible to most of the population of developing countries where the disease is endemic. Although there is a diagnosis denominated EITB recognized by the World Health Organization, it is not useful on endemic zone populations, nor in ELISA formats, Western blot and in field tests. Other techniques have been used to detect antibodies and antigens of *T. solium*. The antigens used in these tests were obtained from homogenate's extracts and fluid of *T. solium*. Due to the difficulty in the availability and quality of the parasitic material to obtain the antigens, many attempts have been made to produce and evaluate recombinant antigens.

In this study, a genomic DNA library was generated from *T. solium* cysticerci where peptides or proteins were fused to the terminal amino of the protein pVIII which is expressed on the surface of M13 phage. With the purpose of identifying clones expressing *T. solium*-derived antigens with NCC immunodiagnostic potential, the library was used in biopanning tests and their reactivity evaluated in ELISA using a mouse hyperimmune anti-*T. crassiceps* serum. Two clones were selected for the evaluation of their immunoreactivity with a panel of cerebrospinal fluid (CSF) and plasma samples from patients with confirmed NCC, and samples of CSF of patients with encephalitis and plasma from healthy individuals were used as controls. Using the selected recombinant clones (EK5 and EK26) for NCC immunodiagnostic, a 52% sensitivity was obtained. In addition, it was observed that these recombinant clones recognized antibodies present in samples of CSF and plasma of patients with NCC that presented arachnoiditis and hydrocephalus (EK26-50% and EK5-100%, respectively) indicating that these molecules can serve as potential molecular markers for these clinical manifestations. Therefore, the identification of

antigens expressed in isolated phages of a genomic DNA library can serve as components for the development of immunodiagnostic tools for NCC.

On the other hand, the paper of the pig as intermediary host in the parasite's life cycle offers the possibility of interfering with the transmission of the disease by designing a vaccine for pig administration. Therefore, the development of a vaccine against porcine cysticercosis has been the intention of many research groups. In this way, the use of phages was seated out to improve the immunogenicity of a synthetic peptide vaccine as well as to reduce the cost of its production. Recombinant M13 phages were constructed to express the peptides KETc1, KETc12, GK1 and the KETc7 antigen. A pool of these four recombinant phages was evaluated in pigs. They were vaccinated by oral and subcutaneous via inducing a cellular, antigen-specific immune response. The data aim to the protective capability of this recombinant phages vaccine against porcine cysticercosis. The immunogenicity of these recombinant phages, combined to their low production cost, makes them feasible candidates to be evaluated in pigs as a field test vaccine. This is the first report of the application of filamentous phages vaccines on big animals like the pig, the only intermediary host of *T. solium*, a parasite of medical and economic importance in developing countries.

In summary, the feasibility of the use of Phage Display technology to identify and produce molecules that can be useful in the development of components for immunodiagnostic or vaccine against the cysticercosis is reported.

2. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis (CC) en humanos y cerdos es causada por la forma larvaria (cisticerco) producida por el helminto *Taenia solium*. La cisticercosis tiene una distribución mundial, pero es más frecuente en países en vías de desarrollo. Dentro de las zonas más afectadas se encuentran América Latina, Asia y África (Sotelo, et al., 1996) (**Figura 1**). En estas regiones se encuentran las condiciones que permiten la perpetuación de la cisticercosis humana como son la higiene inadecuada, disposición de heces al aire libre, sistemas ineficientes de inspección sanitaria de la carne, la crianza rústica de los cerdos e ingestión de carne de cerdo infectada, así como el riego de alimentos con aguas negras (Hoberg, et al., 2000). La cisticercosis había sido completamente erradicada de Europa y de otros países desarrollados, sin embargo, debido al alto número de inmigrantes de países endémicos se ha reintroducido la enfermedad (Ito, et al., 2003; Schantz, 92, 98; White, 2000).

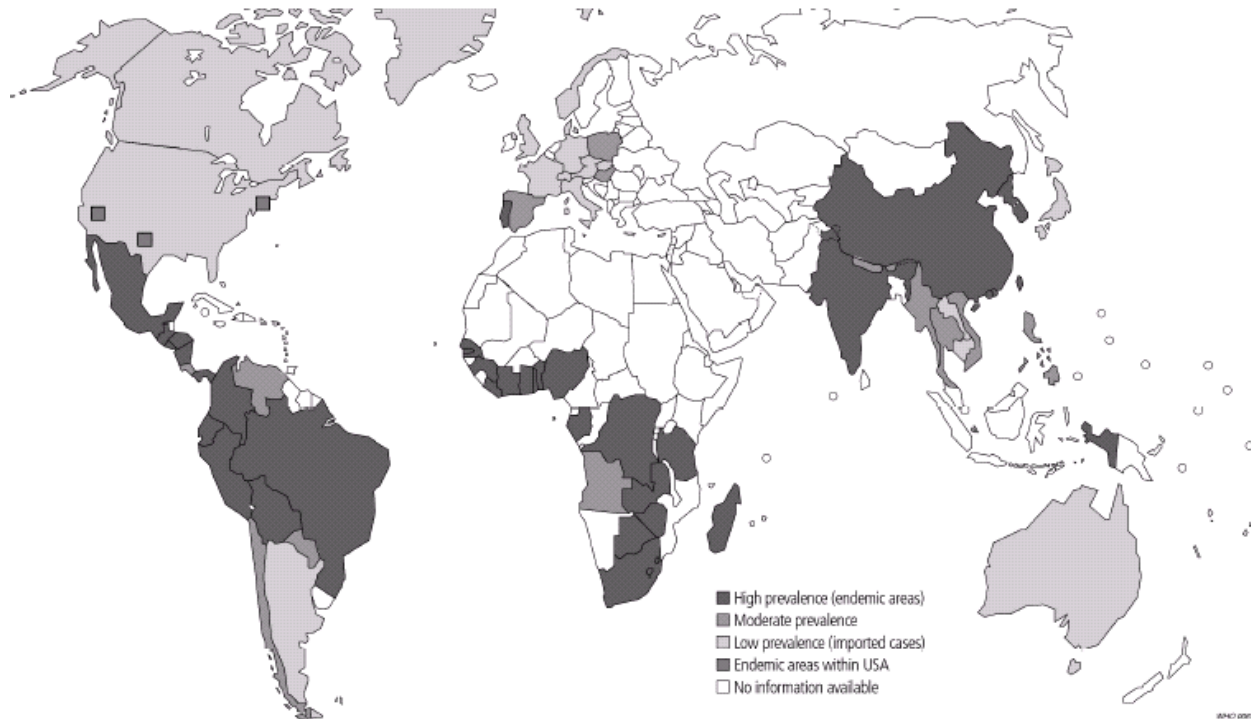


Figura 1. Distribución geográfica mundial de *T. solium*. WHO, 2002.

El adulto de *T. solium* es un parásito que habita el intestino del hombre. El gusano tiene un escólex o cabeza, el cual se estrecha de un lado desarrollando una región de tejidos proliferativos desde el cual los proglótidos son producidos en cadena, formando el estróbilo. El escólex tiene cuatro ventosas y un rostelo con dos hileras de 11-14 ganchillos de 100-160 μm de longitud. Tanto las ventosas como el rostelo permiten la unión del gusano a la pared intestinal (Sciutto, *et al.*, 2000). (Figura 2a)

El ciclo de vida de *T. solium* incluye a la fase larval (cisticercos) que afecta tanto al cerdo como huésped intermediario y al humano como huésped definitivo (contiene al gusano). Los huevos son producidos por el gusano adulto localizado en el intestino de los humanos quienes ingirieron los cisticercos presentes en la carne de cerdo mal cocida. El parásito produce proglótidos grávidos y los huevos son desechados en las heces de los humanos infectados por el gusano adulto.

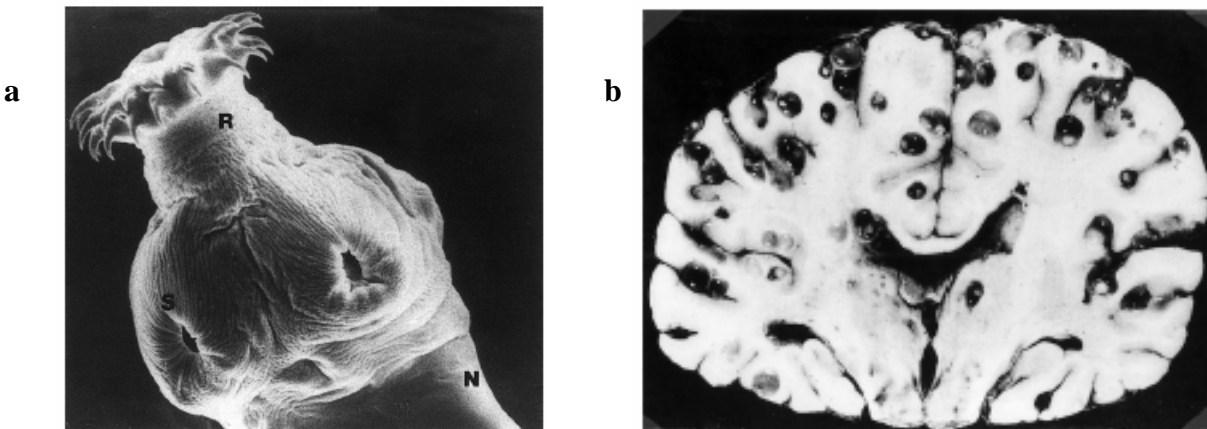


Figura 2. a) Micrografía electrónica de barrido del escólex de *T. solium*. b) Sección cerebral mostrando múltiples cisticercos en etapa vesicular. (*Cisticercosis Humana*, 1998).

Cada proglótido grávido contiene de 30 000-50 000 huevos; cerca del 50% de los huevos contienen oncosferas invasivas. La *T. solium* completamente desarrollada libera de cuatro a cinco proglótidos por día, liberando los huevos al medio. El ciclo es completado cuando la carne de cerdo mal cocida que contiene cisticercos viables, es digerida por el huésped definitivo. El escólex y el cuello dentro de un cisticerco viable evagina en respuesta a las sales biliares y la tripsina (Sciutto, *E. et al.*, 2000). El

gusano se une a la superficie del intestino delgado y comienza a desarrollarse hasta alcanzar la forma de un gusano adulto en 5-12 semanas.

La localización más común de los cisticercos en humanos es el tejido subcutáneo y el sistema nervioso central (SNC), aunque se han localizado también en ojo, músculo, corazón, hígado, pulmones, cavidad abdominal y médula espinal. La localización de los cisticercos en el sistema nervioso central produce la NCC, que es una enfermedad grave y de consecuencias severas (*Sotelo, 2000, Rosenfel, 2003*) (**Figura 2b**). En México es un padecimiento frecuente y de alta endemicidad; las zonas de mayor seroprevalencia se localizan en las regiones occidental y sureste del país (*Larralde 1992*). La neurocisticercosis es un problema de salud en países endémicos donde se reporta como la primera causa de epilepsia en adultos (30-50%) (*Fleury, A., et al., 2003*). Los datos de la seroprevalencia de la NCC en México se estiman en 1.3% al 3.1%, pero con las nuevas técnicas de ELISA y de EITB, se ha estimado alrededor del 10% (*Sarti, E., et al. 1994*). Los valores de la seroprevalencia son más altos entre 15 y 45 años de edad y en mujeres.

2.1 DIAGNÓSTICO DE LA NEUROCISTICERCOSIS

Las manifestaciones clínicas de NCC varían de acuerdo a la localización, medida y etapa de los cisticercos. Además de la epilepsia, la NCC puede provocar dolores de cabeza, hipertensión intracraneal, deficiencias motoras y síntomas psiquiátricos (*García, H. et al., 2003*). El diagnóstico de la NCC mejoró enormemente con la introducción de la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). Estas técnicas demuestran el número y topografía de las lesiones, su estado de involución y el grado de reacción inflamatoria del huésped contra los parásitos. En general, la RM proporciona una mejor detección y definición de imagen. La posibilidad de reconstrucciones de imágenes multiplanares, la capacidad para visualizar las fosas posteriores sin artefactos óseos y su alta resolución de contraste

permite a la RM reconocer muchas formas de cisticercosis no visualizadas con la TC (*Héctor H. et al., 2003*).

Sin embargo, estos métodos son poco accesibles debido a los altos costos y la escasez de equipo en muchos países donde la enfermedad es endémica. El panorama se agrava considerando que el seguimiento de los pacientes requiere de estudios imagenológicos adicionales. Así, la disposición de un procedimiento de bajo costo y fácil aplicación capaz de diagnosticar NCC continúa siendo de gran interés tanto para el diagnóstico de caso como para estudios epidemiológicos en países de alta endemia en donde se requiere la aplicación de campañas para la prevención de esta enfermedad.

Numerosos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en el diseño de inmunodiagnósticos para la NCC que se han basado tanto en la detección de anticuerpos como de antígenos. En la detección de anticuerpos se han evaluado diferentes técnicas como es la fijación de complemento, la hemaglutinación (*Larralde C. 1986*), aglutinación por látex (*Rocha, S.M. et al., 2002*), ensayos inmunoenzimáticos, ELISA, ELISA-dipstick (*Dorny, P. et al., 2003*) y Western-blot (*Gekeler F, et al., 2002; Mittal V, et al., 2001; Hancock, K, et al., 2003, Sato, M., et al., 2003*). Estos métodos se han evaluado usando distintas fuentes antigénicas provenientes del parásito, como lo son extractos totales de *T. solium* (*Larralde et al., 1989*), de líquido vesicular (*Larralde et al., 1986; Dekumyoy et al., 2000*), de escólex (*Nascimento et al., 1987*), y antígenos de secreción (*Molinari et al., 2002*). También se han utilizado antígenos heterólogos provenientes de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Este parásito comparte antígenos de reacción cruzada con los cisticercos de *T. solium*, pudiendo utilizarse para reemplazar a aquellos sin decremento en su sensibilidad ni especificidad (*Larralde et al., 1990; Bueno et al., 2000; Pardini et al., 2002; Peralta et al., 2002, Ishida et al., 2003*). La facilidad y cantidad con que se pueden obtener antígenos de *T. crassiceps*, resulta ventajoso mediante un procedimiento sistemático y controlado a partir de ratones infectados experimentalmente. Recientemente, se han utilizado antígenos sintéticos (*Gevorkian et al., 1996; Hernández et al., 2000*), recombinantes (*Sako et al., 2000; Hubert et al., 1999;*

Chung et al., 2002) o purificados (*da Silva et al., 2000; Ev et al., 1999; Peralta et al., 2002*) a partir de cisticercos de *T. crassiceps*.

La prueba inmunodiagnóstica más específica desarrollada hasta ahora es la denominada EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot). Es una prueba que se basa en una fracción de antígenos glicoproteicos de cisticercos de *T. solium*, purificados por cromatografía usando lentil-lectinas, que presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad que varía del 70 al 90% (*Tsang et al., 1989*). Sin embargo, frecuentemente el ensayo resulta positivo para portadores de *T. solium* así como de *T. saginata* y se ha encontrado una sensibilidad del 28% en casos con un solo cisticercos en el cerebro (*Wilson, et al., 1991*). La realización de este método es costosa y de difícil ejecución. Además, requiere la utilización de antígenos purificados a partir de cisticercos con la variabilidad que implica el uso de parásitos de diferentes orígenes, aspecto de especial interés en vista de la posible variabilidad del parásito (*Yakoleff-Greenhouse et al., 2002*). Otra limitante es que la mezcla de estos antígenos no es aplicable para ELISA debido a la presencia de fracciones no específicas. En países donde la enfermedad es endémica, el método de ELISA es preferible por su mejor disponibilidad, simplicidad y menor costo comparado con el EIBT (*Rosas et al., 1986*).

En cuanto a la taeniasis, el humano es el único portador. La taeniasis tiene un curso clínico benigno, produciendo algunos trastornos gastrointestinales o es asintomática. La detección de los portadores humanos de *T. solium* fue identificado como uno de los puntos clave para la implementación de controles viables para esta enfermedad (*WHO, 1983*). El diagnóstico de la taeniasis se realiza mediante la identificación de proglótidos expulsados en el excremento o por identificación de huevos de *Taenia* en la materia fecal observables al microscopio por medio de estudios coproparasitológicos. Sin embargo, este estudio diagnóstico es poco sensible (60%), ya que se debe tener destreza para identificar a los huevos y no todos los días se eliminan huevos en la materia fecal. También existe una prueba inmunológica denominada ELISA para la detección de coproantígenos (ECPS). Esta técnica es una prueba diagnóstica

sensible (95%) y específica (99%) comparada con el ECPS (aunque no es comercial) (Maass, M., et al., 1992). Nuevas y mejoradas herramientas de inmunodiagnóstico y de PCR para la taeniasis se están desarrollando (James C. et al., 2003).

2.2 VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA

Debido a los escasos avances observados en el control y diagnóstico de la taeniasis, la mayoría de los estudios se han enfocado a controlar la enfermedad en el cerdo. El papel del cerdo como huésped intermediario ofrece la posibilidad de generar un método de control real para interferir o impedir la transmisión de la infección al vacunar a los cerdos, modificando así la prevalencia de la cisticercosis.

En el laboratorio y en el campo se han evaluado distintos antígenos que han demostrado protección parcial contra el reto con *T. solium*. En algunos de estos estudios se han utilizado antígenos derivados de extracto total de *T. solium*; de oncosferas (Molinari et al., 1988); de productos de extractos de excreción-secreción de oncosferas de *T. solium* (Pathak and Gaur, 1990); y extractos antigénicos de cisticercos de *T. crassiceps* (Sciutto et al., 1990; Manoutcharian et al 1996). Se han identificado antígenos protectores obtenidos de distintas estructuras y estadios de *T. solium*. Se ha evaluado su capacidad protectora en modelos experimentales y se han obtenido distintos niveles de protección. La mayoría de la búsqueda de antígenos se ha llevado a cabo con estadios tempranos del parásito, ya sea en la fase de huevo (oncosfera) o de cisticerco, basándose en que estos estadios son los más vulnerables a la respuesta inmune. Se ha observado que los antígenos obtenidos de oncosferas y de cisticercos de *T. solium* protegen contra especies homólogas y heterólogas de taenias, tal vez debido a la conservación de los antígenos en las distintas fases del parásito y entre diferentes especies de *Taenias*.

La mayoría de los experimentos en que se evalúan antígenos como candidatos a vacunas se han realizado bajo condiciones experimentales. Y aunque estos experimentos no reflejan las condiciones presentadas en la infección natural del parásito, resulta un método efectivo para seleccionar antígenos y evaluar su capacidad protectora para el desarrollo de una vacuna. Como consecuencia de los altos costos y la dificultad en el manejo de los cerdos naturalmente expuestos, hay pocos ensayos de vacunas realizados en el campo (*Molinari et al., 1997; Huerta et al., 2000*). Sin embargo, para seleccionar antígenos candidatos como vacuna es indispensable su evaluación en el campo para determinar su capacidad protectora en condiciones reales (heterogeneidad genética, con cerdos mal alimentados, expuestos a múltiples retos, con un bajo nivel inmunológico, etc.).

Como una alternativa ante los problemas técnicos y de costos implicados al trabajar con cerdos y cisticercos o extractos de *T. solium*, se planteó la utilización del modelo murino de cisticercosis producida por *T. crassiceps* que permite explorar experimentos que serían difíciles de realizar en cerdos, así también el estudio de la relación huésped-parásito, este modelo permite conocer fenómenos que posiblemente puedan extrapolarse a la cisticercosis porcina.

Los cisticercos de *T. crassiceps* se reproducen asexualmente por gemación (experimentalmente) facilitando su estudio, ya que los cisticercos pueden ser mantenidos en el laboratorio mediante infección y permite recuperar hasta gramos de antígeno por ratón en pocos meses de infección. La infección experimental murina con *T. crassiceps* ha demostrado ser una fuente de antígenos de reacción cruzada con *T. solium*, útiles en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana (*Larralde et al., 1989*). Y es también útil para evaluar vacunas candidatas contra la cisticercosis porcina producida por *T. solium* (*Manoutcharian et al., 1995*). Además, la cisticercosis murina permite conocer el papel de los factores biológicos implicados en la susceptibilidad del huésped, evaluar el papel del fondo genético en las infecciones, estudiar la modulación de los mecanismos inmunes celular y humoral, la naturaleza de las

células inflamatorias e inmunocompetentes, así como examinar los cambios endocrinológicos que ocurren en el huésped durante la infección.

Muchas preparaciones antigénicas de diferentes estadios y de diferentes céstodos han sido utilizadas en el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis. Entre estas preparaciones antigénicas, los antígenos de cisticercosis de *T. crassiceps* han demostrado ser capaces de proteger a ratones contra infecciones experimentales por *T. crassiceps*, así como en cerdos parasitados con cisticercos de *T. solium* (Manoutcharian et al., 1995).

La búsqueda e identificación de los antígenos componentes de la vacuna actualmente disponible implicó diferentes etapas. Al comienzo se evaluaron los antígenos totales del cisticerco de *T. crassiceps* encontrándose que la protección era parcial en contra de la cisticercosis porcina y que la capacidad protectora dependía directamente de la dosis de antígeno utilizada, pudiéndose inducir hasta la facilitación de la parasitosis a dosis altas (Sciutto, et al., 1995).

Posteriormente, del conjunto de antígenos totales se identificaron aquellos antígenos protectores presentes en el extracto (Manoutcharian, et al., 1996). Con este objetivo, se obtuvieron fracciones antigénicas a partir de los antígenos totales de cisticercos de *T. crassiceps*. De las fracciones antigénicas aisladas se seleccionaron aquellas que indujeron los mayores niveles de protección a dosis bajas y altas confirmando su capacidad protectora tanto en la cisticercosis murina como porcina (Valdez, et al., 1994; Manoutcharian et al., 1995).

Con el objetivo de disponer de cantidades suficientes de estas fracciones para aplicarse como vacuna en forma masiva, se decidió producir antígenos recombinantes. A partir de ARNm aislado de cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF se construyó una biblioteca de ADNc en el fago λ ZAP. De este experimento se obtuvieron 3 clonas recombinantes que fueron fuertemente reconocidas por sueros de

cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*. Estos antígenos se evaluaron en el modelo de cisticercosis murina encontrándose diferentes niveles de protección con distintas clonas utilizadas (Manoutcharian, et al., 1996). Los antígenos identificados se denominaron KETc1, KETc7 y KETc12.

