



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" I Z T A C A L A "

EMPLEO DE PEPTIDOS RECOMBINANTES DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis* EN EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS PORCINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A .

NARCY GUADALUPE ARIZMENDI PUGA



OCTUBRE 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO
2 DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N. BAJO LA DIRECCION DE
LA DRA. en C. Ma. GUADALUPE ORTEGA-PIERRES Y DE LA
DRA. en C. LILIAN YEPEZ MULIA.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ma. Guadalupe Ortega-Pierres el haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia en el Lab. 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV así como el apoyo recibido para la realización y la revisión de este trabajo de Tesis.

Agradezco a la Dra. Lilián Yépez Mulia la asesoría en la realización y revisión de este trabajo de Tesis así como la constante ayuda y apoyo, de igual manera agradezco su amistad invaluable.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 2 , Noemí, Rocio, René, Rosario, Lilia, Ana, Fatima, Elena, Maricela, Blanca, Raúl, Arturo y Marco por su ayuda y por su amistad.

A mis revisores de tesis, por sus atinadas observaciones.

A mis Tios Lulú y Jorge por su apoyo constante e incondicional sin el cual no hubiese llegado hasta aquí.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con todo mi agradecimiento, cariño, respeto y admiración a mi tía Ma. de Lourdes Arizmendi por haber creído siempre en mí y por todo el apoyo y cariño recibido a lo largo de toda mi vida.

A mis padres Gloria y Miguel por su apoyo y ayuda constante y por quienes soy lo que soy.

A mi abuelita Esperanza Guillén, por todo su cariño y apoyo.

A mis hermanos y primos Carlos, Miguel, Ivonne, Gina, Liliana, Jorge, Cristian, Edgar y Limbania por todo su cariño y como un estímulo en su vida.

A mi tío Francisco, por todos sus consejos.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia por toda su ayuda y dedicación hacia mi persona.

A Ramsés como muestra de mi amor y agradecimiento por toda tu ayuda y dedicación y por todos los momentos compartidos. Así como por tu invaluable cariño y amistad.

EMPLEO DE PEPTIDOS RECOMBINANTES DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis EN EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS PORCINA.

INDICE

	página
i. Abreviaturas.....	9
ii. Indice de Tablas.....	11
iii. Indice de Figuras.....	12
iv. Indice de Gráficas.....	14
I. INTRODUCCION.....	15
1. Biología de <u>Trichinella spiralis</u>	17
A. Ciclo de vida de <u>T. spiralis</u>	18
B. Sintomatología.....	20
C. Inmunología de <u>T. spiralis</u>	22
a) Antígenos de secreción-excreción.....	23
b) Antígenos de superficie/esticosoma.....	26
2. Diagnóstico de triquinelosis.....	31
A. Diagnóstico molecular de enfermedades parasitarias.....	36
B. Antígenos recombinantes en el diagnóstico de triquinelosis.....	39
II. OBJETIVOS GENERALES.....	43
A. Objetivos Particulares.....	44
III. MATERIAL Y METODOS.....	46
1. Mantenimiento del ciclo de vida de la larva muscular de <u>T. spiralis</u>	46
2. Infección de ratones con la larva muscular de <u>T. spiralis</u>	46
3. Obtención del extracto total de la larva muscular de <u>T. spiralis</u>	47

4.Purificación de los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	47
5.Determinación de proteínas con el reactivo de Fenol según Folin (ENSAYO DE LOWRY MODIFICADO).....	49
6.Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE).....	50
7.Inmunoelctrotransferencia.....	51
8.Extracción del ADN de la clona recombinante Ts-3.....	52
9.Liberación del inserto de ADN de la clona Ts-3 de la larva muscular de <i>T. spiralis</i>	53
10.Electroforesis en geles de agarosa para el análisis de ADN.....	53
11.Linearización del ADN del plásmido pGEX-3X.....	54
12.Desfosforilación del ADN del plásmido pGEX-3X.....	55
13.Ligación del inserto de ADNc de la clona Ts-3 al vector pGEX-3X.....	55
14.Preparación de las células competentes DH5 α	55
15.Transformación de las células competentes DH5 α	56
16.Extracción rápida del ADN de células transformadas.....	57
17.Aislamiento del ADN de las clonas recombinantes seleccionadas.....	57
18.Restricción del ADN de las clonas recombinantes seleccionadas.....	58
19.Inducción de la expresión del péptido recombinante de <i>T. spiralis</i>	58
20.Preparación del extracto celular de las clonas recombinantes.....	59
21.Purificación del péptido recombinante de <i>T. spiralis</i>	59
22.Análisis electroforético de los extractos celulares y de los péptidos recombinantes (SDS-PAGE) de la clona 3.11.....	60
23.Sueros de Cerdos.....	60

	página
24.Ensayo de ELISA.....	60
IV. RESULTADOS.....	62
V. DISCUSION.....	82
VI. CONCLUSIONES.....	91
VII. APENDICES.....	92
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	99

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario.
ASB	Albúmina sérica bovina.
ARNasa A	Ribonucleasa Pancreática.
ADNasa I	Deoxirribonucleasa Pancreática.
ATP	Adenosin trifosfato.
Bisacrilamida	N'N'-metilen-bis-acrilamida.
D. O.	Densidad óptica.
EDTA	Etilendinitrilotetracetato.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa sólida.
IET	Inmunoelectrotransferencia.
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactosido.
kDa	Kilodaltones.
M	Molar.
mM	milimolar.
nm	nanómetros.
µg	microgramos.
µl	microlitros.
PEG	Polietilenglicol.
SDS	Sodio duodecil sulfato.
TLCK	N-α-p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona.
TPCK	L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona.
PBS	Amortiguador de fosfatos salino.
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluorido.
TEMED	N'N'N'N'-Tetrametiletilediamina.

T. A.	Temperatura ambiente.
Tween 20	Polioxietilenesorbitan monolaurato.
ufp	Unidades formadoras de placas.
U	Unidades de enzima.

INDICE DE TABLAS

	página
TABLA 1.	17
Principales nematodos que parasitan a humanos y animales domésticos.	
TABLA 2.	21
Síntomas clínicos de la triquinelosis.	
TABLA 3.	22
Criterios para el diagnóstico de triquinelosis.	
TABLA 4.	25
Número de parásitos recuperados de ratones inmunizados con los productos de secreción-excreción crudos de la larva muscular de <u>Trichinella spiralis</u> o con los antígenos Ts49 y Ts53 purificados con el anticuerpo monoclonal 7C2C5.	
TABLA 5.	30
Clasificación de los antígenos de <u>Trichinella spiralis</u> de acuerdo al consenso realizado en el Taller Internacional de Bilthoven (1991) (Holanda).	
Tabla 6.	76
Reactividad de los sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con <u>T. spiralis</u> hacia el péptido recombinante expresado por la clona 3.11 en ensayos de ELISA	
TABLA 7.	77
Sensibilidad del ensayo de ELISA con la proteína recombinante de <u>T. spiralis</u> empleando muestras de sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con <u>T. spiralis</u> .	
TABLA 8.	78
Análisis de la especificidad de la proteína recombinante de <u>Trichinella spiralis</u> en el diagnóstico de triquinelosis porcina empleando sueros de cerdos infectados con otros parásito.	

INDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1.	19
Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	
Figura 2.	23
<i>Trichinella spiralis</i> .	
Figura 3.	34
Valores de densidad óptica obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdo infectados naturalmente con <i>T. spiralis</i> provenientes de diferentes localidades: Paso de Ovejas, Veracruz, Paracho, Michoacán y Toluca, Edo. de México.	
Figura 4.	35
Inmunoelectrotransferencia con sueros de cerdos infectados con <i>Trichinella spiralis</i> .	
Figura 5.	38
Mapa genómico del plásmido pGEX-3X.	
Figura 6.	63
Análisis electroforético del extracto total de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	
Figura 7.	64
Análisis electroforético de antígeno purificados de superficie/esticosoma de la larva muscular.	
Figura 8.	65
Análisis electroforético del ADN de la clona Ts-3.	
Figura 9.	67
Análisis electroforético del ADN de 9 clonas recombinantes.	
Figura 10.	68
Análisis electroforético del ADN de las clonas recombinantes seleccionadas.	

	página
Figura 11.	69
Análisis electroforético del ADN de la clona 3.11 restringida con Eco RI.	
Figura 12.	70
Análisis electroforético del lisado total de la clona recombinante 3.11.	
Figura 13.	71
Análisis electroforético proteína recombinante expresada por la clona 3.11.	
Figura 14.	72
Análisis del reconocimiento de antígenos de la larva muscular de <u>Trichinella spiralis</u> por sueros de cerdos infectados con el parásito mediante IET.	
Figura 15.	81
Ensayos de IET para determinar el reconocimiento del peptido recombinante por muestras de sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito.	

INDICE DE GRAFICAS

	página
Gráfica 1.	74
Valores de densidad óptica (D. O.) obtenidas en ensayos de ELISA empleando sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito.	
Gráfica 2.	75
Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados con el parásito diluidos 1:100 y empleando el peptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml.	
Gráfica 3.	79
Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados con <u>T. spiralis</u> provenientes de rastro diluidos 1:100 y empleando el peptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml.	
Gráfica 4.	79
Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados experimentalmente con <u>T. spiralis</u> diluidos 1:100 y empleando el peptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml.	

INTRODUCCION

Los nematodos parásitos son los organismos responsables de enfermedades de gran importancia en los humanos y en animales domésticos. Desde el punto de vista de la inmunoparasitología es conveniente considerar separadamente a las especies que viven exclusivamente dentro de los tejidos de aquellos que habitan sólo en el intestino del hospedero. Los nematodos gastrointestinales tienen una alta prevalencia en humanos, infectando casi a un cuarto de la población del mundo, causando serias pérdidas económicas en ganado, ovejas y otros organismos (Wakelin y cols., 1993). Entre éstos se encuentran: Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Necator americanus, Ankylostoma duodenale y Trichinella spiralis. Estos parásitos presentan una amplia diversidad en cuanto a tamaño, biología y ciclo de vida. La infección en el hospedero puede ocurrir mediante la ingestión de huevecillos o larva infectiva (Ascaris, Toxocara, Trichostrongyles gastrointestinal, Trichuris), por penetración en la piel de la larva (Strongyloides), o por la ingestión de otros hospederos infectados (Angiostrongylus, Capillaria, Trichinella). (Tabla 1).

El desarrollo de estos parásitos depende en gran medida de la biología de cada uno de ellos, de este modo, la característica de los estadios infecciosos de todas las especies es principalmente de un tamaño relativamente pequeño (< 1 mm), pero el tamaño en los estadios adultos varía considerablemente, de unos milímetros (Strongyloides, Trichinella) hasta de varios centímetros (Ascaris).

TABLA 1.

Principales nematodos que parasitan a humanos y animales domésticos.

Nematodos	Estadio asociado con la enfermedad.	Localización de la enfermedad.
EN HUMANOS		
<u>Angiostrongylus</u>	Larva	Sistema Nervioso Central
	Adulto	Intestino
<u>Anisakis</u>	Larva	Intestino
<u>Ascaris</u>	Larva	Hígado, Pulmón
	Adulto	Intestino
<u>Capillaria</u>	Adulto	Intestino
<u>Strongyloides</u>	Larva	Tejidos
	Adulto	Intestino
<u>Toxocara</u>	Larva	Tejidos (ojos)
<u>Trichinella</u>	Larva	Músculo
	Adulto	Intestino
<u>Trichuris</u>	Adulto	Intestino
EN ANIMALES DOMESTICOS		
<u>Dictyocaulus</u>	Adulto	Pulmón
<u>Trichostrongyles</u>		
<u>Gastrointestinal</u>	Adulto	Intestino

Tomado de Wakelin y cols. (1993).

Un aspecto importante en todos los parasitos es el que poseen una cutícula de colágeno, la cuál proporciona al organismo cierto grado de protección contra el

ambiente fisicoquímico del hospedero, y contra algunos mecanismos protectores del mismo. La organización estructural de estas capas varía entre las especies, pero se ha encontrado que todas expresan moléculas antigénicas hacia las cuales el hospedero reacciona fuertemente. Asimismo se sabe que la cutícula de los parásitos es el blanco de ataque por macrofagos, granulocitos y plaquetas via citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En general, se conoce muy poco acerca del metabolismo de esos nematodos, pero se ha descrito que liberan varias moléculas, algunas de las cuales presentan una fuerte respuesta inmune hacia el hospedero. Esas moléculas están asociadas con la alimentación, penetración a los tejidos, excreción, reproducción y movilidad. En todos los estadios los nematodos son generalmente móviles y presentan un cambio en su conducta respecto a los cambios en su medio ambiente. Otros como Trichinella y Toxocara tienen estadios larvales en los cuales se les localiza dentro de los tejidos y es en contra de estos estadios hacia los que se generan las reacciones inflamatorias. (Wakelin y cols., 1993).