Posteriormente se identificaron las regiones antigénicas protectoras en los antígenos recombinantes de las clonas KETc1, KETc7 y KETc12. A partir de este trabajo se mostró principal interés en el antígeno KETc7, debido a su tamaño (~100 aminoácidos) y a su capacidad protectora. La capacidad protectora de KETc7 se ha confirmado por procedimientos de inmunización y por vacunación con ADN (Rosas, et al., 1998; Cruz, et al., 2000). Basados en la secuencia de KETc7 se realizó una predicción teórica de las regiones de mayor antigenicidad y se identificaron varias secuencias peptídicas en forma lineal con potencial interés, llamados GK1, GK2 y GK3 (Gevorkian, G. et al., 1996).

De estos tres péptidos, solo GK1 (péptido de 17 aminoácidos) indujo la reducción de la carga parasitaria de cisticercos de *T. crassiceps* del 57 al 70% en ratones BALB/cAnN, obteniéndose una inmunidad esterilizante en el 60% de los animales vacunados. Al estudiar las propiedades de GK1, se demostró que contiene al menos un epítipo de células B, al presentar la habilidad de inducir anticuerpos contra el péptido y el antígeno total (AgT) de *T. crassiceps* sin necesidad de una proteína acarreadora. En este mismo trabajo, se observó que GK1 también contiene al menos un epítipo de células T, que estimuló la proliferación de células CD8⁺ y en menor proporción las células CD4⁺ estimuladas con el péptido o AgT de *T. crassiceps*. Al evaluar los niveles de citocinas se encontraron altos niveles de INF- γ e IL-4. La estimulación de estas citocinas por GK1 indica la capacidad de este péptido para inducir una respuesta inflamatoria (Toledo, A. et al., 1999).

Por otra parte, en la búsqueda de nuevas moléculas inmunogénicas y protectoras contra la cisticercosis, se construyó una molécula en la cual, se expresaron en las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) el epítipo PT1 (epítipo derivado del antígeno KETc7) en el dominio variable

de la cadena pesada (VH) de inmunoglobulina humana expresada en el fago M13. Esta construcción estimuló específicamente la respuesta inmune celular y confirió protección, aun sin el uso de adyuvante, contra la infección por *T. crassiceps* en ratones BALB/cAnN. (Manoutcharian *et al.*, 1999).

Sin embargo, se continuó con la identificación de epítomos adicionales para aumentar la capacidad protectora de la posible vacuna y disminuir las diferencias antigénicas entre los parásitos. Siguiendo estos objetivos se analizaron las secuencias de los antígenos KETc1 y KETc12 basándose en el método de predicción de epítomos (Hoop and Woods, 1983) encontrando dos péptidos los cuales se denominaron KETc1 (12 aminoácidos) y KETc12 (8 aminoácidos). La inmunización con KETc1 indujo del 66.7% al 100% de protección contra la cisticercosis murina y la inmunización con KETc12 indujo protección del 52.7 al 88.1%. La respuesta inmune producida indica que ambos péptidos, aunque en niveles muy bajos indujeron anticuerpos contra los péptidos. Tanto KETc1 como KETc12 presentaron capacidad de estimular la proliferación de células estimuladas con el péptido o el antígeno total de *T. crassiceps*. (Toledo, A. *et al.*, 2001).

Mediante citometría de flujo se observó que había un incremento de células CD4⁺ y CD8⁺, pero en mayor proporción células CD8⁺ al ser estimuladas con KETc1 o KETc12 *in vitro*. Las citocinas producidas en los ensayos de proliferación fueron de tipo inflamatorias como el IFN- γ e IL-2, también se observó el incremento en los niveles de IL-4 e IL-10 pero en menor magnitud, siendo una respuesta tipo Th1 la implicada en la protección (Toledo, A. *et al.*, 2001).

Debido a la escasez y las dificultades técnicas que se presentan para la purificación de los antígenos de las distintas especies de *Taenias*, se han hecho intentos para aislar y producir antígenos recombinantes (Hubert, K., *et al* 1999; Hancock, K., *et al* 2003; Cheng, J., *et al.*, 1999). Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de los antígenos KETc1, KETc7, KETc12 y GK1, al inducir altos niveles de protección contra cisticercosis porcina han llevado a la necesidad de optimizar la producción de estos

antígenos a gran escala así como aumentar su capacidad inmunogénica. De esta forma, se planteó el uso de una estrategia alternativa para resolver las dificultades que presenta el desarrollo de un inmunodiagnóstico y de una vacuna contra la cisticercosis.

2.3 PHAGE DISPLAY

La búsqueda e identificación de moléculas de interés biológico ha tenido gran avance desde la aparición de la tecnología llamada Phage Display.

El método de expresar péptidos en fagos fue descrito por primera vez por Smith en 1985 y desde entonces ha sido usada en diversos estudios. Phage Display consiste en la expresión de péptidos o proteínas, fusionadas a algunas de las proteínas de la cubierta de fagos filamentosos (Ff), mientras que el ADN del fago contiene el gen que codifica para esta proteína o péptido (*Scott, J. et al., 1990*). Tal fusión aunada a la relativa sencillez de la manipulación *in vitro* e *in vivo* de los fagos, permite la generación de moléculas ligando, con altas afinidades de unión, desplegadas en los fagos en relativamente poco tiempo (2 a 3 semanas) y que son obtenidas por varios pasos de selección (*Smith, G. et al., 1993*). El Ff más usado es el M13, pero se han utilizado otros fagos, como el fago λ .

El fago M13 tiene forma de filamento flexible con un diámetro aproximado de 6.5 nm y una longitud de aproximadamente 900 nm. Su genoma es de ADN circular de cadena sencilla y mide aproximadamente 6.4 kb, codifica para 11 diferentes proteínas las cuales están implicadas en la replicación, morfogénesis y formación de la cápside viral. Su cubierta es de 1.5 a 2 nm de grueso y su peso aproximado es entre 1.2 y 1.4 X10⁷ Da. La masa total de la partícula de fago se constituye en un 87% de proteína (*Marvin et al., 1998*). (**Figura 3**).

El ciclo de replicación del fago comienza cuando el virus infecta a las bacterias *E. coli*. La infección se lleva a cabo por medio del reconocimiento del *pilli* de las células macho (F^+) mediante el dominio N-terminal de la proteína III (pIII). Después de la retracción del *pilli* y la penetración del genoma viral a través de la membrana bacteriana, la bacteria replica y traduce su genoma así como el del fago. El ensamblaje de los fagos toma lugar en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV.

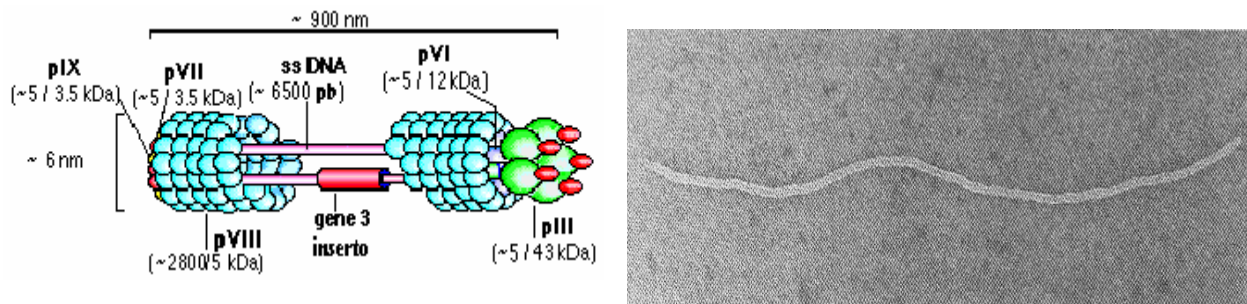


Figura 3. Esquema que muestra la estructura detallada del fago filamentososo M13. La proteína o péptido está representada sobre la superficie del virus como una fusión a la proteína pIII. Micrografía electrónica.

Durante el proceso de infección productiva de los Ff, a diferencia de los fagos líticos, no lisan a sus hospederos. Esto representa una gran ventaja, ya que facilita los procesos de obtención y purificación de las partículas virales. Se sabe que hay una generación de cerca de 1000 partículas de fagos producidas durante la primera generación después de la infección, y cerca de 100 a 300 fagos son producidos durante cada una de las siguientes generaciones. Este proceso se repite durante varias generaciones, resultando en títulos de 10^{11} hasta 10^{13} fagos por ml de medio de cultivo (Russel, M., et al., 1994).

Phage Display incluye una técnica de selección *in vitro* llamada “biopanning” o bioselección. Mediante esta técnica es posible una rápida identificación de ligandos para distintos blancos (anticuerpos, enzimas, receptores de superficie celular, etc.). La bioselección se lleva a cabo al incubar una biblioteca de fagos en una placa cubierta con una molécula blanco, se lava para eliminar los fagos que no se unen y se eluyen los fagos que se unieron específicamente (Scott et al., 1990). El fago eluido es amplificado en bacterias *E. coli* y posteriormente se llevan a cabo varios ciclos o rondas adicionales de

unión/amplificación para enriquecer el conjunto de fagos en favor de aquellos que expresan los péptidos o proteínas que se unieron con mayor afinidad. Después de 3 o 4 rondas, el inserto de las clonas seleccionadas es caracterizado mediante la secuenciación de su ADN.

La generación de bibliotecas que expresan péptidos al azar, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de ADN genómico o de genes, y de ADNc y su aplicación en el procedimiento de selección ha permitido la rápida identificación de ligandos expresados en fagos y receptores implicados en interacciones proteína-proteína, antígeno-anticuerpo, proteína-ADN, enzima-sustrato y otras interacciones biológicamente importantes (*Wilson, et al., 1998*).

Las proteínas de la cubierta del fago comúnmente usadas para la expresión de péptidos o proteínas son la pIII y la pVIII (*Bhardwaj, et al., 1995*), aunque también se han utilizado las pVI (*Hufton et al., 1999*), la pVII y la pIX (*Makowski, 1993*). Generalmente, la expresión de los péptidos y proteínas en los fagos, se lleva a cabo como fusiones N-terminal en las proteínas de la cubierta del fago. Los péptidos fusionados a pIII son de 6 hasta 38 aminoácidos de longitud. Las fusiones a pVIII son más restringidas y expresan péptidos de 6-8 aminoácidos de longitud (*Kay, 1996*). La pIII expresa de 3-5 copias en el extremo del virión mientras que de la pVIII son aproximadamente 2700 copias.

Debido a que el ADN puede ser clonado en el gen codificante de alguna proteína de la cubierta en el genoma del fago, pueden existir problemas técnicos; así la infectividad del fago puede ser afectada si grandes insertos están presentes en todas las copias de pIII, o inestabilidad del fago si grandes proteínas son expresadas en pVIII, para evitar esto, se utilizan los fagémidos y los fagos que se producen son fagos híbridos (*Barbas, et al., 2001*). Estos fagos expresan sobre su superficie proteínas silvestres y proteínas fusionadas (hasta una proteína en pIII y 10-30% de las proteínas de pVIII). Los fagos híbridos pueden también ser obtenidos al usar genomas de fagos modificados que contengan dos copias del gen codificante

de la proteína de la cubierta, uno proporcionando la proteína silvestre y el otro la proteína modificada. Esto elimina la necesidad de fago helper. (Smith and Petrenko, 1997).

En un sistema híbrido, la expresión de una fusión a pIII comúnmente resulta en menos de una copia por partícula de fago. En la expresión de pVIII, la expresión multivalente y el número de proteínas fusionadas varían, y depende de diferentes factores, tales como el tamaño, el plegamiento y la composición de los aminoácidos de los insertos. La expresión monovalente puede ser ventajosa cuando una biblioteca de péptidos es seleccionada contra un ligando y se buscan las interacciones más fuertes. La expresión multivalente puede resultar en la selección de interacciones de baja afinidad. Cuando se lleva a cabo un biopanning de bibliotecas expresadas en fagos, se observan distintas interacciones débiles y fuertes, entonces la expresión multivalente debe resultar en una selección más eficiente. Sin embargo, puede incrementarse el riesgo de seleccionar un amplio fondo de interacciones débiles. Varios reportes de biopanning con bibliotecas de ADN genómico expresadas en la pIII no dieron más de un 10-20 % de clonas positivas, mientras la expresión en pVIII resultó en casi 100 % de clonas positivas (*Jacobsson, et al., 1996*).

Entre las principales ventajas de Phage Display sobre otras tecnologías de mapeo de epítomos es la capacidad de trabajar con un gran número de péptidos a la vez (complejidad de 10^{10}) y llevando a cabo rondas de selección pueden seleccionarse las clonas con más alta afinidad.

Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos incluyen un gran número de péptidos de longitud determinada cuyas secuencias han sido generadas al azar, es decir, clonando oligos sintéticos de longitud determinada pero con codones inespecíficos con el fin de variar los residuos de aminoácidos de cada posición (*Smith et al., 1993*). Los péptidos de las bibliotecas están fusionados a la región N-terminal de cualquiera de las proteínas de la cápside del fago. Generalmente, el tamaño de los péptidos es pequeño y pueden ir desde 6 hasta 38 aminoácidos. Respecto a su estructura, los péptidos

expresados sobre la superficie de los fagos presentan conformación lineal, pero también existen aquellos cuyos péptidos forman estructuras secundarias tales como asas o *loops* (péptidos cíclicos) (*Smith et al., 1993*) mediante puentes disulfuro formados por residuos de cisteínas y α -hélice (*O'Neil et al., 1992*).

Las bibliotecas de péptidos han surgido recientemente como una estrategia alternativa de investigación con numerosas aplicaciones, incluyendo el mapeo de epítomos lineales o conformacionales (*Zhang et al., 1997; Gevorkian et al., 1998; Manoutcharian et al., 1999; Cortese et al., 1996; Germaschewsk et al., 1996; Iñiguez et al., 1998; Ferrer et al., 1999; Dybwad et al., 1995*) o mimótopos (*Boots et al., 1997; Felici et al., 1993*), incluso de origen no peptídico, con capacidad de generar anticuerpos neutralizantes (*Dybwad et al., 1995*); para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de vacunas (*Delmastro et al., 1997; Keller et al., 1993*). Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos también se han usado para la identificación de sustratos para enzimas (*Dente et al., 1997*), para la identificación de nuevos péptidos bioactivos contra receptores de superficie celular (*Wrighton et al., 1996; Cwirla et al., 1996; Balass et al., 1993*), así como para dilucidar algunos mecanismos moleculares de infecciones y enfermedades.

Las bibliotecas de ADN genómico o de ADNc consisten en la clonación y expresión de fragmentos de ADN o bien de ADNc que codifiquen para proteínas completas o solo dominios de éstas. La expresión de ADN genómico derivadas de patógenos han llegado a ser fuentes importantes para la identificación de genes codificantes para proteínas u otros dominios implicados en patogénesis e interacciones huésped-parásito y para aislar antígenos con propiedades diagnósticas o de vacuna. Las bibliotecas de ADN genómico fueron exitosamente usadas para aislar dominios/proteínas de ligandos de receptores procarióticos (*Palzkill, T. et al., 1996; Jonsson, K, et al., 1998; Williams, R.J et al., 2002; Hartvedt, K. et al., 2002*), así como para identificar antígenos de organismos más complejos como *Saccharomyces cerevisiae* (*Hartvedt, K et al., 2003*) y *Toxoplasma gondii* (*Robben, J. et al., 2003*).

Debido a que las proteínas median esencialmente todos los procesos biológicos a través de interacciones con otras proteínas o moléculas no-proteicas, la identificación de los genes codificantes para estas moléculas de bibliotecas que expresen ADNc es un importante paso al entendimiento de los mecanismos implicados en la patogénesis de muchas enfermedades. Con las bibliotecas que expresan ADNc en fagos se han expresado dominios funcionales de proteínas como enzimas, hormonas y moléculas de unión a ADN, ARN u otro ligando (*Manoutcharian et al., 2001; Rhyner et al., 2002; Benhar 2001*). La mayoría de estos sistemas fusionan directamente los polipéptidos al N-terminal de las proteínas de la cubierta del fago pIII o pVIII. Sin embargo, estos sistemas de expresión no son adecuados para la expresión de bibliotecas de ADNc debido a los codones de *stop* en la porción 3' no traducida de los ADNc (*Rhyner et al., 2002*). Una nueva estrategia para clonar ADNc consiste en la eliminación de las secuencias de ADN no codificantes de la región 3' (*Robles et al., 2005*).

Los anticuerpos son componentes importantes del sistema inmune y su aplicación en la medicina tiene muchas décadas de historia. Durante la pasada década bibliotecas que expresaban fragmentos de anticuerpos (Fab y scFv) han sido construidas usando diversos vectores de expresión en fagos y fagémidos, la amplificación por PCR y la clonación de los genes de Ig (*Manoutcharian et al., 2001*). Hay tres principales tipos de bibliotecas de anticuerpos: las inmunes, las no inmunes y las sintéticas, dependiendo de la fuente de los genes de Ig de región variable (VH y VL) usadas para la construcción de las bibliotecas. Con la aplicación de las bibliotecas de anticuerpos se pueden identificar sitios específicos de pegado para terapia y diagnóstico humano, receptores agonistas y antagonistas e inhibición de enzimas, así como marcadores específicos de células y tejidos (*Smother et al., 2002*).

En años recientes, una nueva aplicación de los fagos como vehículos para enviar vacunas ha sido reportada. Los fagos filamentosos que expresan péptidos inmunogénicos como fusiones en las proteínas de la cubierta han sido aislados de bibliotecas de fagos y usadas para producir una respuesta inmune contra los péptidos recombinantes. Las características inmunogénicas de los fagos expresando péptidos o

proteínas de interés han sido extensamente estudiados en ratones y conejos (*De la Cruz, et al., 1988; Manoutcharian, et al., 2001*). Además, se ha demostrado que los fagos fueron altamente inmunogénicos y fueron capaces de inducir anticuerpos antígeno-específicos sin requerir adyuvante (*Demangel et al., 1996; Willis, et al., 1993; Meola, et al., 1995*), debido a la habilidad de los fagos para reclutar células T cooperadoras. También se ha demostrado la inducción de linfocitos T citotóxicos (*Manoutcharian, et al., 1999*). Recientemente, se ha reportado la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos en ratones inmunizados con fagos que expresaban epítomos de linfocitos T citotóxicos (*De Berardinis, et al., 2000*). Los fagos han sido utilizados como inmunógenos para conferir protección mediada por anticuerpos en ratones contra el Virus Sincicial Respiratorio de humanos (VSR) (*Bastien, et al., 1997*); HSV-2 (*Grabowska, et al., 2000*); y contra la infección por estreptococo (*Magliani, et al., 1998*). A pesar de los resultados demostrados sobre el fuerte potencial inmunogénico de los fagos, existen pocos estudios describiendo la aplicación de los fagos como vacunas.

El poder de esta tecnología permitirá procedimientos biológicos o moleculares los cuales son difíciles o imposibles de realizar por otras técnicas: rápido y fácil aislamiento de péptidos o proteínas relacionadas con la enfermedad o el patógeno, o de anticuerpos monoclonales usando enormes repertorios de péptidos y anticuerpos expresados sobre fagos; identificación de moléculas implicadas en importantes interacciones básicas de ligando-receptor, proteína-proteína, ADN-proteína, sustrato-enzima, etc.; y la generación de fagos capaces de unirse específicamente, entrar y transducirse en células de mamíferos. La incorporación de Phage Display hacia las aplicaciones funcionales de la proteómica y la genómica seguramente resultará en nuevos conceptos y estrategias en el campo de la investigación biomédica y la biotecnología farmacéutica.

3. Objetivo General

Expresar y seleccionar antígenos de *T. solium* y *T. crassiceps* sobre la superficie de fagos que permitan caracterizar la especificidad de anticuerpos contra estos parásitos y/o determinar su capacidad protectora contra la cisticercosis porcina.

Objetivos Particulares

- ◆ Construir una biblioteca de ADN genómico de cisticercos de *T. solium* expresada en fago M13.
- ◆ Evaluar la capacidad de las clonas seleccionadas de la biblioteca para reconocer específicamente anticuerpos en muestras de LCR y de plasmas de pacientes con NCC.
- ◆ Expresar los antígenos KETc1, GK1, KETc7 y KETc12 en fagos filamentosos.
- ◆ Caracterizar la respuesta inmune y la capacidad protectora producida por las construcciones en los cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material Humano

El material humano incluido en este estudio fue obtenido de pacientes atendidos en el Instituto de Nacional de Neurología y Neurocirugía México. Los pacientes fueron seleccionados mediante resonancia magnética y tomografía computarizada para diagnosticar la NCC. Un total de 35 muestras de LCR y 25 muestras de plasma de pacientes con NCC fueron evaluadas. Todas las muestras fueron positivas en ELISA con antígeno total de *T. solium* (AgTs). Como controles negativos se utilizaron muestras de LCR de pacientes con encefalitis y las muestras de plasma de siete individuos sanos.

4.2 Construcción de una biblioteca genómica de cisticercos de *T. solium*.

Para la construcción de la biblioteca, el ADN genómico de cisticercos de *T. solium* fue aislado de muestras de 10 a 30 mg de cisticercos obtenidos de carne de cerdos parasitados, utilizando el Kit Genomic Prep.TM Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Pharmacia Biotech).

La biblioteca fue construida como describe Jacobson *et al.* (2003) con pequeñas modificaciones. El ADN genómico [10 µg] fue sonificado cinco veces por intervalos de 20 segundos a máxima intensidad con un sonicador Aquasonic 50T (VWR Scientific Products). Los fragmentos obtenidos variaron en tamaño entre 100-600 pb. Posteriormente, se llenaron los extremos usando la T4 DNA polimerasa. El ADN genómico se purificó por columna usando el Kit Column (GFX). Por otra parte, el vector fagémido pG8SAET (donado por Lars Frykberg, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala) fue digerido con la enzima de restricción *Sna*BI y defosforilado con fosfatasa alcalina de intestino de cabra (CIAP, Amersham Pharmacia Biotech) para evitar su recircularización.

Se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando el ADN genómico fragmentado de *T. solium* [5 µg] y el vector digerido [2 µg]. Posteriormente, el producto de la ligación fue purificado mediante columna (Kit GFX) y después electroporado en 50 µl de bacterias *E. coli* TG1 usando el electroporador Gene Pulser II System (2.5 kV, 25 µF, 400Ω) (Bio-Rad, Labs, Hercules, CA, USA) en cubetas de 1 mm. Se realizaron las electroporaciones, se utilizó 1 ml de medio SOC por cada reacción y se juntaron en un tubo de 50 ml, incubándose a 37°C por 1 hr sin agitación. Se tomaron alícuotas del cultivo para determinar el número de transformantes al plaquear sobre agar LB/amp y alícuotas de las células transformadas más glicerol para congelarlas a -70°C. Después se agregó ampicilina [100 µg/ml] al cultivo de células y fue incubado por 2 hr a 37°C sin agitación. Posteriormente, el cultivo de bacterias se llevó a un volumen de 50 ml con medio 2xYT. Una muestra de 10 ml del cultivo fue rescatada con fago helper M13KO7 (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por una hora, del cultivo restante se purificó ADN que se guardó a -20°C. Después se le agregaron 40 ml de medio 2xYT, ampicilina [100 µg/ml], kanamicina [50 µg/ml] y se incubó toda la noche a 37 °C.

Los fagos recombinantes fueron purificados por doble precipitación usando PEG/NaCl (polietilenglicol-8000 20%; 2.5 M NaCl) y resuspendidos en 200 µl de Tris-buffered saline (TBS). Para determinar el título de la biblioteca de fagos, células *E. coli* TG1 fueron infectadas con los fagos como describe Manoutcharian, et al., 2003.

4.3 Selección de la biblioteca genómica de *T. solium* contra suero de ratón hiperinmune anti-*T. crassiceps*.

Ratones hembra BALB/cAnN de seis semanas de edad, fueron inmunizadas con el antígeno total de *T. crassiceps* (AgTc) como describe previamente Manoutcharian et al., 1996. Los sueros hiperinmunes de tres ratones fueron mezclados. Se evaluó mediante ELISA la detección de anticuerpos anti-AgTs y se utilizó la dilución 1:200. La bioselección de la biblioteca genómica se llevó a cabo en placas de ELISA

(Nunc Maxisorp) que fueron cubiertas con el anticuerpo anti-IgG de ratón (gamma) (0.5 µg/pozo) (Zymed, South San Francisco, CA, USA) e incubadas una hora a 37°C. Después se lavaron las placas con buffer de fosfato salino (PBS), los pozos fueron bloqueados con PBS/BSA 2.0%, y las placas fueron incubadas por una hora a 37°C. Los pozos se lavaron con PBS, y fueron agregados 100 µl del pool de sueros de los ratones inmunizados y se incubó por una hora a 37°C. Se lavaron los pozos otra vez y 10¹¹ fagos/ml fueron agregados para reaccionar con los anticuerpos inmovilizados por 4 horas a 4°C. Los pozos se lavaron con PBS-Tween frío y los fagos unidos fueron eluidos con 100 µl/pozo de 100 mM trietilamina. Los eluidos fueron neutralizados con 200 µl de Tris-HCl (pH 7.4).

Los fagos eluidos fueron amplificados en células *E. coli* TG1 y se rescató (como se describió previamente) la biblioteca de fagémidos usando el fago helper M13KO7. Se realizaron dos rondas de bioselección.

4.4 ELISA-screening de clonas de la biblioteca genómica de cisticercos de *T. solium*

Después de plaquear los fagos, se picaron colonias resistentes a carbenicilina para inocular placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Corning, NY, USA) que contenían 150 µl de 2YT-carb (*Manoutcharian et al., 2003*). Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C con agitación. El fago helper (M13KO7) fue agregado a cada pozo e incubado por 30 minutos a 37°C con agitación y 30 minutos sin agitación. Las placas fueron centrifugadas a 4000 rpm y los sobrenadantes fueron removidos con el exceso del helper. Las células fueron resuspendidas en 150 µl de 2YT-Carb-Kan y crecidas toda la noche a 37°C con agitación. Las placas fueron centrifugadas a 4000 rpm para precipitar las células y los sobrenadantes con fago fueron removidos para sensibilizar placas de ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark). Después de 1 h a 37°C, las placas fueron lavadas con PBS-BSA-Tween 20, y bloqueadas con PBS-BSA 2% por 1 h a 37°C. Las placas fueron lavadas y el suero de ratón anti-*T. crassiceps* y el suero de ratón inmunizado con

TBS fueron agregados, y las placas fueron incubadas por 1 h a 37°C. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS-BSA 1% y las placas fueron incubadas por 1h a 37°C. Las placas fueron nuevamente lavadas y fue agregado el sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed Laboratories Inc, Sn. Fco. California, USA). La absorbancia fue medida a 405 nm utilizando un lector de ELISA Opsy MR Microplate Reader (Dynex Technologies).

Para analizar las clonas seleccionadas se aislaron 10 clonas mediante doble digestión utilizando las enzimas NcoI/BamHI.

4.5 Detección de anticuerpos específicos anti-*T. solium* mediante ELISA

Para detectar anticuerpos específicos capturados por los fagos presentes en las muestras de LCRs o plasmas. Se agregaron 10^{10} fagos en 100 μ l de PBS (pH 7.4) por pozo en las placas (Nunc Maxisorp) y se incubaron por 1 h a 37°C. Después las placas fueron lavadas y bloqueadas con PBS-BSA 2%. Se lavaron las placas y se agregaron los LCRs o los plasmas de los pacientes con NCC y los LCRs de los pacientes con encefalitis y los plasmas de individuos sanos, como controles negativos. Las muestras fueron diluidas en PBS-BSA-Tween (LCRs 1:40 y plasmas 1:1000), e incubadas toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas y se agregó el anticuerpo de cabra anti-IgG humano (H+L) acoplado a peroxidasa (1:5000), y las placas fueron incubadas a 37°C. Las placas fueron lavadas y se agregó 100 μ l del sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed). La absorbancia fue medida a 405 nm utilizando un lector de ELISA Opsy MR Microplate Reader (Dynex Technologies). También se determinaron los subtipos de inmunoglobulinas predominantes en las muestras de plasmas de pacientes con NCC utilizando las clonas de fagos y los anticuerpos anti- IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 e IgE acoplados a peroxidasa (Zymed, CA). Todas las muestras se evaluaron por duplicado y los datos reportados son representativos de tres experimentos independientes. De igual forma, las muestras de los pacientes con NCC fueron evaluadas utilizando AgTc (1 μ g/pozo) y las ELISAs se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

4.6 Secuenciación del ADN de los fagos y análisis de similitud de secuencias.

De las clonas reactivas con las muestras de LCR y plasmas en los ensayos de ELISA, se purificó ADN de doble cadena y se usaron los oligos basados en el vector pG8SAET 5'(GGAAAAACATTTATTCAATTCGTAAACTAG) y 3'(GGTTTATCAGCTTGCTTTCGAGGTGAATTC). Las secuencias de ADN de los insertos de las clonas fueron determinadas mediante el analizador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). Las secuencias de ADN y de aminoácidos de los insertos de las clonas aisladas fueron analizadas utilizando las bases de datos ExPASy Molecular Biology y BLAST y fueron enviadas a la base de datos GenBank.

4.7 Construcción de los fagos recombinantes y secuenciación del ADN de cadena sencilla de los fagos.

La clonación de KETc1 se realizó en el vector M13 KE (New England Biolabs, Beverly, MA) y GK1, KETc7 y KETc12 en el fagémido pF8, los cuales permiten la expresión de los péptidos fusionados a la proteína menor del fago M13 (pIII) o la proteína mayor pVIII, respectivamente.

Para la clonación del fragmento de ADN que codifica para el péptido KETc1 se utilizó el Kit PhD Peptide Display Cloning System (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) y el oligo: 5'ATGTTTCGGCCGACGAACCGATGTAGCCGATGGTGTAGATGGAGCAGAGTGAGAATAGAAAGGT3'. Se realizó una reacción de annealing a 95°C por 20 minutos y lentamente enfriada hasta <37°C, entre el oligo diseñado y un oligo llamado extention primer. Después se llevó a cabo la reacción de extensión usando la enzima DNA polimerasa (Klenow). El siguiente paso fue digerir el producto usando las enzimas de restricción Eag I y Acc 65, para posteriormente ligar este inserto en el vector M13KE.

Para la clonación de los fragmentos de ADN que codifican para los péptidos GK1 y KETc12 se utilizaron los siguientes oligos: **GK1 5'ANGKI**: (5'AATTAGGTTATTACTATCCATCTGATCCAAATACCTTCTACGCTCCACCCTACAGC3') y **3'ANGKI**: (5'GATCGCTGTAGGGTGGAGCGTAGAAGGTATTTGGATCAGATGGATAGTAATAACCT3'), y **NL-12 5'ANI2**: (5'AATTAGGCAACCTCTTATTGAGTTGTTTG 3'), **3'ANI2**: (5'GATCCCAACAACCTCAATAAGAGGTTGCCT 3'). Se realizó una reacción de annealing entre los oligos **5'ANGKI** y **3'ANGKI** y entre los oligos **5'ANI2** y **3'ANI2** a 95°C por 20 minutos y lentamente enfriada hasta <37°C. El siguiente paso fue digerir las reacciones de annealing usando las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI.

Para la clonación de KETc7 se utilizaron los siguientes oligos: **3'K7**: (5'CTCAAGGATCCGCGCCCGCAAGATTCTTCTTATCTTCTGGTTC 3') y **5'K7**: (TCATCGATTCTCGGCCAGCCGGCCGCACGAGCATTTATGCAG 3') introduciendo los sitios de restricción EcoRI y Bam HI en los extremos 5' y 3' de los oligos, respectivamente. Se amplificó por PCR la secuencia que codifica para KETc7 que se encuentra en el vector pTc-sp7 usando la Taq DNA polimerasa y los oligos mencionados. Después se usaron las enzimas de restricción Eco RI y Bam HI para digerir el fragmento de ADN amplificado, para posteriormente ligar este inserto en el vector pF8. Todos los oligos se sintetizaron por GIBCO BRL, MD.

Para las cuatro construcciones, digerimos aproximadamente 10 µg de ADN de los vectores M13 y pF8 con las enzimas de restricción EagI y Acc65, así como Eco RI y Bam HI, respectivamente. Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de ligación, entre los vectores digeridos y los cuatro insertos preparados, utilizando 1 µg de cada muestra de ADN de los insertos y 0.5 µg de ADN de los vectores, utilizando la enzima T4 DNA ligasa. Los productos de la ligación se usaron para transformar células *E. coli* TG-1 por electroporación usando el equipo Gene Pulser II System (BioRad). Posteriormente, se plaquearon las células transformadas sobre placas con LB Agarose Top (construcción en vector de fago, M13) o placas de LB ampicilina en el caso de fagémidos (vector pF8). Las clonas de fagémidos se obtuvieron de las colonias, y las partículas de fago se rescataron infectando las células con el

fago ayudador M13KO7 (Invitrogen). Después, los fagos obtenidos de fagémido y del fago M13 se amplificaron infectando bacterias *E. coli* TG-1 en 50 ml de medio 2xYT y el fago se purificó por doble precipitación con polietilenglicol (PEG) como se describe anteriormente.

Se obtuvo ADN de cadena sencilla (*Sambrook, 1989*) y la secuenciación del ADN de los fagos se realizó mediante el uso del kit “Sequenase versión 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing kit” (Amersham Life Science, OH) y dATP a $-S^{35}$ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la secuenciación en el vector M13KE (NEB) se usó el primer Sequencing Primer -96 gIII y para las construcciones en el vector pF8 se utilizó el primer 5'GACAATGACAACAACCATCGCCACGCATA 3' (Operon).

4.8 Inmunización de los Cerdos

Doce cerdos se mantuvieron libres de cisticercosis en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM, bajo condiciones controladas.

Se organizaron tres grupos de cuatro cerdos cada uno y a los 10 meses de edad (al comenzar los experimentos) fueron usados en el ensayo de inmunización. Los cuatro fagos recombinantes (FKETc1, FETc7, FGK1 y FKETc12) fueron mezclados para obtener la CPhV (Cysticercosis Phage Vaccine) y usada para inmunizar a los cerdos subcutáneamente (sc) u oralmente, dos veces cada 15 días. Un grupo fue inmunizado sc con CPhV usando dosis baja (4×10^{11} fagos/1.5 ml de TBS) y los otros dos grupos con CPhV a dosis alta (4×10^{12} fago) administrado sc u oralmente por pipeta con 1 ml de TBS. Como controles, tres cerdos fueron inmunizados sc con fago M13 a dosis alta (4×10^{12} fago). Adicionalmente cinco cerdos de dos meses de edad (mantenidos por separado de los doce cerdos) se inmunizaron con fago M13 a dosis alta (4×10^{12} fago) sc y usados como controles para el ensayo de reto.

Se obtuvieron muestras de sangre de todos los cerdos de la vena yugular antes y después de cada inmunización (0, 7, 15, 30 y 45 días) para estudiar el curso de la respuesta inmune celular y humoral inducida por la vacuna. Para asegurarnos de la presencia de los fagos en el tracto gastrointestinal de los cerdos infectados oralmente, se aislaron fagos de la heces de los cerdos (a los días 15 y 45) al infectar bacterias TG-1 con 10-50 μ l de TBS conteniendo material fecal fresco después de haberlo mezclado y centrifugado (volumen total de 500 μ l). Los títulos de los fagos, como unidades formadoras de colonia (ufc), se determinaron al plaquear células TG-1 infectadas sobre placas de LB conteniendo ampicilina y la identidad de la construcción se comprobó al secuenciar su ADN.

4.9 Detección de anticuerpos específicos por ELISA

Los niveles de anticuerpos específicos en los sueros inmunes de tres cerdos de cada grupo fueron medidos. Para reducir la unión no específica a los componentes del suero de los cerdos, se enriqueció una fracción de los sueros que se precipitó con sulfato de amonio, se pasaron por cromatografía y se diluyeron en 1 ml de PBS 0.15 M, pH 7.2 antes de evaluar los niveles de anticuerpos mediante ELISA (*García et al., 2001*). Por otra parte, se obtuvo fluido vesicular de *T. solium* (*FvTs*), se obtuvieron cisticercos de músculo esquelético de un cerdo infectado, se colectaron los cisticercos y se congelaron en PBS 1X, pH 7.4. Después, los cisticercos se cortaron y el fluido vesicular fue colectado. El calcio fue removido al agregar 50 μ l de oxalato de amonio (0.3 M) y 25 μ l de amonio (1:3 v/v, en agua) por cada mililitro de fluido vesicular. Se centrifugó (2000 x g, 4 min, a 20°C) y se desechó todo el precipitado. El sobrenadante fue colectado, alicuotado y almacenado en nitrógeno líquido. La concentración final de proteína del fluido procesado fue determinada por el Método de Lowry. El *FvTs* o los péptidos (1 μ g/pozo) fueron usados como antígenos.

Se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos (Nunc) con los antígenos diluidos (FvTs y péptidos) en buffer de carbonatos 0.2M pH 9.6, y se dejó incubar una hora a 37°C (cada suero fue probado por duplicado). Los pozos fueron lavados, bloqueados e incubados con 100 µl de inmunoglobulinas purificadas de los sueros diluidos (1:200) de los cerdos en PBS-Tween 0.03%, e incubados una hora a 37°C. Los anticuerpos fueron detectados con 100 µl de un anticuerpo anti-IgG de cerdo diluido 1:1000, acoplado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MI, USA). Se utilizó como sustrato TMB (Sigma). Se detuvo la reacción usando 50 µl de H₂SO₄ 1N por pozo, y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (LP 400, Pasteur Diagnostics, Paris, France).

Para evaluar si los cerdos tenían anticuerpos anti-M13, se llevaron a cabo ELISAs. Las placas se cubrieron toda la noche con una solución con fagos M13 en PBS (10¹⁰/ml). Después se bloqueó con PBS/BSA 3%, los sueros de los cerdos se agregaron (1:100) por duplicado y se incubó 1 h a 37°C. Se utilizó un anticuerpo de ratón anti-IgG de cerdo acoplado a fosfatasa (Zymed, Sn. Fco., CA, USA) usando una dilución 1:1000 y se incubó por 1 h a 37°C. Se utilizó como sustrato *para*-nitrofenilfosfato y la absorbancia se determinó a 405 nm.

4.10 Ensayos de proliferación y cuantificación de citocinas.

Las PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) fueron obtenidas de sangre de cerdos vacunados y controles al tiempo 0 y 30 días después de la segunda inmunización usando gradiente de Ficoll-Hypaque 1.077 (Sigma). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (0.2 mM), aminoácidos no esenciales (0-01 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y FBS (10%). Las células fueron cultivadas con ConA (5 µg/ml), con cada uno de los tres péptidos (10 µg/ml) o con AgTs a 10 µg/ml e incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en placas de cultivo, usando 2 X10⁵ células por 200 µl de volumen final. Después de cinco días, las células

cultivadas fueron pulsadas por más de 20 horas con 1 μCi por pozo de metil- ^3H timidina (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Entonces las células fueron cosechadas y la cantidad de marca incorporada fue cuantificada en un espectrómetro 1205- β (Wallac Oy, 20101 Turku 10, Finlandia). Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos son presentados como índices de estimulación (SI: calculados como las proporciones del promedio de cpm de estimulación del antígeno vs células no estimuladas). Los sobrenadantes de las replicas de los cultivos correspondientes a las muestras de los días 0 y 30 fueron colectados después de 72 horas de la determinación de las citocinas. El IFN- γ y la IL-4 fueron medidos por ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Biosource International, CA). Los valores de absorbancia son reportados como pg/ml.

4.11 Reto de los cerdos con huevos de *T. solium*.

Se obtuvo un espécimen de *T. solium* de un portador humano bajo su consentimiento, de un poblado de Yucatán, México; inmediatamente después del tratamiento con niclosamida (Yomersan, Bayer). Los huevos para el reto fueron colectados como reportó Huerta et al., 2001. Los cerdos que recibieron la vacuna a bajas dosis de forma oral o sc (a los 12 meses de edad) y aquellos que fueron inmunizados con fago M13 (a los 3.5 meses de edad) se mantuvieron por separado y fueron usados como controles, y fueron oralmente infectados con 17, 000 huevos por cerdo, 45 días después de la segunda dosis de la vacuna (Huerta et al., 2001). Dos meses después, el número de cisticercos por cerdo fue determinado mediante necropsia.

5. RESULTADOS

5.1 Generación de la biblioteca de ADN genómico de *T. solium* y bioselección con el suero de ratón hiperinmune.

Para generar la biblioteca genómica de *T. solium*, se aisló ADN genómico y se fragmentó mediante sonicación hasta obtener fragmentos de ADN de 100-600 pb (**Figura 4a**). Estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector fagémido pG8SAET como fusión al 5' del *gVIII* de M13. Se obtuvo la biblioteca genómica con una complejidad de 1.25×10^7 clonas. El rescate y amplificación de la biblioteca resultó en una biblioteca de 10^{13} clonas.

Para aislar clonas que reconocieran específicamente anticuerpos del suero de ratón hiperinmune anti-*T. crassiceps*, se aplicó una estrategia de selección de dos pasos que consistió en bioselección y búsqueda por ELISA. Se utilizaron 4×10^{10} fagos de la biblioteca en la bioselección contra el suero hiperinmune de ratón inmunizado con el AgTc. Después de la primera ronda de bioselección, se eluyeron 6.5×10^5 fagos y en la segunda ronda se obtuvieron 3.7×10^7 fagos, indicando un enriquecimiento de los fagos que reconocieron las moléculas blanco durante la selección. Se picaron 40 clonas al azar después de la primera y segunda ronda de selección y se usaron en un ELISA-screening con un suero de ratón hiperinmune anti-*T. crassiceps*. Se aislaron 22 clonas positivas y se evaluaron diez de estas clonas mediante doble digestión usando las enzimas NcoI/BamHI para demostrar que poseían insertos entre 100 y 600 pb (**Figura 4b**). Posteriormente, tres de las 22 clonas fueron seleccionadas debido a su mayor reactividad en ELISA con muestras de LCR de pacientes con NCC confirmada.

Una de las dos clonas reactivas en ELISA expresaba un péptido de 56 aminoácidos (clona EK 26, número de acceso en GenBank AY699707) y la otra clona EK 5 (número de acceso en GenBank AY699706) expresaba un péptido de 63 aminoácidos. (**Figura 5**).

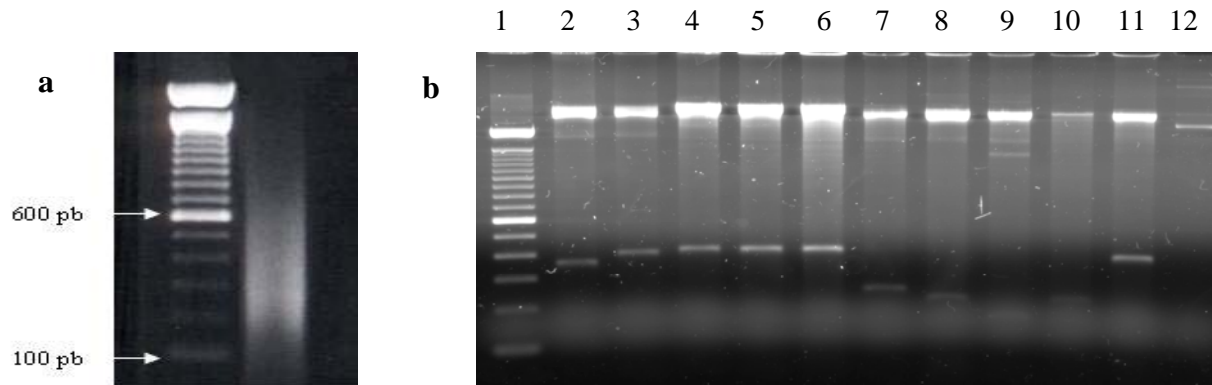


Figura 4. a) Digestión del ADN genómico de *T. solium* mediante sonicación. Gel de agarosa TBE 1X que demuestra que el ADN fragmentado en su mayor parte de 100-600 pb. **b)** Doble digestión (Nco I/Bam HI) de 10 clonas obtenidas al azar que contienen fragmentos de DNA genómico de *T. solium*. Líneas: 1, marcador de peso molecular de 100 pb; 2-11, 10 clonas digeridas con las enzimas Nco I/Bam HI; 12, pG8SAET sin inserto no digerido.