BIOLOGIA DE Trichinella spiralis.

El nematodo parásito Trichinella spiralis es el causante de la enfermedad conocida como triquinelosis y afecta principalmente a mamíferos carnívoros, constituyendo un problema de salud mundial tanto pública como veterinaria.

La enfermedad se transmite al humano principalmente mediante el consumo de carne de cerdo mal cocida infectada con la larva muscular de T. spiralis, aunque recientemente se tiene conocimiento que también carne de animales como el oso, caballo, camello, zorro, etc, es una fuente importante de la transmisión de la enfermedad al humano.

La triquinelosis es una enfermedad que se presenta en gran variedad de hospederos, incluyendo al hombre, en años recientes ha cobrado gran importancia debido al hecho de que las fuentes de transmisión en varios países no han sido

controladas adecuadamente, por lo cual, se han reportado brotes de triquinelosis en diversas zonas del mundo. (Martínez-Marañón, 1983, 1985; Pozio y cols., 1989; Hernández y cols., 1992).

En México se han conocido casos de triquinelosis desde finales del siglo pasado, sin embargo, no fue sino hasta la década de los años 70 que se empezaron a estudiar seriamente algunos brotes epidémicos, ocurridos en diferentes estados de la República Mexicana (Martínez-Marañón, 1983, 1985; Hernández y cols., 1992).

En uno de estos estudios realizado por Martínez-Marañón (1983) se encontraron 158 casos (3 defunciones) que fueron confirmados en su mayoría por biopsias y donde la fuente principal de infección fue, cuando se pudo detectar, carne de cerdo procesada en forma de chorizo o "al pastor".

En 1992 se reportaron 166 casos de triquinelosis aguda en Ciudad Delicias, Chihuahua, originada por el consumo de carne de cerdo elaborada y distribuida en forma de chorizo mal cocido. Cabe mencionar que el cerdo tenía el sello del Rastro Municipal de Cd. Delicias, (Hernández y cols., 1992). En base a esto, es evidente que es necesario que la detección de animales infectados por *T. spiralis* se realice de una manera más segura empleando métodos de diagnóstico más sensibles que la triquinoscopia (biopsia de músculo), la cual se emplea actualmente en los rastros.

Por otro lado, ya que el consumo de carne de cerdo es generalizada en todo el país, se debe poner especial interés en las condiciones de crianza del cerdo en algunas granjas o rastros, ya que estas son deficientes y la matanza clandestina ocurre con mucha frecuencia (Aluja, 1982).

CICLO DE VIDA DE *T. spiralis*.

Una vez que el hospedero ingiere la carne contaminada con el parásito, mediante la acción de enzimas y el ambiente estomacal las larvas musculares se liberan de la estructura conocida como célula nodriza. Después de 4 a 6 días de la ingestión de la

carne, las larvas musculares se establecen en el intestino delgado y el parásito sufre varias mudas hasta madurar a organismos hembras y machos adultos. Posteriormente se lleva a cabo la cópula, y las hembras liberan a las larvas recién nacidas las cuales atraviesan la mucosa intestinal y migran al músculo vía sangre o sistema linfático, al llegar al músculo 17 a 21 días después de la infección inicial penetran a las células musculares y se desarrollan a larva muscular, transformándose la célula muscular en célula nodriza (Fig. 1). Durante este cambio se agregan las mitocondrias, se alarga el núcleo, aparecen núcleos prominentes y se forma una cubierta gruesa de colágena, desarrollándose una compleja red de vénulas. La célula nodriza es una estructura que parece facilitar el transporte y almacenamiento de nutrientes tanto para la célula como para la larva muscular exportando los desechos metabólicos y productos derivados del parásito al espacio extracelular (Stewart, 1983).

Algunas veces las larvas pueden invadir el músculo liso y otros tejidos pero eventualmente mueren en esos sitios (Murrell, 1985a).

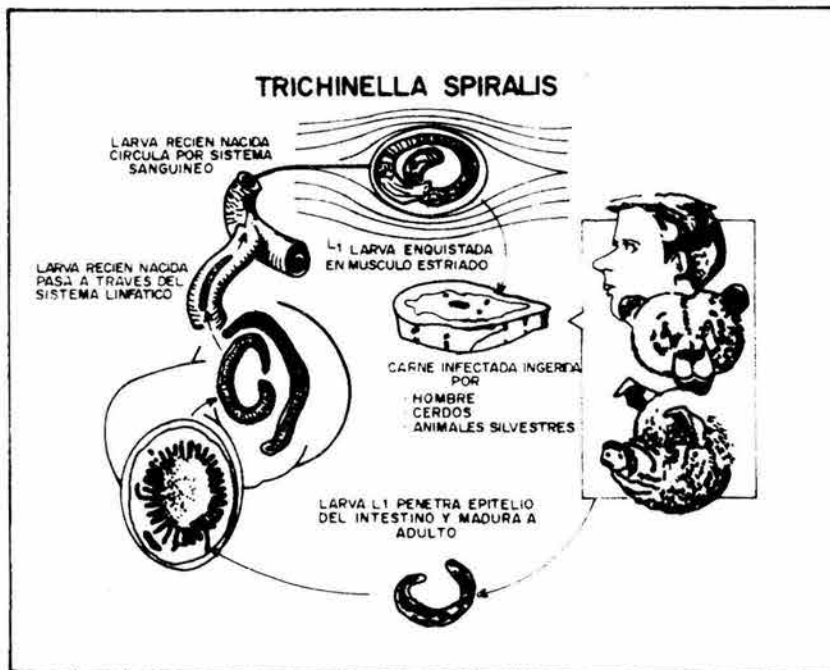


Fig. 1 Ciclo de vida de *T. spiralis*. Tomado de Murrell (1985a).

SINTOMATOLOGIA.

El grado de síntomas clínicos presentados durante la infección por *T. spiralis* depende del número de larvas ingeridas, así, la ingestión de 500 o más larvas puede producir una enfermedad de moderada a severa. Durante las primeras semanas de la infección se presentan signos gastrointestinales tales como náusea y dolor abdominal; subsecuentemente cuando la larva muscular ha penetrado las células musculares se presentan síntomas como dolor muscular, edema facial, fiebre y eosinofilia (Murrell, 1985). Algunas veces las larvas invaden el miocardio y causan la muerte casi inmediata de sus hospederos. Algunos de los síntomas clínicos presentados por los pacientes triquinelosos durante el brote sucedido en Cd. Delicias Chihuahua (Hernández y cols., 1992) se especifican en la Tabla 2.

La triquinelosis es una enfermedad en la cual los síntomas se pueden confundir con salmonelosis, dengue, mononucleosis infecciosa, intoxicación por metales o pesticidas, etc, el diagnóstico definitivo se establece mediante la observación directa del parásito en el músculo.

Recientemente se ha elaborado una lista de síntomas y signos específicos e inespecíficos útiles para el diagnóstico de la enfermedad. (Tabla 3).

Debido a que la enfermedad es escasamente diagnosticada y algunos de los síntomas presentados se comparten con otras parasitosis es importante el desarrollar métodos de diagnóstico de la triquinelosis que sean específicos y sensibles y que se puedan, asimismo, aplicar en la detección de animales parásitados con *T. spiralis* y de esta forma evitar su consumo por los humanos.

TABLA 2
Síntomas Clínicos

Síntoma	%
Síndrome febril	100
Ataque al estado general	100
Polimialgias	85.5
Edema palpebral	72.7
Cefalea	71.1
Edema conjuntival	64.4
Náuseas	60.2
Edema facial	57.8
Dolor abdominal	51.2
Vómito	47.6
Artralgias	46.4
Fotofobia	45.8
Conjuntivitis	42.4
Diarrea	39.7
Dolor óseo	39.1
Visión borrosa	36.1
Disfagia	19.9
Edema de manos	18.1
Edema de pies	12.6

Tomado de Hernández y cols. (1992).

TABLA 3

Criterios para el diagnóstico de triquinelosis.

Específicos	Inespecíficos
Mialgias generalizadas	Dolor abdominal
Mialgias oculares	Diarrea
Edema de párpados, cara y manos	Vómito
Postración	Pérdida de peso
	Exantemas

Tomado de Hernández y cols. (1992).

INMUNOLOGIA DE T. spiralis.

Trichinella spiralis tiene una asombrosa capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a varios mecanismos de inmunidad. Sin embargo, debido a la diversidad y a la estadio-especificidad de los antígenos que presenta (Ortega-Pierres y cols., 1984; Parkhouse y Ortega-Pierres, 1984; Philipp y cols., 1980; Silberstein, 1983) constituye un estímulo antigénico complejo para el hospedero, el que monta una respuesta humoral y celular específica (Wakelin y Denham, 1983).

ANTIGENOS DE T. spiralis.

Diversas moléculas derivadas de diferentes compartimientos del parásito se han identificado y caracterizado bioquímicamente, demostrándose que las moléculas de interés inmunológico presentes en el parásito son principalmente los productos de secreción-excreción (producidos por el esticosoma) y la superficie/esticosoma de la larva muscular de T. spiralis (Fig. 2) participando activamente en la inducción de

inmunidad protectora (Bell y cols., 1979; Silberstein, 1983; Ortega-Pierres y cols., 1989; Gamble y Graham 1984a).

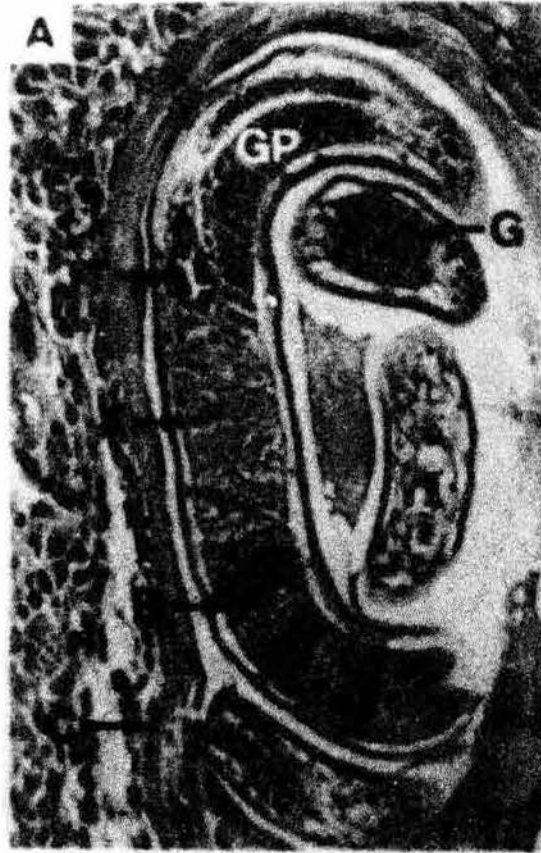


Figura 2. *Trichinella spiralis*. A) α - esticositos, B) β - esticositos, C) cutícula, G) intestino.

a) ANTIGENOS DE SECRECION-EXCRECION.

Despommier y Laccetti (1981a) reportaron el fraccionamiento de los antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* por medio de una columna de Sefacryl S-200. Así, en este estudio se demostró el uso de una fracción soluble (S3) de la larva muscular de *T. spiralis* en la inducción de protección en ratones. El empleo de esta metodología permitió obtener aproximadamente 20 antígenos con un punto isoeléctrico (pI) del rango de 4,0 a 9,0.

Asimismo, se han reportado otros estudios relacionados con la caracterización de antígenos protectores, en ellos el material activo fue aislado del esticosoma de la larva muscular por medios bioquímicos (Despommier y Laccetti, 1981b; Despommier, 1981) o a través de anticuerpos monoclonales (Silberstein y Despommier, 1984; Gamble, 1985b), lo cual ha permitido evaluar la participación de estos componentes específicos en la inmunidad contra la infección por *T. spiralis*. De estos anticuerpos monoclonales, Silberstein y Despommier (1984) seleccionaron 3 (8A4.3.1.1, 7B2.3.1.1 y 4A1.13.1) que poseían ciertas características como alta reactividad en ensayos de inmunoselección y especificidad única.