Clona EK 5 (GenBank AY699707) y secuencia de aminoácidos, longitud: 61 aa.
Long de Inserto: 192 pb

CCATGGCAGTAC**CTAAACTAAGTTCAGCAGACGAAGGGGTGCCTACAAGGGTGTTC**
AAGCGCA
TGTGTTCAAACATTGCCTCCAGTGTGGGTGCTGTGCGAAGCATTCTGCACAGCAAACGCATG
GAATTTCAAAGCTGTGGCTGGGCAGTAGATAGGGCATTGAATTTAGTAAGAGTTAATAGGC
CCACACTCACAAAAGTACCCGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGACCCACTGGAACCGCGTGCCTAGGGATCC

1 TKFSRRRGAY KGVSSACVQT LPPVSGAVRS ILHSKRMEFQ SCGWAVDRL NFSKSLIGPH SQK 63

Clona EK 26 (GenBank AY699706) y secuencia de aminoácidos, longitud 56 aa.
Long de Inserto: 165 pb

CCATGGCAGTAC**CCAGTAAAATTCTCTATCAACGAGATGACGTGTACAATTTGATCGTACTGTGCG**
CCAGATAGATGCCTCATTTCATCGAAGTTCTAAACACTACTAGTACTGCTCTATTATTCTCAAGT
CAAAATTTACGTTAGATGATGAGTGCCTACCGTCTACTTTTTCCACAGGTACCCGGTGCGCCGGTG
 CCGTATCCGGACCCACTGGAACCGCGTGCCTAGGGATCC

1 SKILYQRDD VYNLIVLSPD RCLIHRSSKH YQYCSIILKS KFTLDDECLP STFSTG 56

Figura 5. Secuencias de los insertos de las clonas reactivas en ELISA (EK 5 y EK 26). En la figura se muestran las secuencias de los insertos en letras negras de mayor tamaño. También se muestran las secuencias de aminoácidos de ambas clonas.

Es de hacer notar, que para la correcta expresión del marco de lectura abierto, un cambio de -1 en el 3' del inserto de ADN en EK 5 y de +1 para el inserto de EK 26 es requerido. Esto es común, ya que el mismo fenómeno es regularmente observado en estudios donde se ha utilizado el mismo sistema de expresión y el mismo vector empleado en nuestro estudio, posiblemente como resultado de un salto ribosomal (*Jacobsson, et al., 1996; Jacobsson, et al., 2001*). Sin embargo, no se encontró similitud de secuencias entre nuestras clonas y las secuencias publicadas en las bases de datos de GenBank.

5.2 Inmunorreactividad de las clonas con líquidos cefalorraquídeos y plasmas de pacientes con NCC.

Para evaluar las propiedades antigénicas de las clonas aisladas, se llevaron a cabo ensayos de ELISA utilizando 17 LCRs y 22 plasmas de pacientes con NCC confirmados por TC y RM. En la **Figura 7** se muestra, que 9 de 17 (52.9 %) de muestras de LCR con NCC reaccionaron con las clonas EK 5 y EK 26, mientras que solamente 5 y 4 muestras de LCR de pacientes con encefalitis (27.8 % y 22.2 %) fueron reconocidos por EK 5 y EK 26, respectivamente. Las clonas EK 5 y EK 26 reconocieron 36.4 % y 18.2 % de las muestras de plasma de pacientes con NCC, respectivamente; mientras que ambas clonas no reaccionaron con las muestras de plasma de 7 individuos sin NCC (**Figura 6**). El análisis de los datos de ELISA mostraron una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la reactividad contra la clona EK26 y presencia de arachnoiditis, y entre la reactividad entre la clona EK5 y la presencia de hidrocefalia, mientras que la mismas muestras fueron igualmente reconocidas por el AgTs. Así también, la clona EK26 no reconoció preferencialmente los anticuerpos presentes en plasmas de pacientes con NCC con hidrocefalia y la clona EK5 no reconoció los anticuerpos presentes en plasmas de pacientes con NCC con arachnoiditis (**Figura 7**).

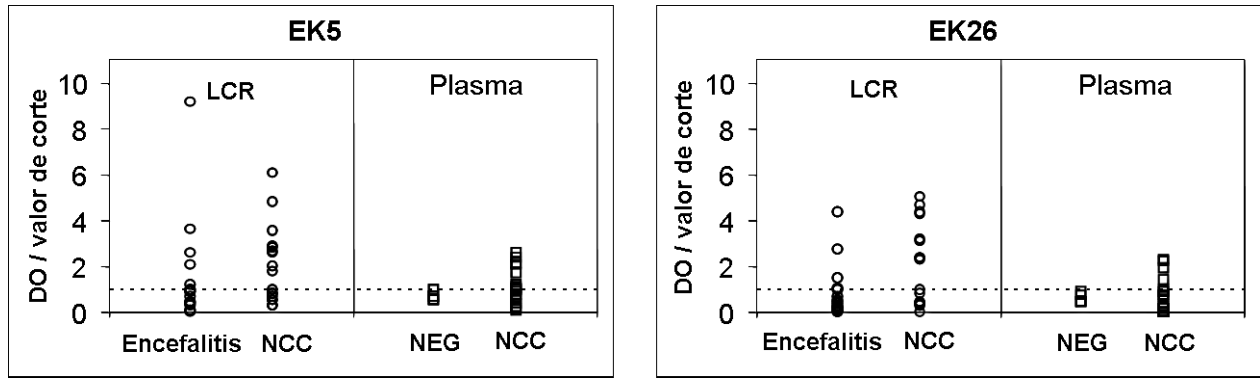


Figura 6. ELISA de los fagos EK5 y EK26 para los anticuerpos presentes en muestras de LCRs de pacientes con NCC y encefalitis y muestras de plasmas de pacientes con NCC y de individuos sin NCC. Cada muestra fue también evaluada contra el fago control M13 y el valor de densidad óptica (DO) final es una diferencia entre las clonas y el control M13. Los valores de corte fueron determinados como el promedio + 2DS de los controles negativos.

Por otra parte, se analizó el subtipo de IgG predominante en las muestras de plasma de pacientes con NCC que fue el IgG1 (datos no mostrados).

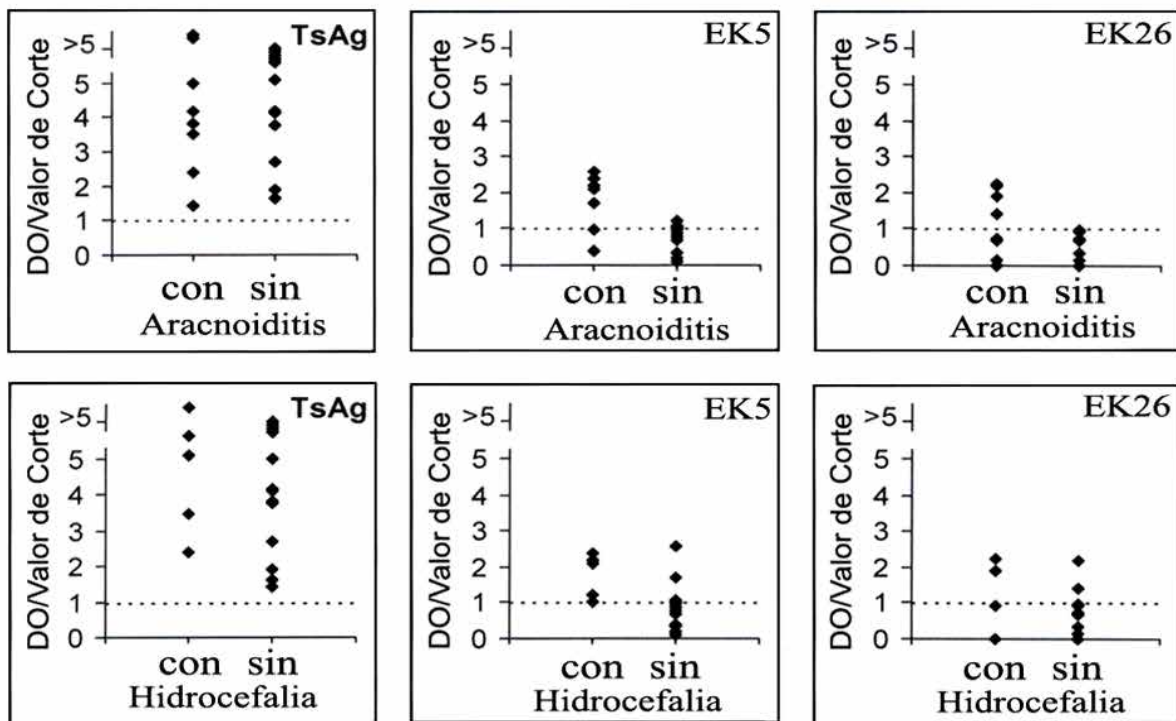


Figura 7. ELISA de las clonas EK5, EK26 y AgTc detectando los anticuerpos de las muestras de plasma de pacientes con NCC, con y sin aracnoiditis (A, B y C) e hidrocefalia (D, E y F). Se observó una correlación entre la unión de la clona EK26 y las muestras de plasmas y la presencia de aracnoiditis y entre la unión de la clona EK5 y la presencia de hidrocefalia ($p=0.006$ y $p=0.002$, respectivamente). Pero no se observó una correlación entre la unión de la clona EK26 y las muestras de plasmas y la presencia de hidrocefalia ni entre la unión de la clona EK5 y la presencia de aracnoiditis ($p=0.226$ y $p=0.093$, respectivamente).

5.3 Construcción de los fagos recombinantes utilizados como componentes de una vacuna (CPhV) anti-cisticercosis porcina.

Para generar los fagos M13 recombinantes que expresan los péptidos KETc1, KETc12, GK1 y KETc7, las secuencias de ADN codificantes correspondientes, fueron clonadas en los vectores de expresión de fago y fagémido. El péptido KETc1 fue expresado en la proteína pIII de la superficie del fago M13 de tres a cinco copias por partícula de fago, mientras los otros antígenos se expresaron como fusiones en la proteína pVIII de la superficie del fago híbrido M13 de 300 a 900 copias por fago. Las clonas fueron purificadas por separado, mezcladas y usadas como una vacuna anti-cisticercosis (CPhV) en diferentes ensayos de inmunización. Por otra parte, para incrementar la representación del péptido KETc1, el fago recombinante FKETc1 fue utilizado en la mezcla de la vacuna en una proporción de 30 veces a 1 con respecto a las otras construcciones.

Las secuencias de los péptidos (KETc1, KETc12, GK1 y KETc7) expresados en los fagos, en el vector M13 o el vector pF8 se muestran a continuación:

KETc1 en el vector M13KE **FKETc1**

1 GCT CCA ATG TCT ACA CCA TGC GCT ACA TCG GTT CGG 36 pb
 1 A P M S T P S A T S V R 12 aa

KETc7 en el vector pF8 **FKETc7**

1 GCA TTT ATG CAG CCG CAT CCT TCC TTC TCT CCA CCG CCA GTT GAT TAT CTG TAC CAG ACA AAC
 1 A F M Q P H P S F S P P P V D Y L Y Q T N

66 TCT CCA CCG CCC TAT GGG GGC GCT GTC CCT CCA CCT TAC GCG CCG AAT CCA GGT CCA CCG CCG
 22 S P P P Y G G A V P P P Y A P N P G P P P

129 CCA TAC ACG GGT GCG GCA AGT TCG ATG CCG CCT TAT CCG ACC GGT GGT CCG CCA CCC GTC AAC
 43 P Y T G A A S S M P P Y P T G G P P P V N

192 ACC GGT TAT TAC TAT CCA TCT GAT CCA AAT ACC TTC TAC GCT CCA CCC TAC AGC CAG GCT TCA
 64 N **G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y S** Q A S

265 GCA CCT CCT ATG GAA CCA GAA GAT AAG AAG AAT CTT TAG 288 pb
 85 A P P M E P E D K K L L 96 aa

GK1 en el vector pF8 **FGK1**

1 GGT TAT TAC TAT CCA TCT GAT CCA AAT ACC TTC TAC GCT CCA CCC TAC AGC 41 pb
 1 G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y S 17 aa

KETc12 en el vector pF8 **FKETc12**

1 GGC AAC CTC TTA TTG AGT TGT TTG 24 pb
 1 G N L L L S C L 8 aa

5.4 Respuesta inmune inducida en cerdos inmunizados con fagos.

Dos grupos de cerdos fueron inmunizados con la vacuna CPhV que contenía 4×10^{12} fagos (dosis alta) en TBS de forma subcutánea (sc) o vía oral, dos veces en intervalos de 15 días. Otro grupo fue inmunizado sc con dosis baja (4×10^{11} fagos) y el grupo control recibió 4×10^{12} fagos de forma sc.

Para evaluar si los fagos que expresaban los antígenos inducían la producción de anticuerpos específicos contra los péptidos así como contra el AgTs, los sueros de los cerdos fueron evaluados para detectar IgG mediante ELISA. No se encontraron anticuerpos específicos contra el AgTs, ni los demás antígenos expresados en las construcciones (datos no mostrados). Los anticuerpos específicos contra los fagos fueron medidos en todos los cerdos para determinar la inmunogenicidad del fago M13 por sí mismo

y se detectaron altos niveles de anticuerpos específicos anti-M13 en todos los cerdos aunque con algunas diferencias (**Tabla 1**).

Tabla 1. Niveles de anticuerpos contra fago M13 en ELISA^a

Días después de la inmunización	Fago M13	Cerdos inmunizados con CPhV		
		Subcutánea		Oral
		Dosis baja	Dosis alta	
0	0.25	0.29	0.37	0.34
7	0.56*	0.58*	1.17*	0.49
15	1.17*	0.47*	1.25*	0.51*
30	1.19*	1.12*	1.17*	1.09*
48	0.89*	1.2*	1.25*	0.65*

^a Grupos de cuatro cerdos, uno inmunizado sc u oralmente con 4×10^{12} de CPhV o sc de M13 y otro inmunizado sc a dosis baja 4×10^{11} fagos de CPhV, dos veces en intervalos de 15 días. Anticuerpos anti-M13 fueron medidos en un pool de sueros de cada grupo de los cerdos inmunizados. Los datos son el promedio \pm 2 desviaciones estándar, cada uno evaluado por duplicado.

* Incremento significativo en la respuesta ($P < 0.05$) comparada con los valores anteriores a la inmunización (prueba t de Student).

Para estudiar la respuesta inmune celular, PBMCs fueron colectadas de los cerdos antes de vacunarse y en diferentes tiempos después de la inmunización y evaluadas en un ensayo de linfoproliferación. El índice de estimulación fue calculado como el promedio de cpm de células estimuladas por el promedio de células control no estimuladas. La proliferación específica de los linfocitos por AgTs y péptidos fue detectada cuando las PBMCs de los cerdos inmunizados con CPhV fueron estimulados por los diferentes antígenos evaluados. No se observó proliferación no específica en cerdos inmunizados únicamente con el fago M13. Los índices de estimulación más altos fueron inducidos con AgTs y péptidos sintéticos y fue observado a los días 15 después del primer refuerzo con CPhV (**Figura 8**). Analizando más a fondo la respuesta inmune producida, se midieron los niveles de IL-4 e IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de PBMCs, tres días después de la estimulación *in vitro*. Se observó un claro incremento en los niveles de INF- γ en los sobrenadantes después de la estimulación específica. El IFN- γ no se detectó en los sobrenadantes de las células obtenidas antes de la inmunización o células de los cerdos controles (**Figura 9**). En los mismos sobrenadantes, se incrementaron los niveles de IL-4 en la

mayoría de los cerdos inmunizados tanto con M13 como con los fagos recombinantes (**Figura 10**). Por lo tanto, estos datos sugieren que la inmunización con CPhV indujo una respuesta inmune tipo Th1/Th2.

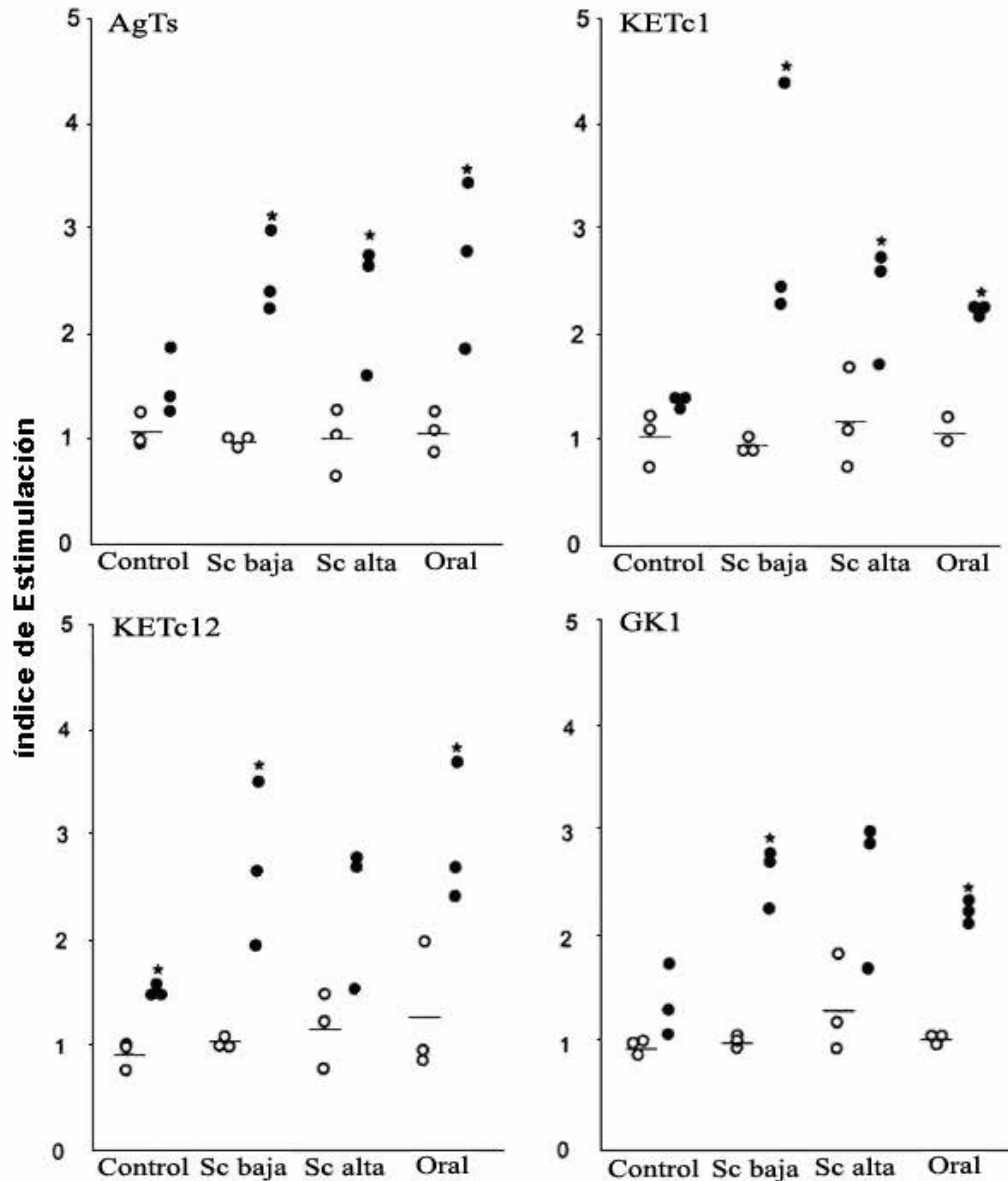


Figura 8. Respuesta proliferativa de PBMC en cerdos controles y vacunados. Dos grupos de cerdos (tres animales cada uno) fueron inmunizados con 4×10^{12} fagos de CPhV sc alto u oralmente, un grupo recibió dosis sc baja (4×10^{11}) de CPhV y los grupos controles recibieron dosis altas de fago M13 (4×10^{12}). Las PBMCs fueron colectadas de cada cerdo antes del estímulo (día 0, círculos blancos) y 15 días después del refuerzo (día 30, círculos negros) y cultivadas 5 días en presencia de AgTs y tres péptidos ($10 \mu\text{g/ml}$). La incorporación de timidina marcada fue medida y los índices de estimulación fueron calculados como las proporciones del promedio de cpm de estimulación del antígeno vs células no estimuladas. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado. Las barras indican los valores de corte de cpm de los cerdos antes de la vacunación (día 0).

* $P \leq 0.05$ en relación al índice antes de la inmunización.

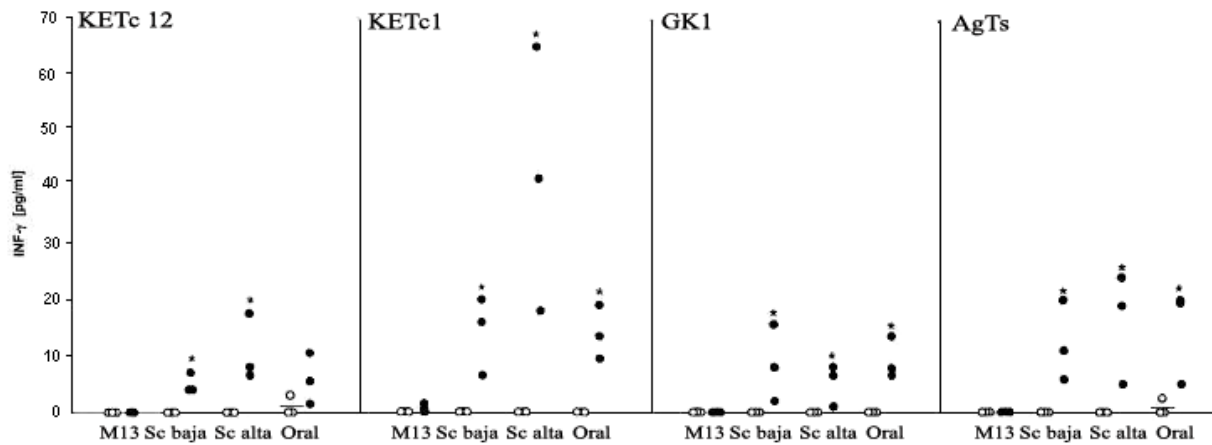


Figura 9. Detección de IFN- γ en cultivos de PBMCs. Los niveles de IFN- γ fueron medidos en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs colectados de cada cerdo antes del primer estímulo (día 0, círculos blancos) y 15 días después del refuerzo (día 30 círculos negros). Las células fueron cultivadas en presencia de AgTs y tres péptidos (10 μ g/ml). Los grupos y los símbolos corresponden a los descritos en la Figura 8. Las barras indican los valores de corte de IL-4 antes de la vacunación (día 0). * $P \leq 0.05$ en relación a los niveles de IFN- γ antes de la inmunización.

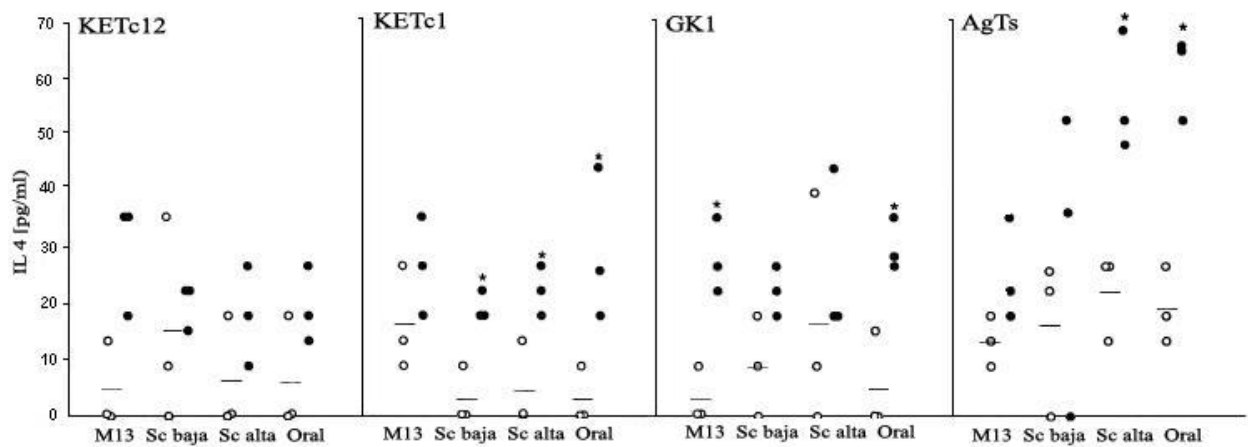


Figura 10. Detección de IL-4 en cultivos de PBMCs. Los niveles de IL-4 fueron medidos en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs colectadas de cada cerdo antes del primer estímulo (día 0, círculos blancos) y 15 días después del refuerzo (día 30 círculos negros). Las células fueron cultivadas en presencia de AgTs y tres péptidos (10 μ g/ml). Los grupos y los símbolos corresponden a los descritos en la Figura 9. Las barras indican los valores de corte de IL-4 antes de la vacunación (día 0). * $P \leq 0.05$ en relación a los niveles de IL-4 antes de la inmunización.

5.5 Efecto de la vacunación con fagos sobre el reto con *T. solium*.

Para evaluar la capacidad de los fagos como vacuna contra la cisticercosis porcina, los cerdos inmunizados con la vacuna CPhV de forma oral o sc dosis baja, fueron experimentalmente retados con huevos de *T. solium*. Solamente estos dos grupos fueron infectados debido al número limitado de huevos y al intento por determinar si la administración sc de dosis baja podría ser suficiente para inducir protección y si la inmunización oral podría ser igualmente efectiva. Un grupo adicional de cinco cerdos se mantuvo separado de los animales inmunizados con fagos (grupo control). Como se muestra en la **tabla 2**, los cerdos inmunizados sc mostraron menor número de cisticercos comparados con los animales del grupo control, y uno de ellos fue completamente protegido. Dos de los tres cerdos inmunizados oralmente exhibieron un reducido número de cisticercos y 474 cisticercos fueron recobrados del tercer cerdo. Sin embargo, 86% de los cisticercos fueron macroscópicamente dañados (**Figura 11**). Aunque fue un pequeño número de cerdos evaluados, los resultados apuntan a la inducción de inmunidad protectora en los cerdos contra la cisticercosis debido a la vacuna CPhV.

Tabla 2. Efecto de la inmunización con fagos sobre la carga parasitaria^a

Cerdos inmunizados con		
M13	CPhV	
Subcutánea	Oral	Subcutánea (dosis baja)
91 ^b (73/18) ^c	31 (3/28)	11 (1/10)
164 (154/10)	474 (65/409)	0
246 (57/189)	53 (24/29)	36 (23/13)
514 (512/2)		
580 (580/0)		

^a Tres cerdos de cada grupo fueron inmunizados dos veces sc u oralmente en intervalos de 15 días con la CPhV. El grupo control recibió solamente el fago M13. Cuarenta y cinco días después de la segunda aplicación de los fagos, los cerdos fueron retados oralmente con 17 000 huevos de *T. solium*. Dos meses después, los cerdos fueron sacrificados y la carga parasitaria contada.

^b Número de cisticercos recobrados de cada cerdo.

^c Número de cisticercos vesicular/necrótico.

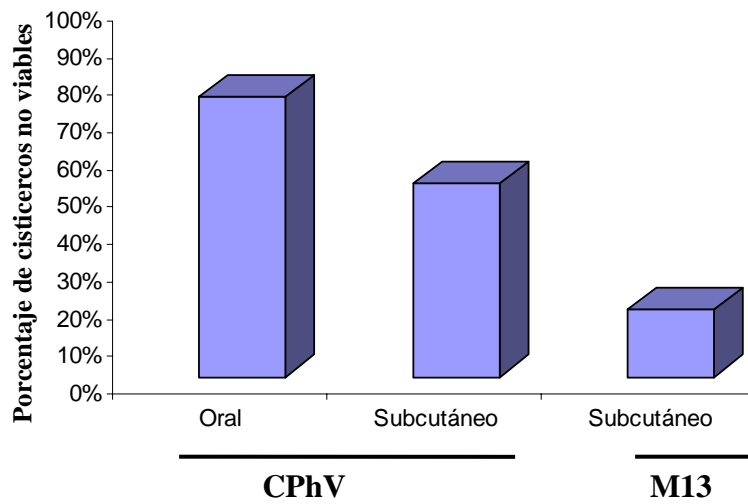


Figura 11. Porcentaje de cisticercos no viables detectados mediante examinación histológica. Los cisticercos fueron clasificados de acuerdo a la respuesta inflamatoria alrededor de estos y los diferentes grados de degeneración. Los cisticercos no viables fueron rodeados por una respuesta inflamatoria severa. Los cerdos fueron inmunizados con 4×10^{12} fagos de CPhV oralmente, 4×10^{11} de CPhV sc y 4×10^{12} fagos M13 sc (grupo control). El porcentaje de los cisticercos dañados fueron significativamente menores en los cerdos inmunizados. ($P < 0.0001$, prueba de chi-cuadrada).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La neurocisticercosis es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso humano (Del Brutto, OH. et al., 1997; Nancy, LS. Et al., 2005; Garcia HH, et al., 2003). El diagnóstico de la NNC está basado en las imágenes de TC y de RM que son caras y poco disponibles en áreas donde la enfermedad es endémica. Además, todavía no hay una vacuna disponible para la prevención de ésta enfermedad. Por lo tanto, hay una clara necesidad en la búsqueda de un diagnóstico y de antígenos recombinantes protectores contra *T. solium*. Comúnmente, los antígenos recombinantes usados en los estudios de la cisticercosis son identificados por ensayos serológicos estándar con bibliotecas de ADNc expresadas en fago lambda o por PCR usando oligos diseñados sobre secuencias de ADN o secuencias de proteínas ya publicadas (Hubert K. et al. 1999; Garcia HH. Et al., 2003; Manoutcharian K. et al., 1996; Chung JY. et al., 1999; Hancock K. et al., 2004). En este estudio, la biblioteca genómica de *T. solium* expresada en fago fue construida en un fagémido de tal forma que los péptidos/proteínas recombinantes son expresados como fusiones N-terminal en la proteína pVIII de la cápside en el bacteriófago M13. Se usó la expresión en pVIII en lugar de pIII, debido a que es mucho más eficiente para la selección de fagos que se unan a ligandos, como se reportó al aislar genes de receptores celulares de *Staphylococcus aureus* (Williams, R.J et al., 2002).

Debido a que las secuencias de ADN que codifican para proteínas representan una pequeña fracción del ADN genómico eucarionte, las bibliotecas de ADNc son útiles como fuente para la identificación de genes en particular usando distintas estrategias de selección. Por otra parte, las bibliotecas genómicas son las únicas herramientas que permiten el análisis de la estructura genómica y la organización génica. Sin embargo, en diversos reportes recientes se describe la identificación de genes o de fragmentos de genes de bibliotecas genómicas generadas de ADN de patógenos con genomas relativamente pequeños (Tong, AH. et al. 2002; Jacobsson K. et al., 1996, Palzkill T. et al. 1998; Williams RJ. et al., 2002). En estos estudios, la tecnología de Phage Display permitió la selección y modificación de

péptidos o proteínas expresadas sobre la superficie de un fago filamentoso (*Wilson DR. Et al., 1998; Manoutcharian, K. et al., 2001*). Comúnmente, las bibliotecas genómicas expresadas en fagos fueron seleccionadas contra anticuerpos monoclonales o proteínas de interés para aislar clonas de fagos que reaccionan específicamente con su blanco. A pesar de la existencia de varios reportes que describen la utilidad de bibliotecas de ADN genómico expresado en fagos para aislar proteínas u otros dominios (*Tong, AH. et al. 2002; Jacobsson K. et al., 1996, Palzkill T. et al. 1998; Williams RJ. et al., 2002*), existe solo un reporte donde tal biblioteca fue utilizada en una bioselección en contra de un suero policlonal para identificar dominios proteicos (*Palzkill T, et al., 1998*). En ese estudio, una biblioteca genómica expresada en fago fue usada para aislar fagos que expresaban dominios que se unían a la proteína RecA. En este trabajo, se muestra por primera vez que una biblioteca genómica de ADN expresada en fago (biblioteca genómica de *T. solium*) puede ser usada en una bioselección contra un suero inmune anti-patógeno que permitió la identificación de antígenos reconocidos por los anticuerpos presentes en las muestra de los pacientes. Se aislaron dos clonas de fagos que expresaron antígenos de *T. solium* que reaccionaron específicamente con los anticuerpos presentes en las muestras de LCR y plasmas de pacientes con NCC confirmados por neuroimagen. Se decidió caracterizar las clonas de la ronda de selección inicial ya que hay evidencia que durante pasos de selección posteriores los fagos con valor de crecimiento mayor que aquellos con mayor afinidad contra el blanco pueden ser seleccionados (*Fack F. et al., 1997*). Usando los fagos recombinantes aislados en un ensayo de ELISA para la serodiagnos de la NCC, se observaron sensibilidades del 52 %.

Para mejorar la exactitud del diagnóstico de la ELISA basada en fagos, podría ser necesario crear una mezcla de antígenos que contenga distintas clonas de fagos. Alternativamente, debido a la presencia de anticuerpos anti-M13 en sueros de humanos (*Tafi R. et al., 1997*), la generación de antígenos identificados en este estudio, como péptidos/proteínas libres probablemente resultará en un ensayo de ELISA más sensible y preciso. El estudio de los isotipos de Igs mostró que el isotipo de Ig presentes en las muestras de plasma de pacientes con NCC es el IgG1, lo que indica que la infección con *T. solium* y *T.*

crassiceps indujo una respuesta inmune tipo Th2, como se ha demostrado previamente en humanos (Yang HJ. *Et al.*, 1998) así como en ratones (Terrazas LI. *Et al.*, 1998), respectivamente.

Aunque se asume que las pruebas inmunodiagnósticas no pueden reemplazar la neuroimagen para el manejo clínico de la NCC (Dorny P, *et al* 2003), pueden proporcionar la única herramienta para el diagnóstico de la infección en áreas donde la enfermedad es endémica. El uso de una biblioteca genómica expresada en fagos es adecuada para la identificación de antígenos de patógenos con ciclos de vida complejos y limitada disponibilidad de ciertas etapas del desarrollo, como es el caso con *Toxoplasma gondii* (Robben J. *et al.*, 2003) y *T. solium*. Esta técnica de selección puede encontrar aplicaciones alternativas como el abordaje de la proteómica de un genoma amplio para elucidar la función de las proteínas, debido a la rápida acumulación de secuencias de ADN de proyectos genómicos que han incrementado la demanda de herramientas para el análisis funcional (Hartveldt K, *et al.*, 2003). Pensamos que los fagos M13 recombinantes tienen gran potencial para su aplicación como vacunas (Manoutcharian, K. *et al.*, 2001) en contra de la cisticercosis, como se ha mostrado previamente en la cisticercosis murina (Manoutcharian K. *et al.*, 1999), y más recientemente en este trabajo realizado contra la cisticercosis porcina, permitiendo el bloqueo del ciclo de vida del parásito y la posible eventual erradicación de la enfermedad. Los fagos filamentosos tienen claras ventajas sobre los antígenos recombinantes convencionales o las fracciones antigénicas usadas como herramientas de inmunodiagnósticos o como vacunas, debido a que su producción a gran escala es sencilla y barata, permitiendo la rápida producción de preparaciones antigénicas casi 100% puras y estables (Wilson DR. *et al.*, 1998; Manoutcharian, K. *et al.*, 2001).

Por otra parte, en este trabajo se evaluó la capacidad protectora de una vacuna (CPhV) basada en fagos M13 recombinantes que expresaban los antígenos KETc1, KETc7, KETc12 y GK1 contra la cisticercosis porcina.

Una de las principales ventajas de la administración de M13 sobre la vacuna basada en péptidos sintéticos (*Huerta et al., 2001; Sciutto et al., 2000*) es la facilidad y el bajo costo con que puede ser producido, ya que el M13 es secretado de las bacterias casi libre de componentes bacterianos; la densidad de superficie del fago es de 200 a 400 m²/g y los péptidos fusionados comprenden más del 25 % del peso del fago y más del 50% de su área de superficie (*Petrenko and Smith, 2000*). Otras características resaltables, son la resistencia de los fagos al calor y a muchos solventes orgánicos y compuestos químicos así como otros agentes desnaturalizantes, pero la mayor ventaja de los fagos es su inmunogenicidad sin requerir el uso de adyuvante para su aplicación como inmunógenos. Todas estas propiedades mencionadas son importantes para el desarrollo de vacunas y para su aplicación. Considerando estas propiedades, la tecnología de Phage Display ha llamado la atención de muchos grupos de trabajo del área del diseño de vacunas contra distintas enfermedades tales como VIH-1 (*Scala et al., 1999; De Berardinis et al., 2000*), *Hepatitis-C* (*Puntoriero et al., 1998*) o la enfermedad de Alzheimer (*Manoutcharian et al., 2003; Frenkel and Solomon, 2002; Gevorkian G et al., 2004; Manoutcharian et al., 2004*). Además, los fagos se pueden mejorar como sistemas de envío debido a los avances realizados en la modificación de las proteínas de la cubierta del fago M13, o modificándolas por completo, expandiendo la utilidad de la tecnología de Phage Display así como el concepto de vacuna.

Durante las dos últimas décadas, se ha enfocado en el desarrollo de una vacuna efectiva y de bajo costo contra la cisticercosis. La cisticercosis es una enfermedad de alta prevalencia que causa severos daños neurológicos en los humanos en el tercer mundo (*Sotelo, et al., 1996; White, 1997; Sciutto et al., 2000*). Se han intentado diferentes estrategias que han sido consideradas desde el ámbito social y/o biológico. Sin embargo, la vacunación de los cerdos (huésped intermediario de *T. solium*) puede interrumpir el ciclo de vida del parásito y así reducir la exposición e infección de los humanos e incrementar la economía de la crianza porcícola. A la fecha se han evaluado diferentes mezclas de antígenos de diferentes estadios del parásito, oncosfera y cisticerco (*Lightowers, 2000*). Sin embargo, las limitaciones en la obtención y la calidad de los antígenos evitan la amplia aplicación de las distintas

vacunas. Por otra parte, el uso de antígenos recombinantes ofrece un gran potencial para aplicar estos antígenos. En este trabajo se evaluaron las capacidades inmunogénicas y protectoras de la vacuna CPhV con la perspectiva de la aplicación de los fagos filamentosos como vacuna contra la cisticercosis porcina. Es de resaltar que la vacuna CPhV indujo una fuerte protección contra la cisticercosis por *T. crassiceps* y mostró resultados promisorios contra la cisticercosis porcina. Aunque este ensayo experimental se llevó a cabo con un bajo número de cerdos, no puede representar la realidad en la transmisión de la cisticercosis porcina (en dosis y frecuencia del reto, fondo genético heterogéneo, estado nutricional de los cerdos, condiciones de vida, etc.). Después de obtener los resultados de los efectos de la vacunación, se propone de forma obligatoria un ensayo en el campo seguido de un estudio post-mortem de la viabilidad y del daño de los cisticercos para evaluar el efecto de la vacuna sobre la prevalencia e intensidad de la cisticercosis porcina en áreas rurales de alta endemicidad.

Considerando la capacidad inmunogénica de la vacuna CPhV, se demostró que produjo una respuesta inmune de tipo Th1/Th2 con una respuesta proliferativa antígeno y péptido específico y la producción de IFN- γ e IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos de PBMCs de los cerdos inmunizados. Esta respuesta inmune Th1/Th2 producida por la inmunización con los fagos ha sido confirmada por un análisis detallado de los subtipos de Igs en ratones inmunizados con fago M13 silvestre así como con M13 recombinantes expresando diferentes péptidos (datos de experimentos no publicados). La inmunogenicidad de los fagos podría ser el resultado de la expresión de péptidos/proteínas en el contexto de ser un arreglo altamente ordenado de elementos repetitivos sobre la superficie del fago similar a las partículas parecidas al virus de papiloma humano, que están actualmente en proceso de ser vehículos de vacunas (*Schiller and Lowy, 2001*). Resultados publicados recientemente hacen posible mejorar la potencia de las vacunas en donde dosis más altas de fagos fueron usados (2×10^{14} partículas) en cinco aplicaciones con el adyuvante QS21 para proteger a los animales contra una progresión parecida al SIDA (*Chen et al., 2001*).

Un interesante descubrimiento fue la persistencia de los fagos en el tracto gastrointestinal de los cerdos a los 45 días después de la inmunización. Estos fagos se encontraron además en cerdos vacunados oralmente, también en algunos cerdos de otros grupos, lo que indica una diseminación activa de los fagos a través de aquellos infectados oralmente, ya que todos los cerdos estuvieron en contacto estrecho durante el experimento. Aunque es necesaria una mayor investigación para proponer el uso de estos fagos recombinantes en ensayos de campo, estos resultados apuntan a la posibilidad de una fácil alternativa a la diseminación efectiva de la vacuna en una población de cerdos expuesta, incrementando la posibilidad de éxito de los programas de control. Sin embargo, también se debe considerar los posibles efectos negativos de la diseminación de los fagos entre los animales no controlados. La posibilidad de la aplicación de los fagos recombinantes sin efectos no deseables parece ser factible considerando la amplia experiencia de la aplicación de la terapia de fagos en humanos en muchos países europeos por varias décadas (*Sulakvelidze et al., 2001; Summers, 2001*). Por ejemplo, los fagos líticos, que lisan completamente a las bacterias, tales como *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*, han sido usados como agentes antibacteriales en humanos en el pasado y ahora hay una clara necesidad e interés para el desarrollo de fagos antibacteriales (*Biswas et al., 2002*). Recientemente, el bacteriófago phiX174 fue usado para inmunizar pacientes infectados con VIH para la evaluación de la función de células T CD4+ *in vivo* (*Fogelman et al., 2000*). No obstante, actualmente se están usando ensayos de vacunación con fagos M13 recombinantes no infectivos tratados con UV de acuerdo con los lineamientos institucionales (IIB, UNAM).

En resumen, se reporta por primera vez la posibilidad de usar una biblioteca genómica expresada en fagos para identificar antígenos de patógenos con potencial diagnóstico a través de una bioselección con sueros inmunes. Posteriormente, la biblioteca genómica de *T. solium* se utilizará para aislar clonas utilizando sueros hiperinmunes de ratones anti- *T. solium* y LCR de pacientes con NCC. La estrategia descrita para identificar antígenos puede ser usada para identificación directa de antígenos útiles para estudiar las interacciones huésped-patógeno así como para el desarrollo de vacunas. Actualmente, se esta

planeando un ensayo de vacunación en campo a gran escala usando fagos recombinantes para determinar si la CPhV puede ser usada como una vacuna accesible para ser incluida en un programa de control contra la cisticercosis porcina en áreas rurales de México, donde ésta enfermedad es endémica. Finalmente, el presente trabajo apunta hacia el uso de fagos como posibles componentes de ensayos de inmunodiagnóstico y/o de vacunas recombinantes, aunque su aplicación se reserva a estudios posteriores.

7. REFERENCIAS

Balass, M., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D., Katchalski Katzir, E., Fuchs, S. Identification of a hexapeptide that mimics a conformation dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *PNAS* 1993; 90: 10638- 10642.

Barbas, CF., Burton, DR., Scott, JK., Silverman, GJ. 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 432 pp.

Bastien, N., Trudel, M., Simard, C. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology* 1997; 234: 118-122.

Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* 2001; 19: 1-33.