Los antígenos seleccionados mediante estas columnas de afinidad fueron de diferentes pesos moleculares (37 kDa, 48 kDa y 50/55 kDa) y cada uno poseía diferente capacidad en la inducción de protección. El antígeno de 48 kDa inducía un elevado nivel de protección a dosis biológicamente relevantes (1.0 y 0.1 µg de proteína/ratón). El antígeno de 50/55 kDa inducía un menor nivel de protección (31 %) comparado con el antígeno de 48 kDa (45 %), pero es más efectivo comparado con el antígeno crudo a dosis similares (17%). El de 37 kDa presentó protección sólo a una dosis de 50 µg de proteína/ratón (44 %), y no fue tan efectivo como el antígeno crudo a ninguna dosis.

Estudios de inmunocitlocalización empleando inmunoperoxidasa en tejidos infectados con la larva muscular indicaron que el antígeno de 48 kDa está localizado en los β-esticositos, en el intestino y en la superficie de la cutícula. El antígeno de 50/55 kDa fue detectado en los α-esticositos y ocasionalmente se detectó en el intestino o en la cutícula. El antígeno de 37 kDa se encontró solamente en el pseudoceloma.

Por otro lado, Gamble y Graham (1984b) obtuvieron el anticuerpo 7C2C5 el cual reconoce los productos de secreción-excreción de *T. spiralis*. Mediante ensayos de difusión en gel y la autoradiografía de geles de SDS se demostró que este anticuerpo es de isotipo de IgM (Gamble y Graham, 1984b). El 7C2C5 reconoció por

inmunoelectrotransferencia a 3 proteínas de secreción-excreción con pesos moleculares de 53, 49 y 45 kDa. Además, por estudios inmunocitoquímicos se demostró que este anticuerpo reconoce específicamente el esticosoma de la larva muscular de *T. spiralis*. Los mismos autores emplearon al anticuerpo 7C2C5 en una cromatografía de afinidad y purificaron un doblete proteico de peso molecular de 53 y 49 kDa y una banda de 67 kDa. Estos antígenos purificados son capaces de inducir protección en ratones ante un desafío oral en niveles comparables con los obtenidos usando los productos de secreción-excreción crudos de la larva muscular de *T. spiralis*, confiriendo una protección del 60 al 80 % a ratones infectados experimentalmente. Durante estos ensayos se observó una reducción significativa en la fecundidad de las hembras y una reducción de la larva muscular (Gamble, 1985b). (Tabla 4).

TABLA 4.

No. de parásitos recuperados de ratones inmunizados con los productos de secreción-excreción crudos de la larva muscular de *T. spiralis* o con los antígenos Ts49 y Ts53 purificados con el anticuerpo monoclonal 7C2C5.

Tratamiento	Adultos	LRN	Larva Muscular
Control	47.3±2.7	117.4±2.6	20695±2983
S-E 10µg	27.7±3.2 (41%)	74.6±3.9 (36%)	7168±801 (65%)
Ts49,Ts53 5µg	22.6±2.1 (52%)	98.5±2.7 (16%)	6100±1076 (71%)

S-E= Productos de secreción-excreción.

LRN= Larva recién nacida.

Tomado de Gamble (1985b).

b) ANTIGENOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA.

La cutícula de los parásitos nematodos ha sido considerada como blanco de la respuesta inmune (Ogilvie y Philipp, 1980). Philipp y cols. (1981) llevaron a cabo la caracterización de las proteínas de superficie de *T. spiralis*. Empleando técnicas de marcaje con ^{125}I y análisis electroforético bajo condiciones reductoras demostraron que el patrón antigénico de los componentes de superficie varía con respecto al estadio de desarrollo del parásito. Esto se basó en la observación de que ninguna de las proteínas de superficie/esticosoma expresadas por la larva muscular, el adulto y la larva recién nacida son idénticas. Así se determinó que los antígenos de superficie de la larva muscular tienen un peso molecular de 47, 55, 90 y 105 kDa, los del adulto de 20, 33, 40 y 56 kDa y de la larva recién nacida de 28, 30, 58 y 64 kDa. Con respecto a los componentes de superficie de la larva muscular, Parkhouse y cols., (1981) demostraron que las moléculas de 90 y 105 kDa son dímeros de los antígenos de 47 y 55 kDa, así mismo, mediante digestión péptica se puso de manifiesto que existe una homología entre las secuencias de estos antígenos. Los autores sugirieron que probablemente las 4 moléculas se originan a partir de un sólo gene, cuyo producto posteriormente es glucosilado y sufre dimerización. Por otro lado, algunos investigadores han señalado que las proteínas de superficie de *T. spiralis* son antigénicamente estadio-específicas y que la respuesta protectora hacia la reinfección de ratas y ratones es también estadio-específica (James y Denham, 1975; James y cols., 1977; Bell y McGregor, 1979).

El empleo de anticuerpos monoclonales ha permitido caracterizar más ampliamente a los antígenos de superficie/esticosoma de este parásito. De esta forma, Ortega-Pierres y cols. (1984) produjeron anticuerpos monoclonales específicos contra *T. spiralis*, uno de ellos el NIM-M1 inmunoprecipita moléculas de 105, 90, 57 y 47 kDa de la larva muscular, otro anticuerpo monoclonal el NIM-M2 inmunoprecipita únicamente a dos componentes de 90 y 47 kDa de la larva muscular de *T. spiralis*. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales NIM-M3, NIM-M4, y NIM-M7

inmunoprecipitan a moléculas de 40 y 20 kDa del organismo adulto. Mediante ensayos de inmunofluorescencia empleando a parásitos intactos se demostró que el anticuerpo monoclonal NIM-M1 y el NIM-M3 reconocen la superficie de su respectivo estadio de desarrollo. Sin embargo, el NIM-M2 y el NIM-M4 no lo hacen y el NIM-M7 reconoce sólo el órgano copulatorio de el macho adulto (Ortega-Pierres y cols., 1984, 1987). Ensayos inmunocitoquímicos realizados por McLaren y cols. (1987), demostraron que el anticuerpo monoclonal NIM-M1 reconocía la superficie de la larva muscular, sin embargo, también reaccionaba con el esticosoma, sugiriéndose que este último sintetiza y secreta estos componentes de superficie (por lo cual se les denomina como antígenos de superficie/esticosoma). Asimismo este anticuerpo reconoció el esticosoma del adulto.

Un aspecto que fue abordado por Ortega-Pierres y cols. (1989) fue el análisis de los antígenos reconocidos por el anticuerpo monoclonal NIM-M1 en cuanto a su capacidad de inducir protección. En sus estudios observaron que los sueros de ratones infectados experimentalmente con *T. spiralis* reconocieron en un ensayo de inmunoelectrotransferencia componentes de 47, 52, 67 y 72 kDa. Estos antígenos fueron purificados empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 y se emplearon para inmunizar ratones BALB/c. Así estos autores demostraron que los antígenos purificados de superficie/esticosoma indujeron protección (60 a 80 %) en ratones BALB/c en contra del desafío con *T. spiralis*.

Arriaga y cols. (1989) demostraron en ensayos de inmunoelectrotransferencia que los sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* reconocían principalmente a los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de *T. spiralis*. Asimismo, mediante este ensayo fue posible detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra los componentes de superficie a partir del día 14 después de la infección.

Takahashi y cols. (1990) demostraron mediante microscopia electrónica e

inmunolocalización con oro coloidal que los sueros provenientes de seres humanos con triquinelosis reconocían a los antígenos de la larva muscular de *T. spiralis*. Asimismo, Robinson y cols. (1991) llevaron a cabo un estudio en el cuál se emplearon sueros de seres humanos y de ratones con triquinelosis, demostrando que los antígenos de 41, 46 y 55 kDa fueron principalmente reconocidos por estos sueros. Lo anterior indica que estos antígenos son inmunodominantes ya que son reconocidos por diversos hospederos.

En 1991, en Biltoven (Holanda) varios grupos de investigación realizaron un Taller Internacional para analizar la reactividad de diferentes anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra diferentes preparaciones antigénicas provenientes de los tres estadios de desarrollo de *T. spiralis*. En este Taller se llevaron a cabo tanto el análisis de extractos totales del parásito como de los productos de secreción-excreción y de los de superficie/esticosoma de la larva muscular por medio de ensayos de ELISA, Inmunoelctrotransferencia e Inmunoprecipitación.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio los antígenos de *T. spiralis* se clasificaron en diferentes grupos, de acuerdo principalmente a su reconocimiento por los diferentes anticuerpos. (Tabla 5).

Los antígenos de superficie/esticosoma y de secreción-excreción quedaron considerados dentro del grupo TSL-1 (Appleton, 1991).

Este grupo de antígenos (TSL-1) son inmunodominantes, reconocidos por una gran variedad de huéspedes. Recientemente se caracterizaron los antígenos TSL-1, demostrándose que el epítipo responsable de la inmunodominancia de estas moléculas es de naturaleza de carbohidrato (Wisnewski y cols., 1993). Mediante el uso de cromatografías de gas/espectrometría de masa se han identificado y cuantificado los monosacaridos presentes no sólo en los antígenos TSL-1, sino también en los extractos crudos de la larva muscular y en los productos de secreción-excreción. El hallazgo mas importante hasta ahora es la identificación de un azúcar 3,6-dideoxihexosa (tivelosa)

presente en cantidades molares relativamente elevadas en los antígenos de TSL-1. Este residuo glucosídico no es muy común en antígenos de microorganismos ya que sólo se ha reportado en ciertos lipopolisacaridos de bacterias Gram negativas y en huevecillos de Ascaris. Otra característica importante en la composición de carbohidratos de los extractos crudos de la larva y antígenos TSL-1 fue el que se detectó una elevada concentración de fucosa; tanto las tivelosas y 83 % de fucosas están presentes en los residuos terminales no reductores, lo cual esta de acuerdo con la hipótesis de que uno, o ambos azúcares están asociados con el epítipo inmunodominante de los antígenos de TSL-1. La identificación y caracterización de los carbohidratos específicos de los antígenos de TSL-1 puede permitir llevar a cabo estudios más detallados sobre la participación de estos carbohidratos en la inmunobiología de las infecciones por T. spiralis (Wisnewski y cols., 1993).

TABLA 5.

Clasificación de los antígenos de *T. spiralis* de acuerdo al consenso realizado en el Taller Internacional de Bilthoven (1991) (Holanda).

Antígeno	Peso Molecular	Anticuerpo	Clasificación
Extracto de LM	47-70, 115-120	9D4	TSL-1
PES de LM	45-60	9E6	
		18H	
		305	
		Ho-1	
		Tsp 130	
		NIM-M1	
		7C2C5	
Extracto de LM	36	6D8	TSL-2
LM PES de LM	45		
Extracto de LM			
PES de LM	18	Ho-5	TSL-3
Extracto de LM			
PSE de LM	38-40, 45, 49	6B1	TSL-4
PSE de Adulto	40	10E8	TS-A1
		1E11-1G8	
Extracto de Adulto	37	Ts-2	
Extracto de LRN		Ho-2	TS-L/A/LRN

LRN= Larva recién nacida.

PES=Productos de secreción-excreción.

LM= Larva muscular.

Tomado de Appleton y cols. (1991).

DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS.

El control de la transmisión de la triquinelosis hacia el humano se pueden llevar a cabo a diferentes niveles. Uno de estos niveles incluye la prevención de la adquisición de la infección en cerdos, mediante el control del alimento que consumen. Sin embargo, los cerdos de traspatio se alimentan de desechos alimenticios y las condiciones higiénicas no son las adecuadas incrementando así la posibilidad de adquirir la infección. Esto puede ser por el consumo de restos de ratas infectadas con T. spiralis las cuales participan en este proceso como "reservorios" del parásito, así como por canibalismo de cerdos infectados con el parásito (Campbell, 1983; Murrell y cols., 1987).

Asimismo, un aspecto importante que debe considerarse es el hecho de que los animales silvestres son reservorios importantes del parásito, lo cual dificulta las medidas de control de esta parasitosis (Kozar, 1968; Andrews y cols., 1969).

Otra de las estrategias de control de la infección es en los rastros, en los cuales se realizan algunos métodos para la detección de animales infectados, evitando de este modo su consumo por humanos. Los métodos de detección que se emplean más frecuentemente en los rastros son la triquinoscopia y la digestión artificial del músculo, con los cuales se puede visualizar directamente al parásito. Otro nivel en el control de la transmisión involucra la inactivación del parásito; esto puede realizarse durante el procesamiento de la carne ó directamente por el consumidor al cocinar perfectamente esa carne, de esta forma se puede asegurar que el humano no esta expuesto a esta parasitosis (Murrell, 1985a).

En México se han reportado estudios que indican la ocurrencia de brotes de triquinelosis en varios estados de la República Mexicana (Martínez-Marañón, 1983, 1985; Hernández y cols., 1992). Uno de estos brotes ocurrió recientemente en Ciudad Delicias Chihuahua e involucró a 166 personas las cuales se infectaron al consumir chorizo mal cocido. Vale la pena hacer mención que este producto provenia de un

animal con sello del Rastro Municipal de Cd. Delicias (Hernández y cols., 1992).

Considerando lo mencionado anteriormente es evidente la importancia de contar con métodos de diagnóstico sensibles y específicos para la detección de la triquinelosis, que permita controlar la transmisión de la infección al humano.

A este respecto, las pruebas serológicas se consideran métodos útiles en diagnóstico por ser más sensibles que otros métodos como la detección en músculo de parásitos. Algunas de estas pruebas que se han usado para el diagnóstico de la triquinelosis porcina son fijación de complemento, aglutinación de partículas de látex, hemoaglutinación pasiva, inmunofluorescencia y, más recientemente métodos inmunoenzimáticos como el ensayo de ELISA y la inmunoelectrotransferencia (Ruitenbergh y cols., 1975; Ramirez, 1981; Ruitenbergh y cols., 1983; Bautista-Garfias, 1985; Arriaga, 1989).

De éstas, el ensayo de ELISA ha sido ampliamente probado en la detección de animales infectados natural y experimentalmente con T. spiralis.

Los primeros estudios en los que se empleó el ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de triquinelosis en cerdos fueron realizados por Ruitenbergh y cols. (1975) y por van Knapen y cols. (1976). Posteriormente se demostró que la sensibilidad de la triquinoscopia y la digestión artificial es de 3 y 1 larvas por gramo de músculo respectivamente, en comparación con el ensayo de ELISA que puede detectar 0.01 larvas por gramo de músculo (Ruitenbergh y cols., 1983). Los criterios principales del uso de las pruebas de diagnóstico son la sensibilidad (detección de bajos niveles de infección) y la especificidad (eliminación de reacciones falso-positivas). Con respecto a la especificidad, el empleo de extractos solubles totales de la larva muscular de T. spiralis en ensayos de ELISA ha mostrado reacciones cruzadas con otros parásitos de cerdos (Gamble y cols., 1983). Así, el uso de extracto crudo de la larva muscular de T. spiralis en ELISA no permite discernir entre los sueros positivos y los negativos, debido a los elevados niveles de fondo normal en el suero de cerdos infectados con otros

parásitos, como es el caso de Ascaris, Oesophagostomum, Metastrongylus entre otros. Esto da como resultado reacciones falso-positivas debido a las reacciones cruzadas con estos parásitos y reacciones falso-negativas en individuos con una respuesta inmunológica baja. Sin embargo el empleo de antígenos definidos derivados de la larva muscular en ensayos de ELISA confieren mayor especificidad al diagnóstico de la triquinelosis (Gamble y cols., 1983; Murrell y cols., 1986).

Así Gamble y cols. (1983) emplearon antígenos de secreción-excreción purificados por medio de un anticuerpo monoclonal (7C2C5) eliminando reacciones falso-positivas en sueros de cerdos de granja, demostrándose asimismo la detección de anticuerpos contra la larva muscular de T. spiralis en cerdos con cargas parasitarias bajas, por lo que la sensibilidad del ensayo se vió incrementada. Por otro lado, los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular purificados mediante cromatografías de afinidad con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 han sido utilizadas en ensayos de ELISA y comparados con el extracto crudo del parásito y con los productos de secreción-excreción en el diagnóstico de triquinelosis porcina. (Arriaga y cols., 1989). En estos ensayos se emplearon sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con T. spiralis, observándose que tanto los antígenos de superficie/esticosoma como los de secreción-excreción confieren una mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico de la infección. (Fig. 3).

En este mismo estudio, mediante un análisis de inmunoelectrotransferencia empleando sueros de cerdos infectados con el parásito se observó el reconocimiento de proteínas con pesos moleculares de 105, 72, 67, 52 y 47 kDa, los cuales corresponden a los reportados previamente para los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de T. spiralis (Ortega-Pierres y cols., 1989) (Fig. 4).

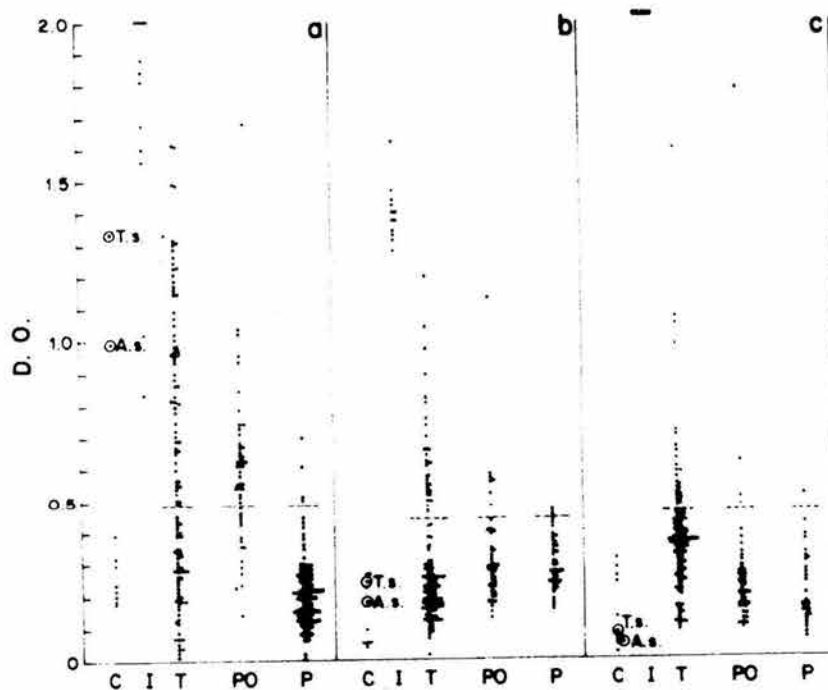


Fig. 3. Valores de densidad óptica (D. O.) obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdo infectados naturalmente con *T. spiralis* provenientes de diferentes localidades: PO (Paso de Ovejas, Veracruz), P (Paracho, Michoacán) y T (Toluca, Edo. de México). En este ensayo se probaron a) extracto crudo, b) antígenos de secreción-excreción purificados y c) antígenos de superficie/esticosoma purificados de la larva muscular de *T. spiralis*. Como controles se emplearon sueros de cerdos no infectados (C) y de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* (I), así como sueros de cerdos infectados con *Ascaris suum* y *Trichuris suis*.

Tomado de Arriaga y cols. (1989).

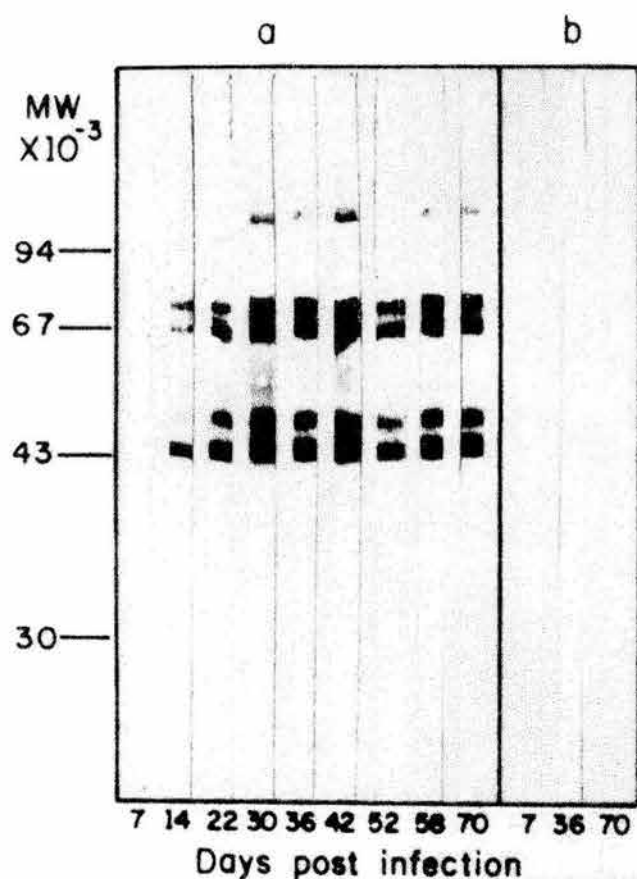


Fig. 4. Inmunoelctrotransferencia con sueros de cerdos infectados con *T. spiralis*, a) Antígenos de superficie/esticosoma, b) Controles negativos.

Tomado de Arriaga y cols. (1989).

Considerando las evidencias anteriores se considera que tanto los antígenos de superficie/esticosoma como los de secreción-excreción son muy útiles en el diagnóstico de la triquinosis.

El uso de métodos inmunoenzimáticos basados en el uso de antígenos purificados para el diagnóstico a gran escala de *T. spiralis* requiere la producción de grandes cantidades de antígenos purificados. Esto puede lograrse mediante la purificación directa usando cromatografías de afinidad con anticuerpos monoclonales o

por medio del uso de técnicas de ingeniería genética para clonar los genes que producen el o los antígeno (os) de interés y expresarlos en sistemas bacterianos en cantidades suficientes para evaluar su uso masivo en el diagnóstico de la triquinelosis.

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES PARASITARIAS.

Recientemente se ha llevado a cabo el estudio molecular de muchos antígenos parasitarios en los cuales la caracterización de las moléculas antigénicas se ve limitada debido a la dificultad en la obtención de suficiente cantidad de parásitos y por consiguiente de sus antígenos. Asimismo, otro de los problemas que se han presentado es la inestabilidad de ciertas proteínas parasitarias. Así el uso de técnicas de ingeniería genética han permitido llevar a cabo la clonación y expresión de antígenos parasitarios en sistemas bacterianos, mediante el uso de vectores de expresión en los cuales se producen eficientemente los antígenos parasitarios sin la necesidad de contar con el parásito directamente o con extractos parasitarios.

De esta forma, la tecnología del ADN recombinante ha permitido el estudio a nivel molecular de diferentes enfermedades parasitarias. El beneficio principal de esos avances moleculares es en la facilidad con la cual genes enteros pueden aislarse y secuenciarse permitiendo estudiar la organización genómica de algunos parásitos así como sus relaciones filogenéticas. Además las bibliotecas de expresión pueden ser usadas para clonar genes que codifican para antígenos importantes de parásitos, útiles en el diagnóstico e inmunoprolifaxis de diferentes parasitosis.

En este contexto, el bacteriofago lambda gt11 ha sido el vector más usado en la construcción de bibliotecas de expresión, en este vector se encuentra el gene de la β -galactosidasa de Escherichia coli, el cual tiene un sitio de restricción para la enzima Eco RI en su región carboxil terminal (Young y Davis, 1983). La presencia de este gene permite que el inserto de ADNc clonado se fusione a β -galactosidasa. Los vectores de expresión más eficientes son los que tienen promotores fuertes y están regulados negativamente por un represor que puede ser inducido por la temperatura o

mediante algún inductor químico. La represión eficiente previene la expresión de proteínas que pueden ser letales para *E. coli*, hasta que su síntesis se requiera para llevar a cabo una selección inmunológica. En el bacteriófago lambda gt11 funciona el promotor de lambda bajo el control del **represor c 1857**, el cual es activo a 30°C y se inactiva a 42°C y el **promotor lac**, el cual puede ser inducido con Isopropiltiogalactosido (IPTG).

Para llevar a cabo la identificación de las clonas recombinantes se induce su replicación y con ello la síntesis de las proteínas de fusión. Posteriormente se pueden lisar en un filtro de nitrocelulosa bajo condiciones que propicien la unión de estos péptidos al filtro.

La selección de clonas recombinantes a partir de las bibliotecas de expresión se puede llevar a cabo mediante el empleo de sueros policlonales o anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes componentes del parásito o mediante sondas de ADN específicas. Otro aspecto que se aborda en la caracterización de las clonas recombinantes de lambda gt11 incluye la identificación de las proteínas nativas del parásito con las que los péptidos recombinantes comparten determinantes antigénicos. Esta caracterización se puede realizar mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia empleando extractos crudos del parásito y anticuerpos seleccionados con las proteínas de fusión (Kelly y Blaxter, 1987; Miles y Clark, 1989).

En los últimos años se han reportado muchos trabajos relacionados con la clonación de antígenos de diferentes parásitos que son útiles en el diagnóstico de las infecciones que producen: *Trypanosoma cruzi* (Ibañez y cols., 1987), *Taenia taeniaeformis* (Bowtell y cols., 1983, 1984, 1986), *Echinococcus multilocularis* (Gottstein y cols., 1983, 1987; Vogel y cols., 1988; Müller y cols., 1989; Hemmings y McManus, 1989, 1991), *Toxoplasma gondii* (Tenter y Johnson 1991; Parker y cols., 1991) y *Babesia bovis* (Böse y cols., 1990) entre otros.