Bhardwaj, D., Singh, S.S., Abrol, S. and Chaudhary. V.K. Monoclonal antibodies against a minor and the major coat proteins of filamentous phage M13: their application in phage display. *J. Immunol. Meths.* 1995; 179: 165-175.00.

Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., Merril, C.R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycine-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 2002; 70, 204–210.

Boots, L., McKenna, P., Arnold, B., Keller, P., Gorny, M., Zolla-Pasner, S., Robinson, J. and Conley, A. Anti-human Immunodeficiency virus type-1 human monoclonal antibody that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1997; 13:1549-1559.

Bueno, E.C., Vaz, A.J., Machado, L.D., Livramento, J.A., and Mielle, S.R. 2000. *J. Clin. Microbiol*, 38, 1:146-151.

Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T.W., Justement, J.S., Cohen, O.J., vanCott, T.C., Iwanicki, M., Lewis, M.G., Greenhouse, J., Tarry, T., Venzon, D.A., Fauci, A.S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage displayed epitopes. *Nat. Med.* 2001; 7, 1225–1231.

Chung JY, Bahk YY, Huh S, Kang SY, Cho SY. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1999; 180:1307-1315.

Chung JY, Yun DH, Eom KS, Kang SY, Kong Y, Cho SY. *Taenia solium*: identification of specific antibody binding regions of metacestode 10-kDa protein. *Exp Parasitol.* 2002 Feb;100 (2):87-94.

Cortese, I., Tafi, R., Grimaldi, L.M.E., Martino, G., Nicosia, A., Cortese, R. Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis by using phage libraries. *PNAS* 1996; 93: 11063-11067.

Cruz-Revilla, C., Rosas, G., Fragoso, G., López-Casillas, F., Toledo, A., Larralde, C. and Sciutto, E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.*, 2000, 86(1); 67-74.

Cwirla, S., Balasubramanian, P., Duffin, D., Wagstrom, R., Gates, C., Singer, S., Davis, A., Tansik, R., Mattheakis, L., Boytos, C., Schatz, P., Baccarani, D., Wrighton, N., Barrett, R., and Dower, W. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* 1996; 276: 1696-1699.

da Silva AD, Quagliato EM, Rossi CL. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Jun; 37 (2):87-92.

Demangel, C., Lafaye, P. and Mazie, J. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite

surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol Immunol* 1996; 33:909-916.

Del Brutto OH. 1997. Neurocysticercosis. *Curr Opin Neurol* 1997; 10:268-272.

Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R. and Galfré G. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine* 1997; 15:1276-1285.

Dente, L., Vetriani, C., Zucconi, A., Pelicci, G., Lafrancone, L., Pelicci, P.G., and Cesaren, G. Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J. Mol. Biol* 1997; 269: 694-703.

De Berardinis, P.D., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R.N., Pozzo, G.D., Guardiola, J. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat. Biotech.* 2000; 18: 873–876.

Dekumyoy P, Anantaphruti MT, Nuamtanong S, Watthanakulpanich D, Waikagu J, Danis M. Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacestodes for diagnosis by IgG-ELISA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;31 Suppl 1:21-5

De la Cruz, V.F., Lal, A.A., McCutchan, T.F. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J.Biol. Chem.* 1988;263, 4318- 4322.

Dorny P, Brandt J, Solí A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica* 2003; 87:79-86.

Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J.B., Sioud, M. Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clinical Immunol. Immunopathol.* 1995; 75: 45-50.

Ev LV, Maia AA, Pianetti G, Nascimento E. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol Res.* 1999 Feb;85(2):98-102.

Fack F, Hugle-Dorr B, Song D, Queitsch I, Petersen G, Bautz EKF. Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J. Immunol. Methods* 1997; 206:43-52.

Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A., Cortese, R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertusiss toxin from phage peptide libraries. *Gene* 1993; 128: 21-27.

Ferrer, M and Harrison, S. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1gp 120 identified from phage display libraries. *Journal of Virology* 1999; 73:5795-5802.

Fleury, A., Gomez, T., Alvarez, I., Mez, D., Huerta, M., Chavarria, A., Carrillo, Mezo, R.A., Lloyd, C., Dessein, A., Preux, P.M., Dumas, M., Larralde, C., Sciutto, E. and G, Fragoso. High prevalence of calcified silent NCC in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22 (2): 139-145.

Fogelman, I., Davey, V., Ochs, H.D., Elashoff, M., Feinberg, M.B., Mican, J.A., Siegel, J.P., Sneller, M., Lane, H.C. Evaluation of CD4⁺ T-cell function in vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J. Infect. Dis.* 2000; 182, 435–441.

Frenkel, D., Solomon, B. Filamentous phage as vector mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. 16, 5675–5679.

García, G., Sciutto, E., Fragoso, G., Cruz, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., Aluja, A., Jose, M.V., Larralde, C. Inhibitory role of Abs in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.* 2001; 87, 582–586.

García H., González, A., Gilman, R. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003; 16: 411-419.

Gekeler F, Eichenlaub S, Mendoza EG, Sotelo J, Hoelscher M, Loscher T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Mar;21(3):227-9.

Germaschewski, V., and Murray K. Identification of polyclonal serum specificities with phage display libraries. *J.Virol. Methods.* 1996; 58: 21-32.

Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Larralde, C., Hernandez, M., Almagro, J.C., Viveros, M., Sotelo, J. and Sciutto, E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Letters* 1996; 49: 185-189.

Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J.C., Govezensky T. and Domínguez, V. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. Related Epitopes Using Phage Display Peptide Library. *Clinical Immun. and Immunopathology* 1998; 86: 305-309.

Gevorkian G, Petrushina I, Manoutcharian K, Ghochikyan A, Acero G, Vasilevko V, Cribbs DH, Agadjanyan MG. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar beta-amyloid. *J Neuroimmunol.* 2004; 156:10-20.

Grabowska, A.M., Jennings, R., Laing, P., Darsley, M., Jameson, C.L., Swift, L., Irving, W.L. Immunization with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology* 2000; 269: 47-53.

Hancock, K, Khan, A., Williams, F. B., Yushak, M. L., Pattabi, S., Noh, J., and Tsang, V. Characterization of the 8-Kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J Clin Microbiol*, 2003; 41, 6:2577-2586.

Hancock K, Patabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, Priest JW, Levine MZ, Tsang VCW. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 133:115-124.

Hartvedt, K., Dechassa, ML., Robben, J., Volckaert, G. Identification of Ga180p-interactions proteins by *Saccharomyces cerevisiae* whole genome phage display. *Gene* 2003; 307: 141-147.

Héctor H. García, Oscar H. del Brutto. 2003. Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Tropica* 87: 71-78.

Hernández M, Beltrán C, Garcia E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, Parkhouse M, Harrison L, Sotelo J, Sciutto E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett* 2000; 71:13-17.

Hoop, T. P. and Woods, K. R. A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol. Immunol.* 1983; 20: 483-489.

Huerta, M., Sciutto, E., García, G., Villalobos, N., Hernandez, M., Fragoso, G., Diaz, J., Diaz, A., Ramirez, R., Luna, S., Garcia, J., Aguilar, E., Espinoza, S., Castilla, G., Bobadilla, J.R., Avilña., Jose, M.V. Larralde, C. and A.S. de Aluja. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Veter. Parasitol.* 2000; 90: 209-219.

Hubert, K., A. Andriantsimahavandy, A. Michault, M. Frosch, and F.A. Muhlschlegel. Serologic diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6:479-482.

Huerta, M., Aluja A., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernandez, M., Gevorkian, G., Acero, G., Alvarez, L., Diaz, A., Avila, R., Beltran, C., García, G., Martinez, J.J., Larralde, C. and Sciutto, E. 2001. Synthetic peptides vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 2793: 1-5.

Hufton, E.E., Moerkerk, P.T., Meulemans, E.V., De Bruine, A., Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. Phage display cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J. Immunol. Meths.* 1999; 1-2: 39-51.

Iniguez, P., Zientara, S., Marault, M., Machin, I., Hannant, D. and Cruciere, C. Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *Journal of Virological Methods* 1998; 73:175-183.

Ishida, M. M., Rubynsky-Elefant, G., Ferreira, A. W., Hoshino-Shimizu, S., and Vaz, A. J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosos*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica* 2003; 89: 73-84.

Jacobsson, K., Frykberg, L. Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100 % correct clones. *BioTechniques* 1996; 20: 1070-1081.

Jacobsson, K., Frykberg, L. Shotgun phage display cloning. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2001; 4; 135-143.

Jonsson, K., Guo, B.P., Monstein, H-J., Mekalanos, J.J., Kronvall, G. Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *PNAS* 2004; 101: 1852-1857.

James C, Allan, Patrici P. Wilkins, Victor C.W. Tsang, Philip S. Craig. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Tropica* 2003; 87: 87-93.

Kay, B., Winter, J. and McCafferty, J. 1996. Phage Display of peptides and proteins: a laboratory manual. Editorial Academic Press. USA. 344 pp.

Keller, P., Arnold, B., Shaw, A., Tolman, R., Middlesworth, F., Bondy, S., Rusiecki, V., Koenig, S., Pazner, S., Conrad, P., Emini, E., and Conley, A. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage

epitope libraries. *Virology* 1993; 193: 709-716.

Larralde C, Laclette JP, Owen C, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Diaz ML, Govezensky T, Montoya RM, Goodsaid F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:965-973

Larralde, C, Montoya, RM, Sciutto, E, Díaz, ML, Govezensky, T, Coltorti, E. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatidic disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:282-290.

Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114:926-928.

Lightowers, M.W. Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop.* 2003; 87, 129–135.

Maas, M., Delgado, E., Knobloch, J. Isolation of an immunodiagnostic *Taenia solium* coproantigen. *Tropical Medicine and Parasitology* 43, 201-202.

Magliani, W., Polonelli, L., Conti, S., Salati, A., Rocca, P.F., Cusumano, V., Mancuso, G., Teti, G. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat. Med.* 1998; 4: 705–709.

Makowski, L. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene* 1993; 1:5-11.

Manoutcharian, K., Sotelo, J., García, E., Cano, A. and Gevorkian, G. Characterization of Cerebrospinal Fluid Antibody Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. *Clinical Immunology* 1999; 91:

117-121.

Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, A., Petrossian, P., Rodriguez, M. and Govezensky, T. Phage-Displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementary-determining regions: and effective vaccine design tested in murine tested cysticercosis. *Infect Immun.* 1999; 67 (9): 4764-4770.

Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cano, A., Almagro, JC. Phage-displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol*, 2001; 217-223.

Manoutcharian, K., Díaz-Orea, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., González, E., de Aluja, A., Villalobos, N., Gomez-Conde, E., Sciutto, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig Cysticercosis. *Vet Immunol Pathol* 2004; 99: 11-24.

Manoutcharian, Larralde, C., Aluja, A., K., Fragoso, G., Rosas, G., Hernandez, M., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Govezensky, T., Baca, M. and Sciutto, E. 1995. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccine.* 95: 63-68.

Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Sciutto, E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 1996; 82: 250-254.

Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Montero JA, Govezensky T, Cao C, Ugen K, Gevorkian G. Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 2003; 145:12-17.

Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Becerril B, Massieu L, Govezensky T, Ortiz E, Marks JD, Cao C, Ugen K, Gevorkian G. Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol Dis.* 2004;17:114-21.

Marvin DA. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 150-158

Meola, A., Delmastro, P, Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R., Galfre, G. Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol.* 1995; 154: 3162–3172.

Mittal V, Singh VK, Ichhpujani RL. Detection of antibodies to *Taenia solium* in sera of patient with epilepsy using ELISA. *J Commun Dis.* 2001 Mar; 33(1):23-7.

Molinari, J.L., Tato, P., Aguilar, T. and A. Palet. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Rev. Latin. Microbiol.* 30: 325-333.

Molinari, J., Rodríguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F., and Solano, S. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Veter. Parasitol.* 69: 55-63.

Molinari JL, Garcia-Mendoza E, de la Garza Y, Ramirez JA, Sotelo J, Tato P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jun; 66(6):777-81

Muhlschlegel FA. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Jul;6(4):479-82.

Nascimento E, Nogueira PM, Tavares CA. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. *Parasitol Res.* 1987;73(5):446-50

O'Neil, KT., Hoess; RH., DeGrado, WF. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Proteins* 1992; 14: 509-515.

Palzkill, T., Huang, W., Weinstock, G.M. Mapping protein-ligand interactions using whole genome phage display libraries. *Gene* 1998; 221: 79-83.

Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ, Machado Ldos R, Peralta JM. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Jan;9(1):190-3.

Pathak, K.M.L. and Gaur, S.N.S. 1990. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Veter. Parasitol.* 34: 353-356.

Peralta RH, Vaz AJ, Pardini A, Macedo HW, Machado LR, De Simone SG, Peralta JM. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2002. 83(2):159-68.

Petrenko, V.A., Smith, G.P. Phage from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng.* 2000. 13, 589–592.

Puntoriero, G., Meola, A., Lahm, A., Zucchelli, S., Ercole, B.B., Tafi, R., Pezzanera, M., Mondelli, M.U., Cortese, R., Tramontano, A., Galfre, G., Nicosia, A. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J.* 1998. 17, 3521–3533.

Rhyner, C., Kodzius, R., Cramer, R. Direct isolation of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3: 13-21.

Robben, J., Hartvedt, K., Bosmans, E., Volckaert, G. Selection and identification of dense granule antigen GRA3 by *Toxoplasma gondii* whole genome phage display. *J Biol Chem* 2003; 277: 17544-17547.

Robles, Y., Gonzalez, E., Govezensky, T., Munguia, ME., Acero, G., Bobes, J., Gevorkian, G., Manoutcharian, K. Isolation of the *Tenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for

diagnosis of neurocysticercosis. 2005. *Clin Immunol.* 116: 265-270.

Rocha, S.M., Suzuki, L.A., Silva, A.D., Arruda, G.C., Rossi, C.L. A rapid latex agglutination test for the detection of anti-cysticercus antibodies in cerebrospinal fluid (CSF). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2002; 44:57-58.

Rodi, D.J., Makowski, L.. Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10: 87-93.

Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M. A., Rosales, R. and Sciutto, E. *Taenia crassiceps* cysticercosis vaccine: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 1998. Jun, 84(3): 516-523.

Russel, M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export. *Science* 1994; 265: 612-614.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sarti, E., Schantz, P., Plancarte, A., et al. Epidemiological investigation of *T. solium* taeniosis and cysticercosis in rural village of Michoacán State, Mexico. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994. 68, 49-52.

Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec; 38(12):4439-44.

Sato, M.O., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Plancarte, A., Kassuku, A. A., Dorny, P., Geerts, S., Benitez-Ortiz, W., Hashiguchi, Y. and Ito, A. Evaluation of tongue and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. *Vet. Parasitol.*, 2003; 111:309-322.

Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J.N., O’Cohen, J., Vaccarezza, M., Igarashi, T., Fauci, A.S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J. Immunol.* 1999; 162, 6155–6161.

Schiller, J.T., Lowy, D.R. Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2001; 1, 571–581.

Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomelí, C., Tapia, G., and Larralde, C. Cysticercosis vaccine: cross protecting with *Taenia solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990; 12: 687-696.

Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L. F., Hernandez, M., Villalobos, N, Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S. and Larralde, C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. *Vet. Parasitol*, 1995; 60: 53-67.

Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2000; 2, 1875–1890.

Scott, J., and Smith, G. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249: 386-390.

Sidhu, S.S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000; 11: 610–616.

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the viri3n surface. *Science* 1985; 228: 1315-1317.

Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem. Rev.* 1997; 97: 931-940.

Smith, G.P., Scott, J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 1993; 217: 228-257.

Smothers, JF., Henikoff, S., Carter, P. Tech. Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. *Science*; 2002; 298: 621-622.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chem.* 2001; 45, 649–659.

Summers, W. C. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55, 437–451.

Tafi R, Bandi R, Prezzi C, Mondelli MU, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. Identification of HCV core mimotopes: improved methods for the selection and use of disease-related phage-displayed peptides. *Biol. Chem.* 1997; 378:495-502.

Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 1998; 84:74-81.

Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernandez, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Kubli, C., Vazquez, R., Terrazas, I. and Sciutto, E. Towards a *Taenia crassiceps* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999; 67: 2522-2530.

Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernandez, M., Gevorkian, G., Lopez-Casillas, F., Hernandez, B., Acero, G., Mirna, H., Larralde, C., and Sciutto, E. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun*, 1766-1773.

Tsang V.C., Brand, J.A., Boyer, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*), *J. Infect. Dis.* 1989; 59 50-59.

Valdez, F., Hernandez, M., Govezensky, T., Fragoso, G. and E. Sciutto. 1994. Immunization against pigs *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol*, Dec; 80 (6): 931-936.

Wilson, M., Bryan, R.T., Fried, J.A., Ware, D.A., Sejantz, P.M., Pilcher, J.B. Tsang, V.C. 1991. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J. Infect. Dis.* 164: 1007-1009.

Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1982; 68:39-47.

White Jr., A. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 24, 101–113.

Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., Nair, S.P. Identification of fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermitis*. *Infect Immun* 2002; 70: 6805-6810.

Willis, A, Perham, R. and Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 1993; 128:79-83.

Wilson, DR., Finlay, B.B. Phage Display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* 1998; 44: 313-329.

Wrighton, N., Farrell, F., Chang, R., Kashyap, F., Barbone, P., Mulcacky, L., Johnson, D., Barrett, R., Jolliffe, L., and Dower, W. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996; 273: 458-463.

Yancy LS, Diaz-Marchan PJ, White AC Jr. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7:39-47.

Yang HJ, Chung JY, Yun D, Kong Y, Ito A, Ma L, Liu Y, Lee S, Kang S, Cho SY. Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol.* 1998; 20:483-488.

Zhang H., Zhong, Z., Pirofsky, L.A. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. *Infect Immunology* 1997; 65: 1158-1164.

APÉNDICE

Isolation of Neurocysticercosis-Related Antigens from a Genomic Phage Display Library of Taenia solium

González E, Robles Y, Govezensky T, Mungia ME, Acero G, Bobes RJ, Gevorkian G, and Manoutcharian K. *

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México DF, CP04510, MÉXICO;

*Corresponding author:

Dr. Karen Manoutcharian, PhD

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México DF, CP04510, MÉXICO;

Tel: 5255-56223869

Fax: 5255-56223855

Email: karman@servidor.unam.mx

Abstract

In this study we showed for the first time that a phage display library expressing genomic DNA (*Taenia solium* genomic DNA library in this case) may be used in a bioselection against anti-pathogen immune sera allowing the identification of disease-related antigens recognizing antibodies present in clinical samples. We isolated two phage clones expressing *T.solium*-derived antigens specifically reacting with antibodies present in plasma and CSF samples of neuroimaging-confirmed neurocysticercosis patients. The described antigen discovery strategy may be used for the direct identification of antigens useful for host-pathogen interaction studies as well as for molecular vaccine development.

Key words: *Taenia solium*, neurocysticercosis, phage displayed genomic DNA expression library, immunodiagnosis.

Este artículo se encuentra en revisión en la revista *Journal of Cinical Microbiology*.



Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis

Karen Manoutcharian^{a,*}, Alicia Díaz-Orea^b, Goar Gevorkian^a, Gladis Fragoso^a, Gonzalo Acero^a, Erik González^a, Aline de Aluja^c, Nelly Villalobos^c, Eduardo Gómez-Conde^b, Edda Sciutto^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México CP 04510, D.F., Mexico

^bCentro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Cerrada 16 Sur #10, CP 72540 Puebla, Mexico

^cFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México CP 04510, D.F., Mexico

Received 22 August 2003; received in revised form 26 November 2003; accepted 22 December 2003

Abstract

The aim of this study was to test the capacity of recombinant phages to deliver antigens for vaccination against porcine cysticercosis. Thus, three peptides (KETc1, KETc12, GK1) and a recombinant antigen KETc7, previously proven to induce high levels of protection against pig cysticercosis, were expressed on the surface of the M13 bacteriophage at multiple copies. The pool of these four recombinant phages induced high levels of protection against an experimental murine cysticercosis. The immunogenicity of the phage vaccine preparation was therefore, tested in pigs, the natural host of *Taenia solium*. Subcutaneous or oral vaccination with these phages induced antigen-specific cellular immune responses in pigs. Preliminary data also points to the protective capacity of this recombinant phage vaccine against pig cysticercosis. The immunogenicity of these recombinant phages, together with the low cost of their production, make them a realistic candidate to be tested in pigs as an anti-cysticercus phage vaccine for field trials. This is the first report describing the application of a filamentous bacteriophage as a vaccine in large animals such as pigs, the only intermediate hosts of *T. solium*, a parasite of major medical importance in developing countries. The potential application of phages as a modern platform for vaccines for human and animal diseases is discussed. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phage display; Vaccination; *Taenia solium*; Pig cysticercosis; Synthetic vaccine

1. Introduction

Phage display is based on the fusion of foreign peptides/proteins to bacteriophage coat proteins and

their expression on the surface of phage (generally, M13, fd or λ). Since the DNA fragments or genes encoding expressed molecules are fused to coat protein genes of phages, a physical linkage is established between phage phenotype and genotype. Phage libraries displaying large repertoires (up to 10^{11} members) of peptides, antibody fragments or cDNAs allow in vitro and in vivo characterization of virtually any

* Corresponding author. Tel.: +52-55-56-22-38-69;

fax: +52-55-56-22-38-55.

E-mail address: karman@servidor.unam.mx (K. Manoutcharian).

protein–protein, enzyme–substrate, receptor–ligand, protein–DNA or even protein–non-protein interaction using bioselection (biopanning) procedures (Rodi and Makowski, 1999; Sidhu, 2000; Manoutcharian et al., 2001). In numerous studies, antibody specificities have been characterized by this powerful system in various diseases including viral infections, cancer and autoimmune disorders (Rodi and Makowski, 1999; Sidhu, 2000; Manoutcharian et al., 2001). Also, the immunogenic features of the phage expressing peptides of interest have been extensively studied in mice and rabbits (De la Cruz et al., 1988; Manoutcharian et al., 2001). In addition, it has been shown that phage particles were highly immunogenic and were capable of inducing antigen-specific Abs without the requirement of adjuvants (Willis et al., 1993; Meola et al., 1995), due to the ability of the phage to recruit helper T-cells. Also, induction of a cytotoxic-T-lymphocyte immune response has been reported with phage particles. Indeed, we have previously shown the generation of protective cellular immune response against murine cysticercosis using recombinant phage expressing T-cell epitopes as immunogens (Manoutcharian et al., 1999). Recently, the induction of HIV-1-specific cytotoxic-T-lymphocyte immune response in mice immunized with a cytotoxic-T-lymphocyte epitope displayed on phages was reported (De Berardinis et al., 2000). Phages were used as immunogens to confer antibody-mediated protection in mice against human respiratory syncytial virus (RSV) (Bastien et al., 1997), HSV-2 (Grabowska et al., 2000) and against streptococcal infection (Magliani et al., 1998). Surprisingly, despite these data showing the strong immunogenic potential of the phage, there have been very few studies describing the application of phage as vaccines.

Neurocysticercosis caused by *Taenia solium* is a most common parasitic disease of the central nervous system (CNS) and it seriously affects human health at a worldwide scale (White, 1997; Sciutto et al., 2000). The indispensable role of pigs as an obligatory intermediate host in the life cycle of the parasite offers the possibility of interfering with transmission through the vaccination of pigs. Therefore, the development of anti-cysticercosis vaccine was pursued by a number of research groups (Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Toledo et al., 1999; Lightowlers et al., 2000; Lightowlers, 2003). Murine cysticercosis caused

by *Taenia crassiceps*, a cestode that exhibits antigen similarities with *T. solium*, has been extensively used to test different vaccine candidates and vaccination approaches (Manoutcharian et al., 1999; Toledo et al., 1999). Protective recombinant *T. crassiceps* antigens which cross react with *T. solium* were isolated from a cDNA expression library (Manoutcharian et al., 1996) and three epitopes from these antigens named GK1, KETc1 and KETc12 were used in the form of synthetic peptides as a three peptide-synthetic vaccine (S3Pvac) against murine (Toledo et al., 1999) and porcine cysticercosis (Huerta et al., 2001). S3Pvac has been successfully evaluated in a field trial in 240 pigs (120 vaccinated and 120 controls) naturally exposed to the parasite during 12 months. However, the high costs of production of synthetic peptides limit their widespread use. In the present study, we propose the use of an antigen delivery system based on the use of phage display to improve the immunogenicity of this synthetic peptide vaccine and to reduce the costs of its production. Our results demonstrate the immunogenic potential of recombinant phages in pigs and their feasibility to be used as valuable molecular vaccine carriers.

2. Materials and methods

2.1. Construction of recombinant phages for anti-cysticercosis vaccine (CPhV)

T. crassiceps 96 aa long antigen KETc7 (Manoutcharian et al., 1996), KETc7-derived peptide GK1 (aa 69–95, GYYYPSDPNTFYAPPYSA), *T. crassiceps* recombinant antigen-derived peptides KETc1 (APMSTPSATSVRG) and KETc12 (GNLLSCLG) (Huerta et al., 2001) were expressed on the phage surface by cloning the corresponding DNA fragments in phage/phagemid vectors. Bold letters indicate the additional amino acids which were coupled to the commercial resin. All molecular biology procedures were carried out using standard protocols (Sambrook et al., 1989) or as recommended by manufacturers. Restriction enzymes, DNA purification kits, DNA polymerase, T4 DNA ligase and helper phage were obtained from Invitrogen, CA, USA. The synthetic oligonucleotides (oligos) were synthesized at Invitrogen. The DNA fragment coding for KETc7 was

generated by PCR from pTc-sp7 plasmid (Rosas et al., 1998), using the primers 5'K7: TTACTCGAATTCTCGGCCAGCCGGCCGCACGAGCATTTATGCAG and 3'K7: CTCAAGGATCCGCGCCCGCAAGATTCTTCTTATCTTCTGGTTC introducing *EcoRI* and *BamHI* restriction sites at 5 and 3' ends of the DNA fragment, respectively. The DNA fragments coding for GK1 and KETc12 were generated by combining two pairs of oligos 5'GK1: AATTAGGTTATTACTATCCATCTGATCCAAATACCTTCTACGCTCCACCCTACAGC and 3'GK1: GATCGCTGTAGGGTGAGCGTAGAAGGTATTTGGATCAGATGGATAGTAATAACCT for GK1 and 5'KETc12: AATTAGGCAACCTCTTATTGAGTTGTTTTG and 3'KETc12: GATCCCAACAACCTCAATAAGAGGTTGCCT for KETc12, respectively, in two separate annealing reactions as described (Manoutcharian et al., 1999) introducing flanking *EcoRI* and *BamHI* sites. These three DNAs were digested with *EcoRI/BamHI* and purified from agarose gel or ethanol precipitate. About 1 µg of each DNA sample was ligated with T4 DNA ligase to approximately 0.5 µg of similarly digested pF8 phagemid vector DNA, which is similar to the previously described pF3 vector (Manoutcharian et al., 1999), except that foreign peptides are fused to M13 cpVIII. The ligation mixtures were used to transform *Escherichia coli* TG-1 cells and resultant recombinant phagemids FK7, FGK1 and FKETc12 were rescued and amplified by superinfection with M13KO7 helper phage (Invitrogen) as described previously (Manoutcharian et al., 1999).

The PhD Peptide Display Cloning System (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used to construct FKETc1 recombinant phage. The primer 3'KETc1: ATGTTTCGGCCGACCGAACCGATGTAGCCGATGGTGTAGATGGAGCAGAGTGAGAAAGGTTAGAAAGGT and the extension primer EP: CATGCCGGGTACCTTTCTATTCTC were used to synthesize a DNA fragment coding for KETc1 and carrying *AccI/EagI* restriction sites according to manufacturer's instructions. This DNA was cloned into the M13KE phage vector, and the recombinant phage clone FKETc1 was amplified by infecting TG-1 cells. The correct PCR and cloning were verified by dideoxy DNA sequencing using [α -³⁵S] dATP (Amersham-Life Science) and Sequenase Quick-Denature plasmid sequencing kit (Amersham). Recombinant phage particles were purified from 2 l of 2 × YT by double

PEG/NaCl (20% (w/v) polyethylene glycol-8000, 2.5 M NaCl) precipitation and resuspended in Tris-buffered saline (TBS). Typical yields of phagemid/phage particles were 5×10^{11} and 5×10^{12} ml⁻¹ of culture medium, respectively.

2.2. Immunization of mice

Six-week-old female BALB/cAnN mice, bred in our animal facilities by brother–sister mating for over 20 generations, were used. All mice were housed, fed and handled under standard conditions according to current institutional guidelines. Three groups of six mice each were s.c. immunized with CPhV (5×10^{10} phage in 100 µl of TBS), M13 phage (5×10^{10} phage particles in TBS) or with TBS alone, respectively, on days 0, 12, 23 and 34.

2.3. Experimental challenge of mice with *T. crassiceps cysticerci*

The ORF strain of *T. crassiceps* (Manoutcharian et al., 1999) has been maintained by serial passage in BALB/cAnN female mice for over 15 years in our animal facilities. Metacystodes used in challenge infections were harvested from the peritoneal cavity of BALB/cAnN female mice. Ten small (diameter of approximately 2 mm), non-budding larvae were suspended in PBS and injected i.p. into each of the mice using a 27-gauge needle. Mice were challenged 15 days after the last booster injection and 7 weeks after infection the parasite load in each mouse was counted as described previously (Manoutcharian et al., 1999).

2.4. Immunization of pigs

Twelve piglets of mixed genetic background were produced and kept free of cysticercosis in the Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM, under controlled conditions.

Four groups of three pigs each at 10 months of age (at the beginning of the experiments) were used in the immunization trial. Four recombinant phages were pooled to obtain CPhV and used to immunize pigs s.c., or orally two times at 15-day intervals. One group was immunized with CPhV at a low dose (4×10^{11} phage in 1.5 ml of TBS) s.c., and the other two groups with CPhV, at a high dose (4×10^{12} phage)

administered s.c. or orally by pipette-feeding with phage in 1 ml of TBS. As controls, three pigs were each immunized s.c. with M13 phage at a high dose (4×10^{12} phage). Additional five 2-month-old piglets (kept separately from the 12 pigs) were each immunized with M13 phage at a high dose (4×10^{12} phage) s.c. and used as control to assess challenge assay.

Blood samples from all pigs were obtained from the jugular vein of each immunized pig before and at different days after vaccination (days 0, 7, 15, 30 and 45) to study the course of the humoral and cellular immune responses induced by the vaccine. To assess the persistence of phage in the gastrointestinal tract of pigs, phages were isolated from pig feces (days 15 and 45) by infecting TG-1 cells with 10–50 μ l of TBS containing freshly isolated fecal material after vortexing and microcentrifugation (total volume 0.5 ml). The phage titers, as colony-forming units (cfu), were determined by plating infected TG-1 cells on LB plates containing ampicillin and the phage identity was established by DNA sequencing.

The experiments reported herein were conducted according to the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, 1996.

2.5. Antibody detection by ELISA

The levels of antigen-specific antibodies (Abs) in immune sera from three individual pigs within each group were measured. To reduce non-specific binding of sera pig components, an enriched immunoglobulin fraction of the sera was precipitated by ammonium sulfate, chromatographed and diluted in 1 ml of 0.15 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, before assessment of serum antibody levels by ELISA (García et al., 2001). *T. solium* cyst fluid (*TsAg*) or the respective peptides (1 μ g per well) were used as an antigen. For *TsAg* collection, the cysticerci were dissected from skeletal muscle of pigs and collected in ice-chilled phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Immediately afterwards, the cysts were ruptured with scissor and vesicular fluid was collected. Calcium was removed by adding 50 μ l of ammonium oxalate (0.3 M) and 25 μ l of ammonia (1:3 v/v, in water) to each milli liter of vesicular fluid, centrifuging ($2000 \times g$, 4 min, at 20 °C), and discarding all precipitated

material. The supernatant was then collected and aliquoted and stored in liquid nitrogen. Final protein concentrations in the processed fluid were measured by the method of Lowry.

Flat-bottomed microtitration plates (96 well; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with antigens diluted in 0.2 M carbonate–bicarbonate buffer, pH = 9.6, for 60 min at 37 °C (each serum was tested in duplicate). The wells were washed and incubated with 100 μ l of porcine purified immunoglobulins diluted in 0.03% PBS–Tween (1:200), for 60 min at 37 °C. Abs were detected with 100 μ l of rabbit anti-pig IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis, MI, USA) diluted to optimum concentration (1:1000). As a substrate 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB, from Sigma) was used at 5 mg/ml. The color reaction was stopped using 1N H₂SO₄, 50 μ l per well, and absorbance values were measured at 450 nm in an ELISA reader (LP400, Pasteur Diagnostics, Paris, France).

To test whether pigs had anti-M13 Abs, ELISA was also performed. Plates were coated overnight with M13 phage solution in PBS (10^{10} pfu/ml). After blocking with PBS/3% BSA, pig sera were added (1:100) in duplicate and incubated 1 h at 37 °C. Alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-porcine IgG (Zymed, San Francisco, CA, USA) was added to the wells at 1:1000 and incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was developed with *para*-nitrophenylphosphate and absorbance was determined at 405 nm.

2.6. Cell proliferation assay and cytokine quantitation

PBMC were harvested from vaccinated and control pigs before (time 0) and 30 days after the second immunization using Ficoll-Hypaque gradient 1.077 (Sigma). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (0.2 mM), non-essential amino acids (0.01 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and FBS (10%). Cells were cultured with ConA (5 μ g/ml), with each of the three peptides (10 μ g/ml) or with *TsAg* at 10 μ g/ml and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in flat-bottomed microtiter plates, using 2×10^5 cells per 200 μ l of final volume. After 5 days, the cultured cells were pulsed for a further 20 h with 1 μ Ci per well of methyl [³H] thymidine (Amersham

Pharmacia Biotech, UK). Then the cells were harvested and the amount of incorporated label was measured in a 1205- β spectrometer (Wallac Oy, 20101 Turku 10, Finland). Assays were performed in triplicate and data are presented as stimulation indices (SI: the ratios of cpm from antigen-stimulated to matched, unstimulated cells). Supernatants from replicate cultures corresponding to samples from days 0 and 30 were collected after 72 h for cytokine determination. IFN- γ and IL-4 were measured by sandwich ELISA according to the manufacturer of the kit (Biosource International, CA). Absorbance values are reported in pg/ml.

The synthetic peptides prepared by stepwise solid-phase synthesis were purified as described previously (Manoutcharian et al., 1999; Huerta et al., 2001).

2.7. Experimental challenge of pigs with *T. solium* eggs

A specimen of *T. solium* was obtained from a fully informed and consenting human carrier in a village of Yucatán, Mexico, immediately after treatment with niclosamide (Yomesan, Bayer). Eggs for challenge were collected as previously reported (Huerta et al., 2001). Those pigs which received low doses of s.c. or oral vaccine (at 12 months of age), and the additional M13 phage immunized piglets (at 3.5 months of age) maintained separately and used as controls, were infected orally with 17,000 eggs per pig 45 days after the second dose of the vaccine. Two months later, number of cysticerci per pig was determined at necropsy as described previously (Huerta et al., 2001).

2.8. Histological examinations

Tissues containing cysticerci were sectioned (5 μ m) and stained with hematoxylin-eosin and the cysticerci were classified according to the inflammatory reaction and the magnitude of destruction as previously described (Aluja and de Vargas, 1988).

2.9. Statistical analysis

All statistical analysis were performed using GraphPad, Version 2.05 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between groups were analyzed by *t*-test or chi-square test when appropriate.

3. Results

3.1. Construction of recombinant phage and evaluation of its protective capacity against murine cysticercosis

To generate recombinant M13 phage expressing KETc1, KETc12, GK1 (Huerta et al., 2001) and KETc7 peptides (Manoutcharian et al., 1996), the DNA fragments coding for the corresponding sequences were cloned in phage/phagemid expression vectors. The KETc1 was displayed on M13 phage as a cpIII fusion at three to five copies per virus particle, while the three other antigens were expressed on the hybrid phage as M13 cpVIII fusions at 300–900 copies per phage (Willis et al., 1993). These phage clones designated as FKETc1, FKETc12, FGK1 and FKETc7 were purified separately, pooled and then used as an anti-cysticerci phage vaccine (CPhV) in immunization trials. To increase the representation of KETc1 peptide, FKETc1 was included in the mixture 30 times more than other constructs.

First, the protective capacity of CPhV vaccine was tested against experimental murine cysticercosis. There were significant differences in the total number of cysticerci recovered between control mice which received M13 only (990 cysts) and CPhV-immunized mice (338 cysts). Interestingly, no cysticerci were found in four of the six vaccinated mice.

3.2. Immune response to phage vaccination in pigs

Two groups of pigs were immunized with CPhV containing 4×10^{12} phage (high dose) in TBS by s.c. injection or were orally pipette-fed, two times at 15-day intervals. Another group was immunized s.c. with a low dose of CPhV (4×10^{11} phage) and the control group received 4×10^{12} M13 phages s.c.

To test whether phage displayed antigens induced the production of specific Abs against peptides as well as against *T. solium* total antigens (*TsAg*), the porcine sera were tested for IgG by ELISA. No specific antibodies were detected against *TsAg*, KETc1, GK1 or KETc12 (data not shown). Phage-specific Abs in the sera of all pigs were also measured to determine the immunogenicity of M13 phage itself and high level of anti-M13 antibodies were detected

Table 1
Antibody levels against M13 phage detected by ELISA^a

Days after immunization	Pigs immunized with			
	M13 phage	CPhV		Oral
		Subcutaneous		
		Low dose	High dose	
0	0.25 ± 0.007	0.29 ± 0.006 ^b	0.37 ± 0.005	0.34 ± 0.029
7	0.56 ± 0.016*	0.58 ± 0.005*	1.17 ± 0.006*	0.49 ± 0.019
15	1.17 ± 0.001*	0.47 ± 0.006*	1.25 ± 0.009*	0.51 ± 0.002*
30	1.19 ± 0.004*	1.12 ± 0.014*	1.17 ± 0.004*	1.09 ± 0.079*
48	0.89 ± 0.062*	1.20 ± 0.072*	1.25 ± 0.077*	0.65 ± 0.082*

^a Four groups of pigs were immunized s.c. or orally with 4×10^{12} of CPhV two times at 15-day intervals or with M13, s.c. Anti-M13 phage Abs were measured in pooled sera of each group of the immunized pigs. Data are the mean ± S.D. of two determinations, each one tested in duplicate.

^b Pigs from this group received low dose (4×10^{11} phage) of CPhV.

* Significantly increased responses ($P < 0.05$) compared with the values before the immunization (Student's *t*-test).

in all pigs albeit with some differences (Table 1). The s.c. immunization at a high dose (4×10^{12}) induced high levels of Abs as soon as 7 days after immunization. To assess the persistence of phages in gastrointestinal tract of the pigs, cell-free phage particles from the feces of immunized animals were isolated on days 15 and 45. Surprisingly, recombinant phages were found not only in the samples of orally immunized pigs, but also in samples from animals of other groups. The phage titers tended to decline from 10^4 cfu/ml to 50–100 cfu/ml and at day 45 the titers of phage from CPhV-immunized pigs were 10–100 times higher compared to those from M13-immunized control group. Phage clones from individual pigs (five pigs in total) were sequenced: all eight clones were FGK1 obtained from two s.c. low dose CPhV-immunized animals, the same eight clones were found in two pigs from the control group and 4 FKETc12 clones were detected in one orally immunized pig (data not shown). This evidence suggests that the close contact of orally immunized pigs with control pigs relates to the finding of recombinant phages in the gastrointestinal tracts of control pigs.

To study the cellular immune responses, PBMCs were collected from vaccinated pigs before and at different times after immunization and tested in a lymphoproliferation assay. The stimulation index was calculated as the mean cpm of stimulated cells per mean of non-stimulated control cells. Peptide and *TsAg*-specific lymphocyte proliferation was detected

when PBMCs from CPhV-immunized pigs were stimulated by the different antigens tested. No specific proliferative response was observed in pigs immunized with only M13 phage. The highest stimulation index induced by *TsAg* or synthetic peptides was observed 15 days after the boost with CPhV (Fig. 1). To further analyze the elicited immune response, the levels of IL-4 and IFN- γ cytokines were measured in supernatants 3 days after in vitro stimulation of cultured PBMCs. A clear increase in IFN- γ was detected in the supernatants after specific stimulation. IFN- γ was not detected in supernatants from cells obtained before immunization or cells from control pigs (Fig. 2). In the same supernatants, increased levels of IL-4 were detected in most of the pigs immunized both with M13 and with the recombinant phages (Fig. 3). Thus, these data suggest that immunization with CPhV induced a mixed Th1/Th2-type response.

3.3. Effect of phage immunization on *T. solium* challenge

To test the protective capacity of phage vaccine against pig cysticercosis, pigs immunized either with oral or low dose s.c. CPhV vaccine, were experimentally challenged with *T. solium* eggs. Only these two groups were infected because of the limited number of *T. solium* eggs available and because of our intent to determine whether low dose s.c. immunization could

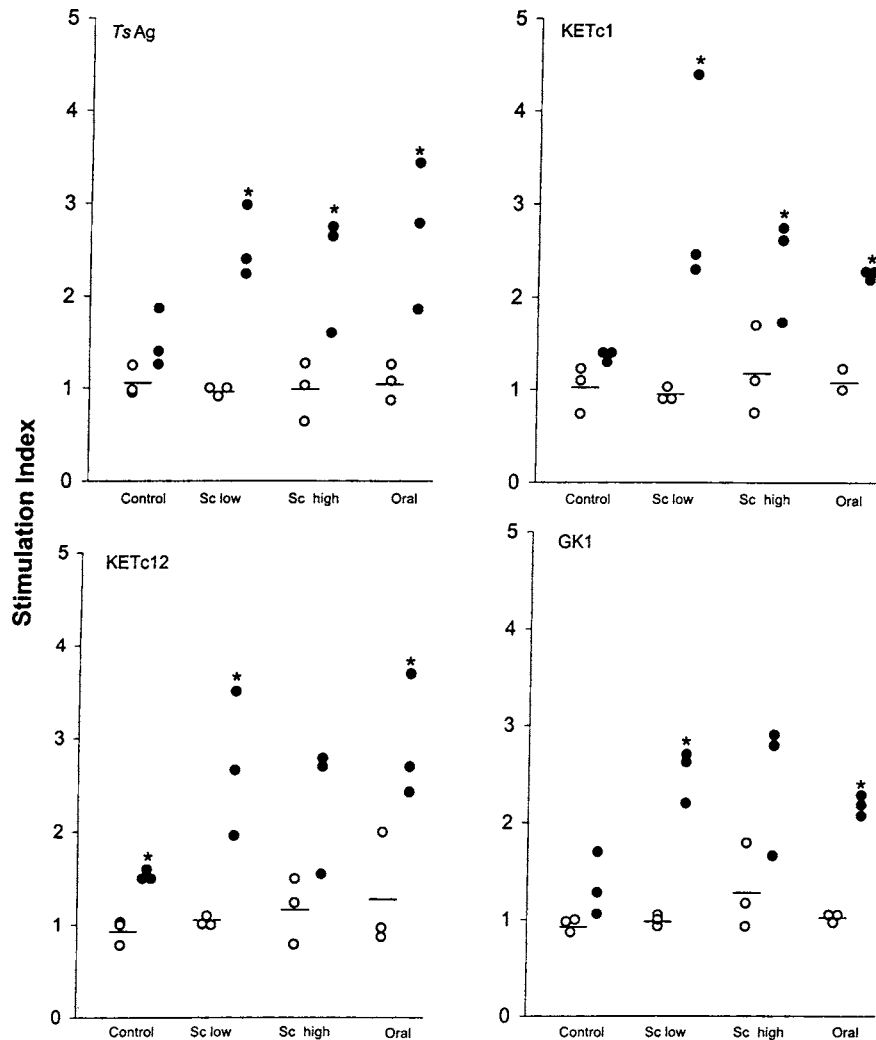


Fig. 1. PBMC proliferative responses in control and vaccinated pigs. Two groups of pigs (three animals in each) were immunized with 4×10^{12} of CPhV phage s.c. (Sc high) or orally, one group received low dose (4×10^{11}) of CPhV (Sc low) and the control group received high dose (4×10^{12}) of M13 phage. PBMCs were collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles) and cultured 5 days in the presence of *TsAg* and three peptides ($10 \mu\text{g/ml}$). Labeled thymidine incorporation was measured and stimulation indexes were calculated as the ratios of the mean cpm from antigen-stimulated to matched non-stimulated cells. Assays were performed in triplicate. The bars indicate median cell values of cpm from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the index before immunization.

be sufficient to induce protection and whether oral immunization could be equally effective. An additional group of five pigs maintained separately from phage immunized animals was used as a control. As shown in Table 2, s.c. immunized pigs showed reduced number of cysticerci compared with control animals, and one of them was completely protected. Two out

of three orally immunized pigs exhibited reduced number of cysticerci and 474 cysticerci were recovered from the third pig. However, 86% of them were macroscopically damaged. Despite the small number of pigs tested, these results point to a protective immunity induced in pigs against cysticercosis by the CPhV vaccine.