Un problema que se presenta con el uso de los antígenos recombinantes

expresados como proteínas de fusión a β -galactosidasa es el hecho de que los sueros de los individuos infectados y no infectados con los diferentes parásitos presentan una elevada reactividad contra la molécula de β -galactosidasa. Así, la diferenciación entre individuos positivos y negativos se dificulta, con lo cual se tiene una sensibilidad muy baja en los métodos de diagnóstico de las enfermedades parasitarias.

Con la finalidad de evitar este tipo de problemas se ha recurrido a la subclonación de los insertos en otros vectores que permitan la expresión de las proteínas parasitarias como péptidos de fusión unidos a otra molécula diferente a β -galactosidasa. Entre estos vectores, el más usado ha sido el vector de expresión pGEX (1, 2, 3). Los péptidos que se expresan en estos vectores están fusionados al extremo Carboxilo terminal de la Glutathione S-transferasa (GST) la cual tiene un sitio de corte para Trombina y Factor X de coagulación. Estos últimos se introdujeron en el extremo Carboxilo terminal de esta proteína de tal forma que el péptido correspondiente al parásito se puede remover de la Glutathione S-transferasa (Fig. 5).

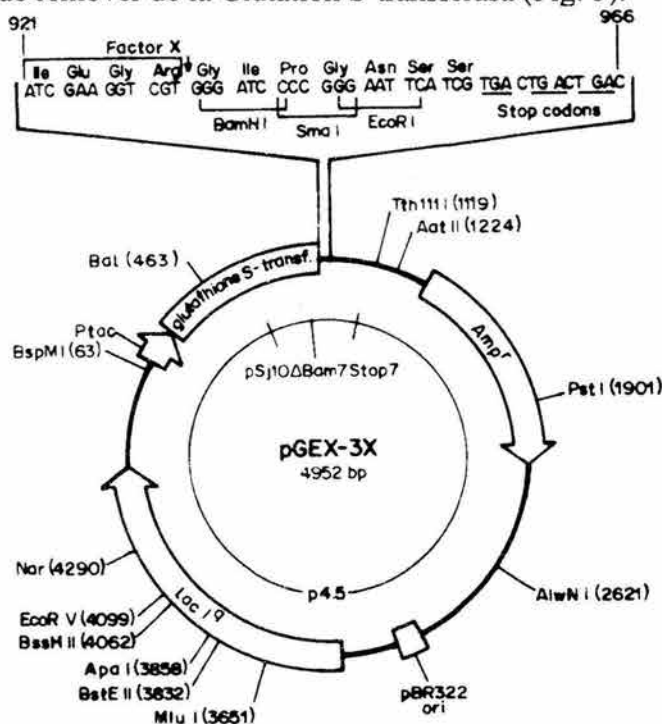


Fig. 5. Mapa genómico del plásmido pGEX-3X.

Tomado de Smith y Johnson (1988)

La subclonación de los fragmentos de ADN del parásito en el vector de expresión pGEX tiene ventajas tales como el que se expresan como proteínas de fusión a Glutathion S-transferasa de forma estable y en grandes cantidades por mililitro de cultivo, el que las proteínas de fusión sean solubles en soluciones acuosas y que puedan ser purificadas bajo condiciones no desnaturizantes por medio de cromatografías de afinidad (Smith y Johnson, 1988).

Los vectores pGEX contienen el alelo sobre-expresado **lac⁹** del represor **lac** y la sobre-expresión de las proteínas de fusión a GST del promotor **tac** el cual es se expresa eficientemente bajo la inducción con IPTG.

De esta forma, los diferentes péptidos recombinantes parasitarios expresados en estos vectores fueron usados en el diagnóstico de diversas enfermedades parasitarias, obteniéndose una sensibilidad mayor comparada con la sensibilidad que se observaba cuando se emplearon antígenos nativos. Esto permitió diferenciar los sueros de individuos infectados con respecto de aquellos provenientes de personas no infectadas obteniéndose en algunos casos una especificidad muy alta (Bowtell y cols., 1983, 1984, 1986; Gottstein y cols., 1983, 1987; Vogel y cols., 1988; Müller y cols., 1989; Hemmings y McManus, 1989, 1991; Tenter y Johnson, 1991; Böse y cols., 1990; Parker y cols., 1991).

ANTIGENOS RECOMBINANTES EN EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS.

En lo que se refiere a la utilización de técnicas de ADN recombinante en el diagnóstico de la triquinelosis, en los últimos años se ha llevado a cabo la construcción de bibliotecas de expresión empleando principalmente al bacteriófago lambda gt11 en donde se han clonado diferentes componentes de la larva muscular de *T. spiralis*.

De este modo, se ha llevado a cabo la expresión de un péptido recombinante con peso molecular de 46 kDa, el cual reacciona específicamente con sueros de

animales infectados con *T. spiralis* y no con sueros de animales con otras infecciones. En ensayos de inmunoelectrotransferencia empleando extractos crudos de la proteína de fusión y antígenos de secreción-excreción de la larva muscular y de un anticuerpo monoespecífico que reaccionaba con la proteína recombinante, se demostró que esta comparte determinantes antigénicos con un componente de secreción-excreción (Sugane y Matsuura, 1990).

Por otro lado, Zarlenga y Gamble (1990) clonaron el gene que codifica para una proteína de 54 kDa, la cual comparte epítomos con un producto de secreción-excreción de la larva muscular de *T. spiralis*. Al emplear esta proteína de fusión en un ensayo de ELISA, fué posible determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra *T. spiralis* en ratones infectados experimentalmente a partir del día 14 después de la infección, alcanzandose un título máximo para el día 28 después de la infección. Estos autores sugieren la utilización de este péptido recombinante en el diagnóstico de triquinelosis.

Más recientemente, Su y cols. (1991) clonaron el ADNc del gene que codifica para una molécula de secreción-excreción con peso molecular de 49 kDa. La preparación de este ADNc se realizó mediante la técnica de amplificación de ADN y oligonúcleotidos sintetizados a partir de una secuencia conocida de aminoácidos de la proteína de 49 kDa. La proteína de fusión así obtenida fue reconocida en ensayos de inmunoelectrotransferencia por sueros de cerdos infectados con *T. spiralis*.

El estudio molecular de los componentes de la larva muscular ha sido enfocado principalmente a los antígenos de secreción-excreción, sin embargo, recientemente los antígenos de superficie/esticosoma de este parásito, los cuales son útiles en el diagnóstico de la triquinelosis han sido clonados en lambda gtl1 y los péptidos recombinantes se analizaron en un ensayo de ELISA empleando sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* (Yepez-Mulia, 1993).

En este estudio se seleccionaron 3 clonas recombinantes (Ts-1, Ts-2, Ts-3), las

cuales reaccionaban fuertemente con sueros de ratones infectados experimentalmente con antígenos purificados de superficie/esticosoma de la larva muscular de este parásito.

Por medio del análisis electroforético de las proteínas de fusión producidas por las clonas recombinantes se demostró la producción de proteínas híbridas con pesos moleculares de aproximadamente 118 kDa (Ts-3) y 121 kDa (Ts-1 y Ts-2), considerando que la molécula de β -galactosidasa a la cuál se encuentra fusionado el péptido de *T. spiralis* tiene un peso molecular de 116 kDa. Así se calculo que los péptidos de *T. spiralis* expresados por las clonas tienen un peso molecular de 2 y 5 kDa respectivamente.

Para la determinación de los antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* que comparten determinantes antígenicos con las proteínas híbridas, se llevó a cabo una inmunoelectrotransferencia de extractos crudos del parásito y anticuerpos seleccionados con las proteínas de fusión expresadas por las clonas recombinantes. Así se determinó que las 3 proteínas híbridas expresadas por las clonas seleccionadas (Ts-1, Ts-2 y Ts-3) comparten determinantes antígenicos con los componentes de la larva muscular de *T. spiralis* con pesos moleculares de 72, 67, 52 y 47 kDa. Estos últimos son similares a los pesos moleculares reportados para los antígenos de superficie/esticosoma reconocidos por el anticuerpo monoclonal NIM-M1. Esto último sugiere que las clonas recombinantes seleccionadas codifican para epítomos presentes en los antígenos de superficie/esticosoma del parásito.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo la evaluación del uso de los péptidos recombinantes expresados por las clonas Ts-1, Ts-2 y Ts-3 en el diagnóstico de triquinelosis, empleando sueros de ratones infectados experimentalmente con *T. spiralis* y el ensayo de ELISA. En estos ensayos se observó que sólo el péptido recombinante producido por la clona Ts-3 era reconocido. Posteriormente, mediante un ensayo de ELISA se demostró que el péptido recombinante de la clona Ts-3 es

reconocido por sueros de cerdos infectados con *T. spiralis*. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo fue baja, debido principalmente a que el péptido de *T. spiralis* esta fusionado a β -galactosidasa, la cuál es reconocida por anticuerpos presentes en el suero de una gran variedad de hospederos. Los resultados obtenidos en ese ensayo mostraron que la proteína de fusión expresada por la clona Ts-3 es reconocida por 86 % de los sueros probados. Así mismo, se observó que este péptido recombinante es específico para *T. spiralis*, ya que en el ensayo se incluyeron sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Ascaris suum* y *Trichuris suis* y no se detecto reconocimiento de la proteína de fusión expresada por la clona Ts-3 por estos sueros. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la utilidad de este péptido recombinante en el diagnóstico de triquinelosis aunque la sensibilidad del ensayo fue baja. Una forma de incrementar la sensibilidad del ensayo consiste en subclonar el inserto de ADNc de la clona Ts-3 en otro vector de expresión que permita además de su producción eficiente el obtener el péptido de *T. spiralis* fusionado a otra molécula diferente a β -galactosidasa con lo cuál se reduciría la reactividad de los sueros normales y permitiría desarrollar un método de diagnóstico más sensible.

OBJETIVOS GENERALES

SUBCLONAR EL INSERTO DE ADNc DE LA CLONA Ts-3 QUE CODIFICA PARA DETERMINANTES ANTIGENICOS PRESENTES EN LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis EN EL VECTOR DE EXPRESION pGEX-3X, Y EVALUAR MEDIANTE EL ENSAYO DE ELISA SU VALOR DIAGNOSTICO EN TRIQUINELOSIS PORCINA EMPLEANDO SUEROS DE CERDOS INFECTADOS CON Trichinella spiralis.

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar el inserto de ADNc de la clona recombinante Ts-3 que codifica para epítomos presentes en los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de Trichinella spiralis.

Subclonar el inserto de ADNc en el vector de expresión pGEX-3X.

Inducir la expresión eficiente de la proteína de fusión de la larva muscular de T. spiralis.

Purificar el péptido recombinante de T. spiralis expresado en el vector pGEX-3X mediante una cromatografía de afinidad de Glutación acoplado a Sefarosa 4B.

Evaluar el valor diagnóstico del péptido recombinante purificado de T. spiralis mediante el ensayo de ELISA empleando sueros de cerdos infectados con el parásito.

ESTRATEGIA METODOLOGICA

OBTENCION DE LA LM DE *Trichinella spiralis*



PREPARACION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LM DE *T. spiralis*



PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA DE LA LM DE *T. spiralis*



DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA COMPONENTES DE S/E DE LA LM DE *T. spiralis* EN SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE CON EL PARASITO MEDIANTE ENSAYOS DE ELISA



EVALUACION DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE LA LM DE *T. spiralis* EN EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS PORCINA MEDIANTE EL ENSAYO DE ELISA USANDO SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE CON EL PARASITO



ANALISIS DE LA REACTIVIDAD DE SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE CON *T. spiralis* HACIA EL PEPTIDO PRODUCIDO POR LA CLONA 3.11 MEDIANTE UN ENSAYO DE IET.

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL ADN DE LA CLONA RECOMBINANTE Ts-3



RESTRICCION DEL ADN DE LA CLONA Ts-3 CON LA ENZIMA Eco RI



LIBERACION DEL INSERTO DE 1.5 Kb DE LA CLONA Ts-3



LIGACION DEL INSERTO DE 1.5 Kb AL VECTOR pGEX-3X



CELULAS COMPETENTES DE *E. coli* CEPA DH5 α Y TRANSFORMACION CON EL PLASMIDO RECOMBINANTE



SELECCION DE CANDIDATOS RECOMBINANTES MEDIANTE EL AISLAMIENTO DEL ADN DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES Y RESTRICCION CON Eco RI



INDUCCION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA DE FUSION DE LA CLONA RECOMBINANTE 3.11 EN PRESENCIA DE IPTG



PURIFICACION DE LA GST Y DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE LA CLONA 3.11



ANALISIS ELECTROFORETICO DEL PEPTIDO RECOMBINANTE PURIFICADO



MATERIAL Y METODOS

MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DE LA LARVA MUSCULAR DE T. spiralis.

Las larvas musculares de T. spiralis se obtuvieron a partir de la digestión del músculo esquelético de ratones de la cepa BALB/c infectados experimentalmente con el parásito, de acuerdo al método descrito por Dennis y cols. (1970). Ratones de la cepa BALB/c de 8 a 12 semanas de edad se infectaron experimentalmente con 500 larvas musculares del parásito, después de 28 días de infección. Los ratones fueron sacrificados, procediendo a quitarles la piel, cabeza, extremidades y vísceras. El músculo esquelético se maceró finamente y se colocó un matraz que contenía una solución de Pepsina - Acido Clorhídrico al 1 %, y se incubó a 37°C por 3 hrs, con agitación constante.

Transcurrida esta incubación, la solución se paso por un tamiz de malla pequeña y se dejó que la larvas se sedimentaran, y se transfirieron a tubos falcon de 15 ml, y se centrifugaron a 2250 rpm por 5 min en una centrífuga clínica (Damon IEC/Division). El sobrenadante se decantó y las larvas musculares se lavaron varias veces con Amortiguador de Fosfato Salino (PBS) y se congelaron para posteriormente obtener el extracto crudo del parásito.

INFECCION DE RATONES CON LA LARVA MUSCULAR DE T. spiralis

Con objeto de mantener el ciclo de vida del parásito las larvas musculares obtenidas como se mencionó anteriormente se resuspendieron en PBS, enseguida se hizo una dilución 1:100 de las larvas en bacto agar al 0.2 %, de la cual se tomaron alícuotas de 5µl y se procedió a contarlas al microscopio. Posteriormente se inocularon ratones BALB/c con 500 larvas musculares empleando una cánula intragástrica.

OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE T. spiralis.

El extracto total de la larva muscular de T. spiralis se obtuvo de acuerdo al protocolo descrito por Parkhouse y cols. (1981). Un paquete de aproximadamente 1.0 ml en relación a volumen de larvas musculares se resuspendió en Amortiguador Trisma-base 10 mM pH 8.3, el cuál contenía inhibidores de proteasas (TPCK 50 µg/ml diluido en etanol, TLCK 25 µg/ml diluido en agua y PMSF 174 µg/ml diluido en isopropanol). Los parásitos se homogeneizaron durante 20 min a 4°C en un homogeneizador manual (Potter Wheaton). Posteriormente se agregó Deoxicolato de Sodio (DOC) al 4% y la suspensión se dejó reposar durante 20 min homogeneizándose posteriormente por otros 20 min. El extracto fue clarificado mediante centrifugación a 12000 rpm por 30 min a 4°C en una centrífuga eppendorf. La cuantificación de los antígenos se realizó mediante el método de Lowry (1951), modificado.

PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis.

La purificación de los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de T. spiralis se realizó de acuerdo al método descrito por Ortega-Pierres y cols. (1984). Esta purificación se realizó por medio de una cromatografía de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-MI acoplado a Sefarosa 4B.

Preparación de la columna:

Un volumen de 5 ml de Sefarosa 4B-anticuerpo monoclonal NIM-MI se empacó en una columna (Bio Rad) de 1.3 X 30 cm. La columna de afinidad se lavó con un volumen de agua, y un volumen de Amortiguador Alkali-strip (Apéndice D) y se equilibró con varios volúmenes de Amortiguador de Columna (Apéndice D) hasta que el pH de la resina fuera igual al de la solución.

El extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* se trató de la siguiente manera:

Aproximadamente 20 mg del extracto total se centrifugaron a 100000 rpm en una microultracentrífuga (Air-Fuge, Beckman), para descartar precipitados que pudieran interferir con la cromatografía. El sobrenadante se pasó por la columna tres veces y está se lavó con el amortiguador de columna hasta que la Densidad Óptica (D. 0.) de las fracciones colectadas fuera de 0.0, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman). La elución del antígeno adherido a la columna se llevó a cabo en condiciones de pH básico, empleando dos tipos de Amortiguadores; Pre-strip (Apéndice D) y Alkali-strip. El cambio de amortiguador se realizó de acuerdo a la D. 0. de las fracciones colectadas. El material eluido fue colectado en fracciones de 0.5 ml y la cantidad de proteínas se monitoreo por la D. 0. a 280 nm. Las fracciones eluidas que contenían proteína se llevaron a un pH de 8.3, con una solución de Tris-HCl 1M. Al término de la elución, la columna se reconstruyó lavando con 2 volúmenes de amortiguador de columna, 2 volúmenes de agua bidestilada y con Amortiguador PBS hasta que el pH de la resina igualó al de este último. El gel se preservó en Amortiguador PBS con Azida de Sodio al 0.1%. De acuerdo al patrón de elución, las fracciones que contenían proteína se juntaron y se dializaron extensivamente contra una solución de Tris-HCl 20 mM pH 8.3. La concentración de proteína en las muestras colectadas se determinó por el método de Lowry (1951), modificado. En algunos casos se requirió concentrar las muestras, para lo cuál se empleo Acuazide (Calbiochem, San Diego, Ca. USA).

DETERMINACION DE PROTEINAS CON EL REACTIVO DE FENOL SEGUN FOLIN (ENSAYO DE LOWRY MODIFICADO).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Sol. A Sulfato de Cobre Heptahidratado al 0.5 % en agua bidestilada.

Sol. B Carbonato de Sodio al 2 % en Hidróxido de Sodio 0.1 N, preparada en el momento de usarse.

Sol. C Tartrato de Sodio y Potasio al 2 % en agua bidestilada.

Sol. D Mezclar un volumen de A con un volumen de C.

Sol. E Mezclar 50 volúmenes de B con un volumen de D.

Reactivo de Folin-Ciocalteu: Diluir 1:2 con agua bidestilada.

Solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (ASB): ASB en agua destilada (1 mg/ml).

Se procesaron una serie de tubos de acuerdo a lo siguiente:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	
ASB	--	10	20	40	60	80	100	-	μl
H ₂ O	500	490	480	460	440	420	400	490	μl
Muestra	--	--	--	--	--	--	--	10	μl
DOC	50	50	50	50	50	50	50	--	μl
Sol. E	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	ml

Ya que el extracto fue obtenido en presencia de DOC al 4 % se agregó la cantidad indicada de DOC al 10 %.

Se mezcló el contenido de cada tubo y se permitió el reposo durante 10 min a temperatura ambiente.

A cada tubo se le adicionaron 250 μl de Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluido 1:2 y 500 μl de SDS al 0.5 %. Se agitó en vórtex y se dejó reposar 30 min a T. A.

Posteriormente se leyó la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman).

La concentración de la muestra problema se obtuvo por la interpolación con la curva

patrón de ASB (10 a 100 µg).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (SDS-PAGE).

El análisis electroforético de las proteínas del extracto crudo de la larva muscular, los antígenos de superficie/esticosoma purificados de la larva muscular, el extracto total de las proteínas recombinantes, así como las proteínas recombinantes purificadas de la larva muscular de *T. spiralis* se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % (Apéndice E) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970).

Una vez que se obtuvieron las proteínas para su análisis electroforético se añadió el amortiguador de muestra 5 X, y se hirvió esta mezcla por 5 min adicionando β-Mercaptoetanol (Bio Rad, Richmond, Ca. USA), para su posterior análisis electroforético.

En el análisis electroforético se empleó una cámara de electroforesis vertical (Hoeffer Scientific Instruments, San Fco. Ca. USA). Para preparar los geles la mezcla del gel espaciador al 10 % se colocó entre los vidrios y después se agregaron 2 ml de Isopropanol para lograr una polimerización uniforme del gel. Posteriormente se lavó el gel espaciador con agua para eliminar el isopropanol. Después se colocó un peine de 10 pozos y se depositó la mezcla del gel concentrador al 5 % y se dejó polimerizar por 15 min. El corrimiento electroforético se realizó inicialmente a 100 V hasta que penetraron las muestras al gel concentrador y después se aumentó el voltaje a 140 V durante 1 hr para la separación de las proteínas en el gel espaciador.

En el análisis electroforético de las proteínas se incluyeron Marcadores de Bajo Peso Molecular (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia): fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y lactoalbúmina (14 kDa). Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie al 0.1 %.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET).

La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Towbin y cols. (1979), empleando papel filtro Whatman del número 3 y fibra scotch brite (Apéndice F). El gel de poliacrilamida-SDS se equilibró en amortiguador de transferencia durante 1 hr a 4°C con cambios de la solución cada 30 min.

La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se llevó a cabo durante 1 hr a 100 mV en una cámara de transferencia (Hoefer, Scientific Instruments) a 4°C.

Una vez transferidas las proteínas, se cortó la tira de papel de nitrocelulosa en donde se encontraban transferidos los Marcadores de Peso Molecular y se tiñeron éstos con Negro Amido durante 5 min y posteriormente se destiñeron con una solución de Metanol al 5 %, Acido Acético al 10 %. El resto del papel se bloqueo con una solución de ABS al 3 % en PBS pH 7.3, durante toda la noche a 4°C, con el objeto de bloquear todos los sitios del papel donde no había proteínas. Después de realizar el bloqueo, el papel se cortó en tiras de 4 mm las cuales se guardaron para su uso posterior.

Para determinar el reconocimiento de los sueros de cerdo hacia los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de *T. spiralis*, las tiras de nitrocelulosa se incubaron con los sueros de los cerdos infectados dilución 1:100 en una solución de PBS-ASB al 3 % a T. A. con agitación constante, en un agitador de balanceo (Bellco, Biotechnology). Posteriormente las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.5 %, dejando 10 min entre lavado y lavado. Al término de los lavados las tiras se incubaron con el segundo anticuerpo, Igs de conejo anti IgG de cerdo acoplado a Peroxidasa dilución 1:2000 en PBS, 2 hrs a 37°C.

Después de la incubación las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.5 %, dejando 10 min entre cada lavado, y se les agregaron 2 ml de solución de substrato (Apéndice D) , preparada al momento de usarse. La solución substrato se dejó hasta

que las bandas se hicieron visibles y la reacción se detuvo lavando las tiras con agua.

EXTRACCION DEL ADN DE LA CLONA RECOMBINANTE Ts-3.

Para la obtención del ADN de la clona recombinante Ts-3 se siguió el protocolo descrito por Silhavy, y cols. (1984). Una colonia de la bacteria *E. coli*, cepa Y1090 se inoculó en 40 ml de medio Luria-ampicilina (50 µg/ml)(Apendice C) suplementado con Sulfato de Magnesio 10 mM y se incubó a 37°C con agitación constante durante toda la noche.

Al día siguiente en un tubo de ensaye se mezclaron 20 ml del cultivo de la bacteria Y1090 con 5×10^8 unidades formadoras de placas (ufp) de la clona Ts-3 y se incubó 15 min a T. A. Posteriormente se adicionaron a un matraz con un litro de medio Luria-ampicilina suplementado con Sulfato de Magnesio 10 mM y se incubó a 37°C de 5 a 8 hrs con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se añadió Cloruro de Sodio 0.5 M (2.9 g/100 ml) y 1 ml de Cloroformo y se agitó por 5 min a T. A. Inmediatamente después se centrifugó a 6000 rpm (centrífuga Beckman J2-21) durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante, el cual se guardó a 4°C, por toda la noche.

Al siguiente día se centrifugó el lisado previamente obtenido a 6000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante, al cuál se le añadió Polietilenglicol (PEG) al 10 %, y se colocó en agua de hielo durante 1 hr. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm 10 min a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de SM (ver Apendice C). El PEG se eliminó de la solución mediante extracciones con Cloroformo volumen a volumen, centrifugandose a 2000 rpm por 10 min y se extrajo la fase acuosa. Esto último se repitió varias veces hasta que no se evidenciara más PEG.

Posteriormente se añadieron 750 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 1.5 ml de Cloruro de Sodio 5M, ARNasa A y ADNasa I a una concentración final de 10 µg/ml y 1 µg/ml respectivamente, y se incubó 30 min a 37°C. Después de la incubación se realizaron 2

extracciones con Fenol saturado (ver Apéndice A) volumen a volumen, una extracción con Fenol saturado:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) volumen a volumen y una extracción con Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1). Después de cada extracción la mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min recuperándose la fase acuosa en cada una de ellas. El sobrenadante recuperado se precipitó con 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3 M y 2 volúmenes de Etanol Absoluto frío 1 hr a -20°C, y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min. La pastilla resultante se secó y se resuspendió en agua estéril.