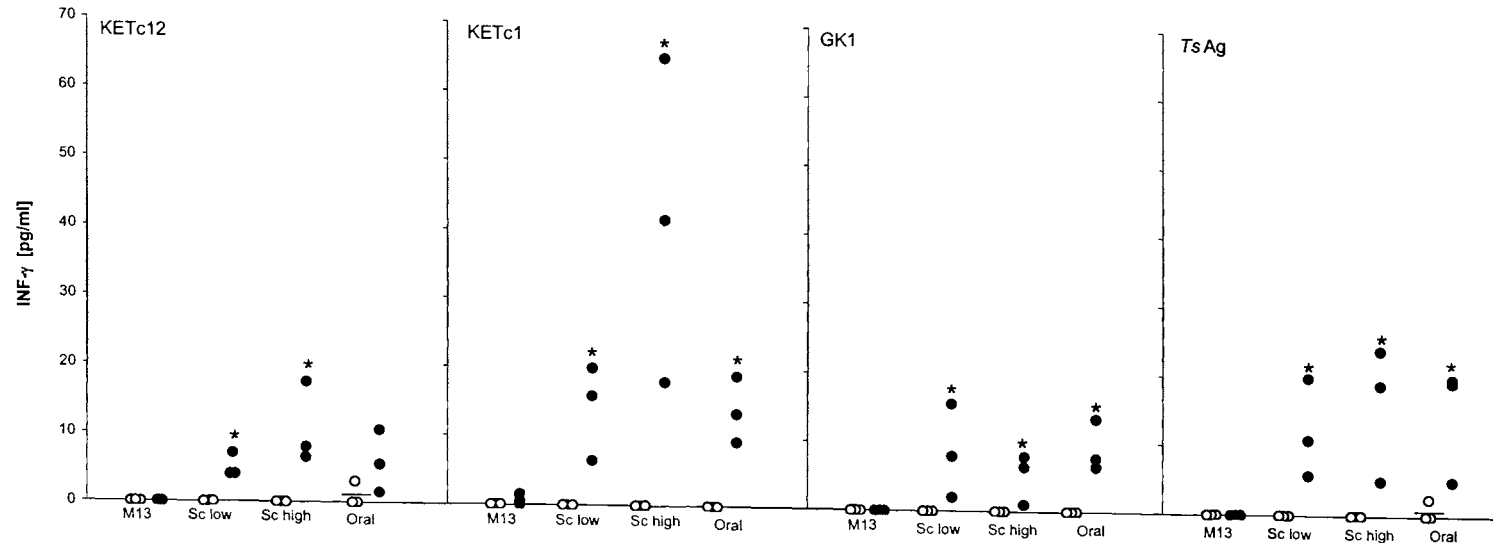


Fig. 2. Detection of IFN- γ in cultured PBMCs. The levels of IFN- γ were measured in supernatants from cultured PBMCs collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles). Cells were cultured 5 days in the presence of *TsAg* and three peptides (10 μ g/ml). Groups and symbols correspond to those described in the Fig. 1. The bars indicate median cell values of IFN- γ from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the IFN- γ levels before immunization.

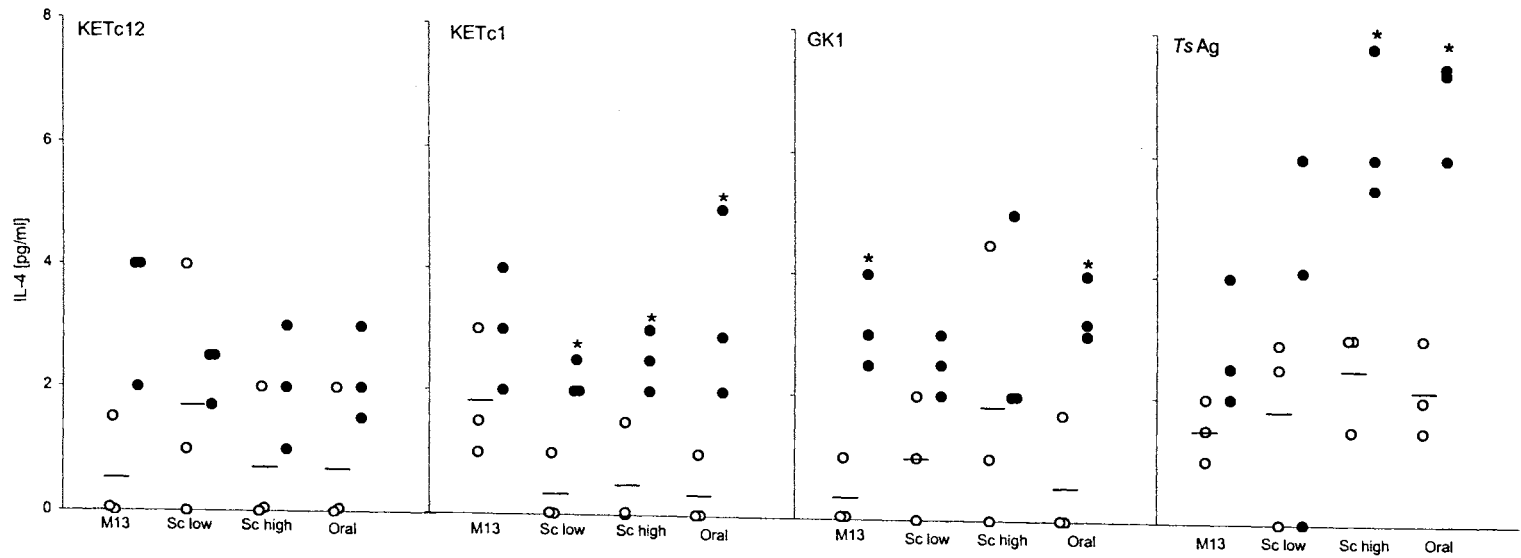


Fig. 3. Detection of IL-4 in cultured PBMCs. The levels of IL-4 were measured in supernatants from cultured PBMCs collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles). Cells were cultured 5 days in the presence of *TsAg* and three peptides (10 $\mu\text{g/ml}$). Groups and symbols correspond to those described in the Fig. 1. The bars indicate median cell values of IL-4 from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the IL-4 levels before immunization.

Table 2
Effect of phage immunization upon the parasite load^a

Pigs immunized with		
M13	CPhV	
Subcutaneous	Oral	Subcutaneous (low dose)
91 ^b (73/18) ^c	31 (3/28)	11 (1/10)
164 (154/10)	474 (65/409)	0
246 (57/189)	53 (24/29)	36 (23/13)
514 (512/2)		
580 (580/0)		

^a Three pigs from each group were s.c. or orally immunized twice at 15-day intervals with CPhV. Control group received only the M13 phage. Forty five days after the second application of phage, pigs were orally challenged with 17,000 *T. solium* eggs. Two months later, pigs were sacrificed and the parasite load was counted.

^b Individual number of cysticerci recovered from each pig.

^c Number of vesicular/necrotic cysticerci.

3.4. Histological examination

Cysticerci in different stages of viability were recovered from skeletal muscle and liver including adjacent tissues of control and immunized infected pigs. Cysticerci recovered from CPhV-immunized pigs were histologically examined and were found to be at different degrees of degeneration (Fig. 4). Considering the severity of the tissue inflammatory response and the state of the larval degeneration, most inspected lesions were scored as grades 4 or 5 according to the previously published classification (Aluja and de Vargas, 1988). Cysticerci found in the liver of vaccinated pigs were shown to be completely destroyed within a granulomatous zone (grade 6). Cysticerci from control pigs were surrounded by a discrete to moderate inflammatory response mainly based on lymphocytes, plasma cells and eosinophils and were scored as grades 1–3 according to the previous classification reports (Aluja and de Vargas, 1988).

4. Discussion

Herein, we showed the protective capacity of a vaccine based on recombinant M13 phage expressing KETc1, KETc12, KETc7 and GK1 sequences (CPhV)

against experimental murine cysticercosis. It was also demonstrated that CPhV could effectively elicited specific cellular but not humoral immune response, the former seems to be protective in pigs against *T. solium* cysticercosis.

The antigen delivery on M13 phages has important advantages compared with synthetic peptide vaccine reported by our group previously (Huerta et al., 2001; Sciutto et al., 2000): they can be easily and cost-effectively produced in large-scale since they are secreted from the infected bacterial cells nearly free of intracellular components; the phage surface density is 200–400 m²/g and the fusion peptides comprise up to 25% by weight of the phage and subtend up to 50% of its surface area (Petrenko and Smith, 2000). Furthermore, phages are resistant to heat and to many organic solvents and chemicals as well as other stresses (Petrenko and Smith, 2000) and, most importantly, phage particles are highly immunogenic not requiring of adjuvant for their application as immunogens. All these properties are important for the development of vaccines for large-scale application. Considering these properties, phage display has recently called attention of research groups working in the field of vaccine development against many diseases, such as infections with HIV-1 (Scala et al., 1999; De Berardinis et al., 2000), hepatitis C virus (HCV) (Puntoriero et al., 1998) or Alzheimer's disease (Frenkel and Solomon, 2002). In addition, it is possible to improve phages as antigen delivery systems given that significant progress has been made in the engineering of M13 phage mutant coat proteins, including completely artificial ones, thus expanding the utility of phage display technology in general and the phage vaccine concept, in particular (Roth et al., 2002; Sidhu, 2000).

Cysticercosis is a highly prevalent disease that causes a severe neurological illness in humans in the developing world (White, 1997; Sciutto et al., 2000). In order to prevent this disease different strategies have been considered based on social development (Joshi et al., 2001; Vazquez-Flores et al., 2001) and/or biological interventions (Pawlowski, 1990; Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Lightowers et al., 2000). During the last two decades, our research group has focused on the development of an effective, stable and low-cost vaccine against porcine cysticercosis. Clearly, vaccination of the pigs (the intermediate hosts of *T. solium*) could hinder the

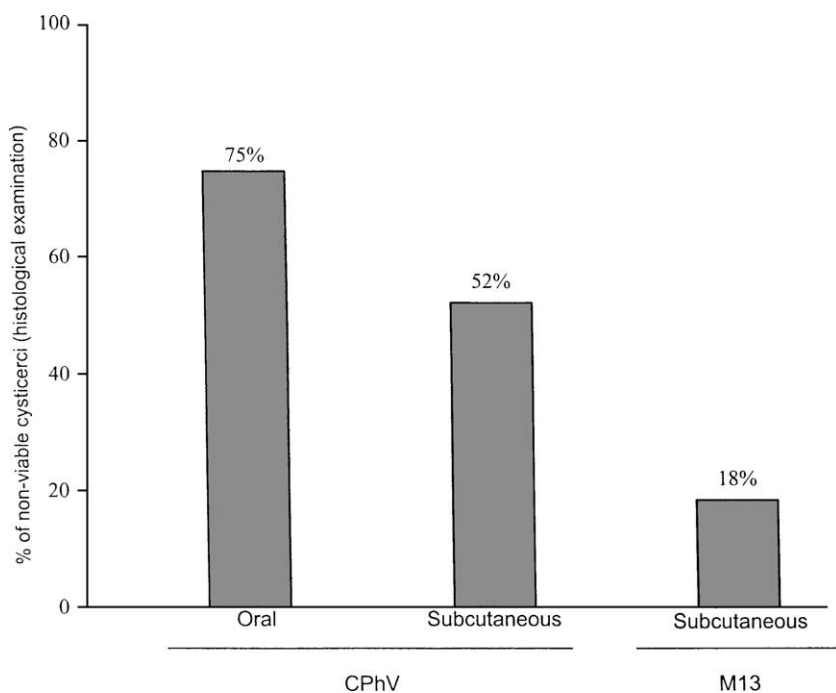


Fig. 4. Percentage of non-viable cysticerci detected by histological examinations. Cysticerci were classified according to the inflammatory response surrounding them and the different degrees of degeneration. Non-viable cysticerci were surrounded by a severe inflammatory response. Pigs were immunized with 4×10^{12} of CPhV phage orally, 4×10^{11} of CPhV s.c. and 4×10^{12} of M13 phage s.c. (control group). Percentage of damaged cysticerci were significantly lower in those subcutaneously or orally immunized ($P < 0.0001$, chi-square test).

transmission cycle of the parasite and thus reduce the infection pressure upon humans and improve the economy of rural pig rearing. Different complex antigen mixtures from cysticerci and oncosphere have been proposed as a source of vaccine (Lightowers et al., 2000). However, limitations on the supply and quality control of these antigens prevent the broad application of such vaccines. On the other hand, the use of defined recombinant antigens offers the greatest potential for overcoming these limitations. We report in this article the immunogenic and protective properties of the CPhV vaccine with the perspective of application of phage particles as vaccines against porcine cysticercosis. Importantly, CPhV vaccine induced strong protection against *T. crassiceps* cysticercosis and showed promising results against porcine cysticercosis. However, this experimental trial with very few pigs can hardly claim to represent realistic transmission conditions (i.e. in dose and frequency of challenge, heterogeneous genetic background, nutritional status of pigs, heterogeneous

stress). After these experimental measurements of the effects of vaccination, a controlled field trial followed by a thorough post-mortem study of viable and damaged cysticerci was considered mandatory to evaluate the effect of the vaccine on the prevalence and intensity of pig cysticercosis in highly endemic rural areas.

Regarding the immunogenic capacity of the CPhV vaccine, we showed that it elicited a mixed Th1/Th2 immune response with a peptide/antigen-specific proliferative responses and the production of IFN- γ and IL-4 in supernatants from cultured PBMCs from immunized pigs (Figs. 1–3). This mixed Th1/Th2 response elicited by phage immunization has been further confirmed by detailed analysis of Ig subtypes in mice immunized with wild type M13 as well as recombinant M13 bearing different peptides (our unpublished data). However, in our recent study of the immune response in pigs immunized with tri-peptide synthetic vaccine using saponin as adjuvant we demonstrated a strong Th1 response but not Th2

response (Diaz et al., 2003), and these results point to the role of the phage in inducing a mixed Th1/Th2 response in pigs immunized with phage.

The immunogenicity of the phage could be the result of the display of peptides/proteins in the context of the highly ordered array of repetitive elements on the phage surface similar to human papillomavirus-like particles, which are currently under development as vaccine vehicles (Schiller and Lowy, 2001). It should be possible to improve vaccine potency considering recently published results in which much higher doses of phages were used (2×10^{14} particles) in five applications with QS21 adjuvant to protect the animals against AIDS-like disease progression (Chen et al., 2001).

An interesting finding was the persistence of the recombinant phage in the gastrointestinal tract of pigs 45 days after the immunization. These phages were found not only in orally vaccinated pigs, but also in some pigs in other groups, indicating an active dissemination of phage through those orally infected, since all pigs were in close contact during the experiment. Although further research is needed to propose the use of the infective recombinant phages in field trials, this result points to the possibility of an easy alternative to effectively disseminate the vaccine in the exposed population of pigs, thus increasing the possibility of the success of control programs. However, one should also consider the possible negative effects of dissemination of phage between animals in uncontrolled ways. The possibility of application of recombinant phages without undesirable effects seems feasible considering the extensive experience of the application of human phage therapy in several European countries for many decades (Sulakvelidze et al., 2001; Summers, 2001). For instance, lytic phages, capable of completely lysing the bacteria being treated, such as *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Esherichia*, *Shigella* and *Salmonella* species, have been used as antibacterial agents in humans in the past and there is an interest and clear need for the development of antibacterial phages (Biswas et al., 2002). Moreover, bacteriophage phiX174 was recently used to immunize HIV-infected patients for the evaluation of CD4+ T-cell function in vivo (Fogelman et al., 2000). Nevertheless, we are currently using in all trials UV-treated non-infective phage according to our institutional guide.

In summary, the present work points toward the use of modified phage particles as powerful recombinant vaccine components, although their application deserves further studies. Currently, a large-scale vaccination field trial using ultraviolet-inactivated recombinant phages is under way to determine whether CPhV can be used as an accessible vaccine to be included in a control program against pig cysticercosis in endemic rural areas of Mexico.

Acknowledgements

This study was supported by CONACyT, Mexico, 3581-M and G25955, DGAPA, Mexico, 212401, Coordinación de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social, The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Italy, CRP/MEX02-01 and The Howard Hughes Medical Institute. The authors thank the support received from Dr. Pablo Hernández Jauregui and the technical assistance of Natalia Copitin, Marisela Hernández and Marco Ambriz.

References

- Aluja, A.S., de Vargas, G., 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28, 65–77.
- Bastien, N., Trudel, M., Simard, C., 1997. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology* 234, 118–122.
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., Merrill, C.R., 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70, 204–210.
- Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T.W., Justement, J.S., Cohen, O.J., vanCott, T.C., Iwanicki, M., Lewis, M.G., Greenhouse, J., Tarry, T., Venzon, D.A., Fauci, A.S., 2001. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage displayed epitopes. *Nat. Med.* 7, 1225–1231.
- De Berardinis, P.D., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R.N., Pozzo, G.D., Guardiola, J., 2000. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat. Biotech.* 18, 873–876.
- De la Cruz, V.F., Lal, A.A., McCutchan, T.F., 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 263, 4318–4322.

- Diaz, M.A., Villalobos, N., de Aluja, A., Rosas, G., Gomez-Conde, E., Hernández, P., Larralde, C., Sciutto, E., Fragoso, G., 2003. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 81–90.
- Fogelman, I., Davey, V., Ochs, H.D., Elashoff, M., Feinberg, M.B., Mican, J.A., Siegel, J.P., Sneller, M., Lane, H.C., 2000. Evaluation of CD4+ T-cell function in vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J. Infect. Dis.* 182, 435–441.
- Frenkel, D., Solomon, B., 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 16, 5675–5679.
- García, G., Sciutto, E., Fragoso, G., Cruz, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., Aluja, A., José, M.V., Larralde, C., 2001. Inhibitory role of Abs in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.* 87, 582–586.
- Grabowska, A.M., Jennings, R., Laing, P., Darsley, M., Jameson, C.L., Swift, L., Irving, W.L., 2000. Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology* 269, 47–53.
- Huerta, M., de Aluja, A.S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Díaz, A., Alvarez, I., Avila, R., Beltrán, C., García, G., Martínez, J.J., Larralde, C., Sciutto, E., 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20, 262–266.
- Joshi, D.D., Poudyal, P.M., Jimba, M., Mishra, P.N., Neave, L.A., Maharjan, M., 2001. Controlling *Taenia solium* in Nepal using the PRECEDE-PROCEED model. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 32 (Suppl. 2), 94–97.
- Lightowers, M.W., Flisser, A., Gauci, C.G., Heath, D.D., Jensen, O., Rolfe, R., 2000. Vaccination against cysticercosis and Hydatid disease. *Parasitol. Today* 16, 191–196.
- Lightowers, M.W., 2003. Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop.* 87, 129–135.
- Magliani, W., Polonelli, L., Conti, S., Salati, A., Rocca, P.F., Cusumano, V., Mancuso, G., Teti, G., 1998. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat. Med.* 4, 705–709.
- Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cano, A., Almagro, J.C., 2001. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2, 217–223.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Sciutto, E., 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82, 250–254.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodríguez, M., Govezensky, T., 1999. Phage displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: as effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 4764–4770.
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R., Galfrè, G., 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol.* 154, 3162–3172.
- Molinari, J.L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F., Solano, S., 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69, 55–63.
- Nascimento, E., Costa, J.O., Guimaraes, M.P., Tavares, C.A., 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 127–137.
- Pawlowski, Z.S., 1990. Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis. *Acta Trop.* 48, 83–88.
- Petrenko, V.A., Smith, G.P., 2000. Phage from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng.* 13, 589–592.
- Puntoriero, G., Meola, A., Lahm, A., Zucchelli, S., Ercole, B.B., Tafi, R., Pezzanera, M., Mondelli, M.U., Cortese, R., Tramontano, A., Galfrè, G., Nicosia, A., 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J.* 17, 3521–3533.
- Rodi, D.J., Makowski, L., 1999. Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87–93.
- Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M.A., Rosales, R., Sciutto, E., 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 84, 516–523.
- Roth, T., Weiss, G., Eigenbrot, C., Sidhu, S., 2002. A minimized M13 coat protein defines the requirements for assembly into the bacteriophage particles. *J. Mol. Biol.* 13, 357–367.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J.N., O’Cohen, J., Vaccarezza, M., Igarashi, T., Fauci, A.S., 1999. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J. Immunol.* 162, 6155–6161.
- Schiller, J.T., Lowy, D.R., 2001. Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1, 571–581.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890.
- Sidhu, S.S., 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 610–616.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G., 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chem.* 45, 649–659.
- Summers, W.C., 2001. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 437–451.
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias, C.K., Vazquez, R., Terrazas, I., Sciutto, E., 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protect mice

- against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 2522–2530.
- Vazquez-Flores, S., Ballesteros-Rodea, G., Flisser, A., Schantz, P.M., 2001. Hygiene and restraint of pigs is associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Publica Mex.* 43, 574–576.
- White Jr., A., 1997. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.* 24, 101–113.
- Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128, 79–83.