LIBERACION DEL INSERTO DE ADN DE LA CLONA Ts-3 DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis.

El ADN de la clona Ts-3 se limpió de impurezas mediante el Kit de Gene Clean (Bio 101, La Jolla, Ca. USA) (ver Apéndice B) y se restringió con la enzima Eco RI. A 30 µg de ADN de la clona Ts-3 se le agregó un exceso de Eco RI (80 U), 40 µl de Amortiguador 10X para la enzima Eco RI y 220 µl de agua estéril. Esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 37°C, al día siguiente se analizó el ADN en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Ultra Pure, BRL) al 0.8% en presencia de bromuro de etidio y se verificó la liberación del inserto de ADN de la larva muscular de T. spiralis. Posteriormente se cortó la porción del gel en donde se encontraba el inserto de 1.5 Kb y se purificó mediante Gene Clean. La integridad y concentración del inserto se analizó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA PARA EL ANALISIS DE ADN.

La electroforesis en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). A 100 ml

del Amortiguador Tris-Boratos 1X (TBE) (Apéndice D), se le agregaron 0.8 g de agarosa (Ultra Pure, BRL), los cuales se disolvieron en el amortiguador TBE 1X hirviendo la mezcla en un horno de microwaves durante 1 min, después se añadió el bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml agitando para que se mezclara. Posteriormente se vaciaron 15 ml de esta solución a una cámara horizontal de electroforesis (Bio Rad). Al haber solidificado el gel se depositó la muestra de ADN mezclada con el colorante 6X (Apéndice D). Como amortiguador de corrida se empleó TBE 1X. La separación electroforética se realizó por 45 min a de 100 V, y posteriormente se visualizó el gel mediante la exposición de este a un transiluminador de luz UV. En el análisis electroforético del ADN se incluyeron los marcadores de peso molecular del ADN de lambda Hind III (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

LINEARIZACION DEL ADN DEL PLASMIDO pGEX-3X.

El ADN del plásmido pGEX-3X se restringió con la enzima Eco RI de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia). De esta forma, 10 µg del ADN del plásmido pGEX-3X fueron restringidas con 600 U de la enzima Eco RI, 25 µl del Amortiguador 10X para Eco RI y 175 µl de agua estéril, esta mezcla se incubó por 3 hrs a 37°C. Posteriormente se tomó una alícuota de la mezcla y se analizó en un gel de agarosa al 1 %. Al ADN linearizado se le hizo una extracción con Fenol:Cloroformo:Isoamilico (25:24:1) y se centrifugó a 10000 rpm por 3 min y posteriormente una extracción con Cloroformo centrifugando a 10000 rpm por 3 min. La fase acuosa obtenida se precipitó con un décimo de volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 4.5 y 2 volúmenes de Etanol durante 30 min a -20°C, y se centrifugó a 10000 rpm por 30 min. Posteriormente se lavó con Etanol al 70 % se secó y se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

DESFOSFORILACION DEL ADN DEL PLASMIDO pGEX-3X.

El ADN del plásmido pGEX-3X ya linearizado se desfosforiló de la siguiente forma: a 8 µg del ADN del plásmido se le añadieron 20 U de la enzima Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero (Boehringer Mannheim Biochemica, Alemania) y 5.1 µl del Amortiguador para Fosfatasa Alcalina y se incubó por 60 min a 37°C. Una vez realizada la incubación el ADN se calentó a 65°C por 10 min, llevándose a cabo 2 extracciones fenólicas. El ADN desfosforilado se precipitó con un décimo del volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 4.5 y 2 volúmenes de Etanol absoluto, por 30 min a 20°C. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

LIGACION DEL INSERTO DE ADNc DE LA CLONA Ts-3 AL VECTOR pGEX-3X.

El inserto de ADN de 1.5 Kb de la larva muscular de *T. spiralis* liberado mediante la enzima Eco RI se ligó al sitio Eco RI del plásmido pGEX-3X, siguiendo la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). Se probaron las relaciones molares 1:1 y 1:2. De esta forma se probaron 700 ng del ADN del plásmido pGEX-3X, el cuál se ligó a 30 y 60 ng del inserto de ADN de la larva muscular de *T. spiralis*. Para llevar a cabo la ligación se preparó una mezcla conteniendo: 1.1 µl de ATP 5mM, 0.1 U de T4 ligasa y 1.2 µl de amortiguador para la T4 Ligasa. La mezcla de ligación se incubó a 16°C por toda la noche y al día siguiente se empleó para la transformación de las células competentes DH5α.

PREPARACION DE CÉLULAS COMPETENTES DH5α.

La preparación de las células competentes se realizó de acuerdo al método descrito por Sambrook y cols., (1989). Se sembró una colonia de bacterias *E. coli* cepa DH5α en medio SOB (ver Apéndice C) con Sulfato de Magnesio 10mM y se dejó crecer toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente se inocularon 500

μl del precultivo en un matraz que contenía 50 ml de medio SOB suplementado con Sulfato de Magnesio 10mM y se colocó en una incubadora de 37°C con agitación moderada hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 0.5 a 550 nm. Inmediatamente después las bacterias se transfirieron a un tubo estéril y se incubaron 10 min en hielo, después de lo cual se centrifugó a 2500 rpm por 12 min a 4°C (centrífuga Beckman J2-21). El exceso de medio se eliminó y la pastilla se resuspendió en 16 ml de Amortiguador TBF 1 (ver Apéndice D) y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 12 min a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en 4 ml de Amortiguador TBF 2 (ver Apéndice D). Posteriormente se incubó en hielo durante 15 min, y se hicieron alícuotas de 400 μl, manteniéndose en congelación a -70°C hasta su uso.

TRANSFORMACION DE LAS CÉLULAS COMPETENTES DH5α.

La transformación de las células competentes se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Sambrook y cols. (1989), las células DH5α competentes se descongelaron en hielo, y se les añadieron 40 μl de una solución de β-Mercaptoetanol frío, incubándose en hielo por 10 min. La solución de β-Mercaptoetanol se preparó tomando 9 μl de β-Mercaptoetanol y 491 μl de agua estéril y se mantuvo en hielo. A los tubos mantenidos en hielo se añadieron 50 μl de células competentes y 200 ng del ADN del plásmido pGEX-3X ligado al inserto de 1.5 Kb de la larva muscular de *T. spiralis* y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente los tubos se colocaron en un baño de 42°C por 90 seg e inmediatamente se transfirieron a un recipiente con hielo por 2 min. Una vez realizado lo anterior, a cada tubo se le añadieron 200 μl de medio Psi-b (ver Apéndice C) y se incubaron a 37°C por 1 hr con agitación moderada. Después de transcurrido este tiempo se espataron 100 μl del líquido de transformación en cajas de Luria-ampicilina (50 μg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

EXTRACCION RAPIDA DE ADN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS.

Se seleccionaron 25 colonias bacterianas transformadas crecidas toda la noche y se picaron con un palillo estéril y se resuspendieron en 20 μ l de Amortiguador para extracción rápida de ADN (Apéndice D). Con objeto de analizar el ADN de cada una de las clonas se les adicionaron 20 μ l de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), se agitaron y se centrifugaron durante 2 min a 12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se tomaron 5 μ l para ser analizado en un gel de agarosa (Ultra Pure, BRL) al 0.8 %.

AISLAMIENTO DE ADN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES SELECCIONADAS.

Para la obtención de ADN de las clonas recombinantes empleando el vector pGEX-3X se siguió la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979). En esta las clonas recombinantes se inocularon por separado en tubos con 5 ml de medio Luria-ampicilina (50 μ g/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación constante.

Al día siguiente se centrifugó el cultivo en una centrifuga eppendorf a 12000 rpm por 2 min y la pastilla se resuspendió en 1 ml de Amortiguador Set (Apéndice D) centrifugándose a 12000 rpm por 3 min. El precipitado se resuspendió en 150 μ l de Amortiguador Set, 20 μ l de ARNasa A (10 mg/ml) y 400 μ l de solución alcalina (Hidróxido de Sodio 0.2 N, SDS 2 %). La mezcla se resuspendió y se incubó 15 min en hielo, posteriormente se agregaron 300 μ l de Acetato de Amonio 7.5 M pH 8.0, se resuspendió y se incubó 1 hr en hielo. Después de esto, los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron 10 min a 12000 rpm a 4°C. El sobrenadante se extrajo y se centrifugó 3 veces más para eliminar todos los residuos posibles, agregándose 500 μ l

de Isopropanol frío e incubándose 30 min a -20°C . La solución se centrifugó a 12000 rpm 10 min, y se obtuvo el sobrenadante al cual se le hicieron 2 lavados con 1 ml de Etanol al 70 % frío. El ADN se secó en un horno de vacío por 20 min, y se resuspendió en 20 μl de agua estéril.

RESTRICCIÓN DEL ADN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES SELECCIONADAS.

El ADN de las clonas recombinantes empleando el vector pGEX-3X se restringió con la enzima Eco RI para liberar el fragmento de ADNc de la larva muscular de T. spiralis. Para ello, aproximadamente a 15 μg de ADN de las clonas recombinantes se les agregó 10 U de enzima Eco RI, 3 μl de Amortiguador para Eco RI 10X y 12 μl de agua bidestilada estéril, incubando esta mezcla durante toda la noche a 37°C . Al día siguiente se realizó una electroforesis del ADN restringido el cual fue analizado en un gel de agarosa (Ultra Pure, BRL) al 1 % en presencia de bromuro de etidio.

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE T. spiralis.

La inducción de la expresión de los péptidos de fusión de la clona recombinante seleccionada (3.11) se realizó siguiendo el método descrito por Smith y Johnson (1988). Como control se incluyó el plásmido pGEX-3X parental.

De esta forma, se inoculó una colonia de la clona recombinante 3.11 en 50 ml de medio Luria-ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó a 37°C con agitación constante por toda la noche.

Al día siguiente se realizó una dilución 1:10 del cultivo de toda la noche en medio Luria-ampicilina fresco y se incubaron las células a 37°C hasta alcanzar una D.

0. de 0.7 a 600 nm.

Inmediatamente después se añadió isopropil-B-D-thiogalactosido (IPTG)(Sigma) a una concentración final de 1.0 mM y las células se crecieron 3 horas más a 37°C.

PREPARACION DEL EXTRACTO CELULAR DE LAS CLONAS RECOMBINANTES.

Las células inducidas con IPTG se recuperaron mediante centrifugación a 6000 rpm y se resuspendieron 1:100 en PBS + Tritón X-100. Posteriormente las células se lisaron por sonicación a 15 micrones por 15 seg, descansando 30 seg entre cada sonicación, 6 veces por tubo. Después de que las células se lisaron el extracto crudo se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se paso a través del tamiz de una columna de Glutación acoplado a Sefarosa 4B. (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia).

PURIFICACION DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE T. spiralis.

La purificación del péptido recombinante de T. spiralis producido por la clona pGEX-3.11 se realizó usando una columna de Glutation Sefarosa 4B siguiendo las instrucciones del proveedor (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia). La columna se lavó con 20 ml de PBS para remover la solución de preservación, después se equilibró con 6 ml de PBS + Tritón X-100. El extracto celular obtenido de la clona 3.11 se centrifugó a 6000 rpm y se filtró mediante un filtro de 0.22 µm antes de pasarse por la columna. Posteriormente se añadieron 5 ml de la muestra a la columna y se descartó el eluyente, la columna se lavó enseguida con 20 ml de PBS y se eluyó el material unido a la columna por competencia con un Amortiguador de Glutation 5 mM

en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, colectándose fracciones de 1 ml. La cuantificación de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Lowry (1951), modificado.

ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS CELULARES Y DE LOS PEPTIDOS RECOMBINANTES (SDS-PAGE) DE LA CLONA 3.11.

Los lisados y los péptidos de fusión purificados fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS, en una minicámara de electrofóresis (Hoeffer), a 140 V por 1 hr. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie al 0.1 % (Apéndice E).

SUEROS DE CERDOS.

Las muestras de sueros empleadas en el ensayo de ELISA fueron obtenidas de 10 cerdos de rastro infectados naturalmente y de 16 cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis*, y mantenidos a -20°C. Las muestras de suero de esos animales fueron inicialmente analizados por ELISA e IET para determinar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de superficie/esticosoma purificados de la larva muscular.

ENSAYO DE ELISA.

El ensayo de ELISA se realizó de acuerdo a lo descrito por Arriaga y cols. (1989), con algunas modificaciones. La proteína de fusión expresada por la clona 3-11 se empleó a una concentración de 5 µg/ml. El péptido recombinante se resuspendió en Amortiguador de Carbonatos, depositándose 100 µl en cada pozo de la placa de ELISA (Nunc-Immuno Plate, Inter. Med.). La placa se incubó toda la noche a 4°C, y al día siguiente se bloquearon los sitios donde no se adhirió el antígeno por 6 a hrs T. A. con

200 µl de PBS-Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 3 %-Tween 20 0.5 %. Los sueros problema se agregaron diluidos 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100 en PBS-ASB 3 %-Tween 20 0.5 %, en diferentes ensayos de ELISA, y se incubaron toda la noche a 4°C. Como controles negativos se utilizaron 6 sueros de cerdos no infectados, previamente analizados por inmunoelectrotransferencia, asimismo se incluyeron en el ensayo sueros de cerdos infectados experimentalmente con Ascaris suum, Trichuris suis y Cysticercus cellulosae, estos sueros se emplearon a las mismas diluciones mencionadas anteriormente. Al siguiente día se lavaron los pozos de la placa con PBS-Tween 20 al 0.5 % 3 veces durante 5 minutos por cada lavado, enseguida se agregaron 100 µl del conjugado Igs de conejo anti IgG de cerdo acoplado a peroxidasa diluido a 1:10000 en PBS-ASB 3 %-Tween 20 al 0.5 %, incubándose 3 hrs a T. A. Posteriormente se lavaron los pozos de la placa 3 veces con PBS-Tween 20 0.5 %, 5 min cada uno, y se adicionaron 200 µl por pozo de Amortiguador Citrato-Fosfato con 4 mg/ml de o-fenilendiamina y 4 µl de Peróxido de Hidrógeno al 30%. La reacción se detuvo con 50 µl de Acido Sulfúrico 2.5 M. La D. 0. de la reacción se leyó en un lector de ELISA (Minireader 11, Dynatech).

RESULTADOS

ANALISIS DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis.

La obtención del extracto total de la larva muscular de T. spiralis se realizó de acuerdo al método descrito por Parkhouse y cols., (1981). La utilización de este procedimiento resultó eficiente en cuanto a la cantidad de antígeno obtenido, la cuál fue de 7 a 10 mg/ml. Además mediante geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 10 % se caracterizó el extracto total (Fig. 6), observándose un patrón proteico complejo, el cuál comprendió proteínas con pesos moleculares de 20 a 200 kDa, evidenciándose su integridad por medio del análisis electroforetico.

ANALISIS DE ANTIGENOS PURIFICADOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA DE LA LARVA MUSCULAR DE Trichinella spiralis.

A partir de 20 mg de extracto total de la larva muscular de T. spiralis se procedió a purificar a los antígenos de superficie/esticosoma de este parásito. Dicha purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. De esta purificación se obtuvieron 40 µg/ml de antígeno purificado. Los antígenos de superficie/esticosoma así purificados se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10 %, observandose la presencia de 4 bandas mayoritarias con pesos moleculares de 47, 52, 67 y 72 kDa (Fig. 7) similares a los reportados por Ortega-Pierres y cols. (1989). Estos antígenos de superficie/esticosoma purificados se emplearon posteriormente en un ensayo de ELISA con la finalidad de evaluar la presencia de anticuerpos dirigidos contra T. spiralis en sueros de cerdos infectados experimental y naturalmente con el parásito (ver más adelante).

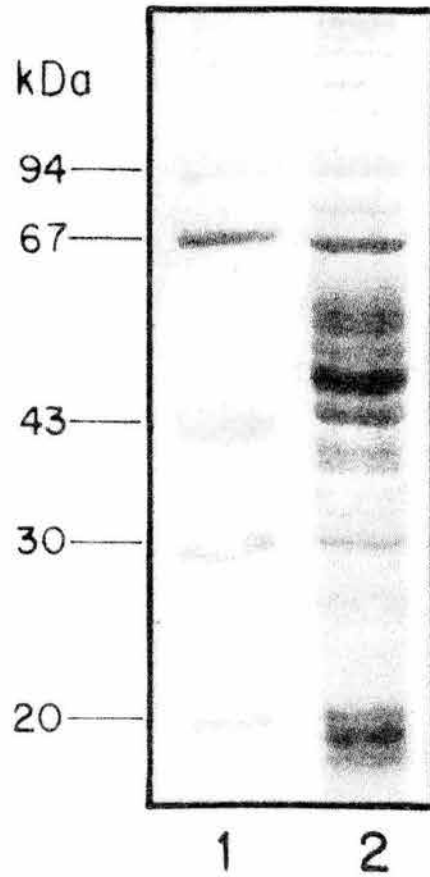


Fig. 6. Análisis electroforético del extracto total de la larva muscular de *I. spiralis*. El extracto total de la larva muscular (carril 2) se obtuvo como se describió en materiales y métodos y se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %. El peso molecular de las proteínas empleadas como estándares se presentan en el carril 1.

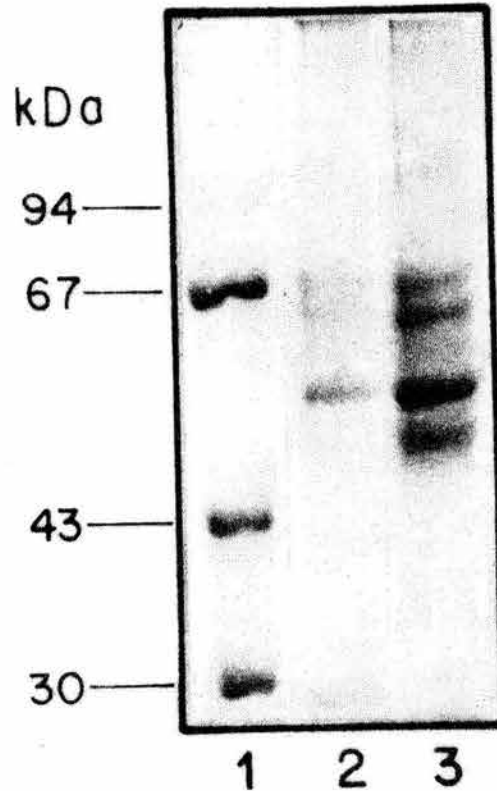


Fig. 7. Análisis electroforetico de antígenos purificados de superficie/esticosoma de la larva muscular. Los antígenos de superficie/esticosoma se purificaron mediante una cromatografía de afinidad empleando al anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. El peso molecular de las proteínas empleadas como estándares se presentan en el carril 1. Patrón de los antígenos purificados de la fracción pre-strip (carril 2) y antígenos purificados de la fracción alkali-strip (carril 3).

ANALISIS DE EL ADN PURIFICADO DE LA CLONA RECOMBINANTE Ts-3.

Para la purificación del ADN de la clona Ts-3 se siguió el método descrito por Silhavy y cols. (1984) obteniéndose aproximadamente 500 μ g de ADN. El ADN purificado de la clona Ts-3 se restringió con la enzima Eco RI con objeto de liberar el fragmento de ADNc de *T. spiralis* y se separó electroforéticamente en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio. En este análisis se observó la liberación de 2 fragmentos de ADN con pesos moleculares de 1.5 y 0.5 Kb (Fig. 8).

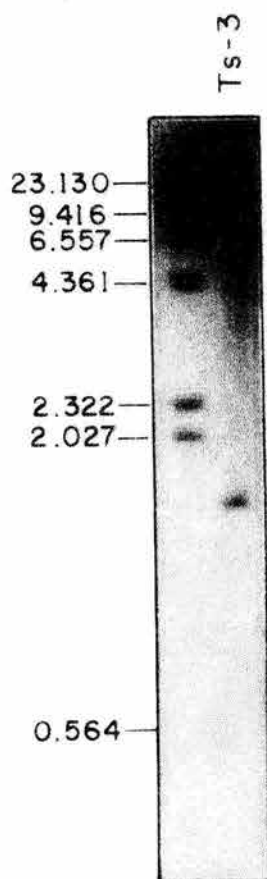


Fig. 8. Análisis electroforético del ADN de la clona Ts-3. El ADN de la clona Ts-3 se restringió con la enzima Eco RI y se analizó electroforéticamente en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio. Los marcadores de peso molecular usados como estándares fue el ADN de lambda HindIII.

OBTENCION Y ANALISIS DEL FRAGMENTO DE ADN DE 1.5 Kb.

El fragmento de ADN de 1.5 Kb se cortó del gel y se realizó la liberación del ADN del gel mediante el empleo del Kit de "Gene Clean", el cuál también sirvió para limpiar el fragmento de impurezas y poder subelarlo en el plásmido pGEX-3X. Como resultado de esta purificación se obtuvo entre 500 ng y 1 µg del inserto de 1.5 Kb, el cuál se procedió a ligar con el pGEX-3X linearizado.

ANALISIS DE CLONAS RECOMBINANTES EMPLEANDO EL VECTOR pGEX-3X.

El análisis de las clonas recombinantes se llevó a cabo por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % del ADN del plásmido silvestre y el ADNc de *T. spiralis* los cuales se ligaron con la enzima T4 ligasa, empleándose 2 relaciones molares (1:1 y 1:2). Posteriormente, con el producto de la ligación se realizó la transformación de la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5 α la cuál se había preparado competente.

La transformación de las células competentes se determinó mediante el uso del medio selectivo Luria-ampicilina. Con la relación molar 1:1 no se obtuvieron clonas a diferencia de la relación 1:2 en la cual se obtuvieron 24 clonas. Con la finalidad de diferenciar a las colonias que contenían el plásmido recombinante ó el plásmido parental se procedió a extraer el ADN de cada una de las 24 colonias obtenidas. Esto, se realizó mediante la técnica de extracción rápida de ADN descrita por Sambrook y cols. (1989). El ADN se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio. De las 24 clonas probadas 9 se consideraron como candidatos (Fig. 9) esto fue debido a que la migración del ADN de las clonas candidatos estaba por encima del ADN del pGEX3X parental, lo que indicaba que podrían ser recombinantes.

ANALISIS DE CLONAS RECOMBINANTES SELECCIONADAS.

Una vez que se determinaron las posibles clonas recombinantes se procedió a extraer en pequeña escala el ADN de éstas siguiendo la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979). Posteriormente se restringió el ADN con la enzima Eco RI y se analizó electroforéticamente en geles de agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio con la finalidad de comprobar la presencia del inserto de ADNc de *T. spiralis*. De este análisis se observó que de los 9 candidatos seleccionados previamente, sólo 6 de ellos contenían el fragmento de 1.5 Kb (Fig. 10). Una de estas clonas fue

seleccionada para su posterior caracterización y se le denominó 3.11 (Fig. 11).

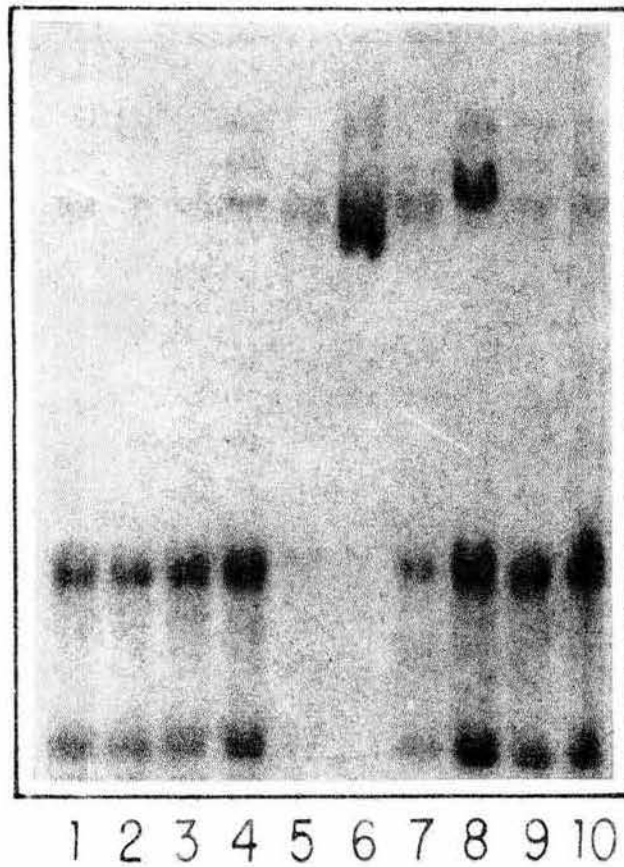


Fig. 9. Análisis electroforético del ADN de 9 clonas recombinantes. El ADN de las clonas recombinantes se obtuvo siguiendo la metodología de extracción rápida de ADN y se analizó electroforéticamente en geles de agarosa al 0.8 %. Carriles 1 a 5 y 7 a 10 ADN de las clonas recombinantes, carril 6 ADN del plásmido pGEX-3X circular.

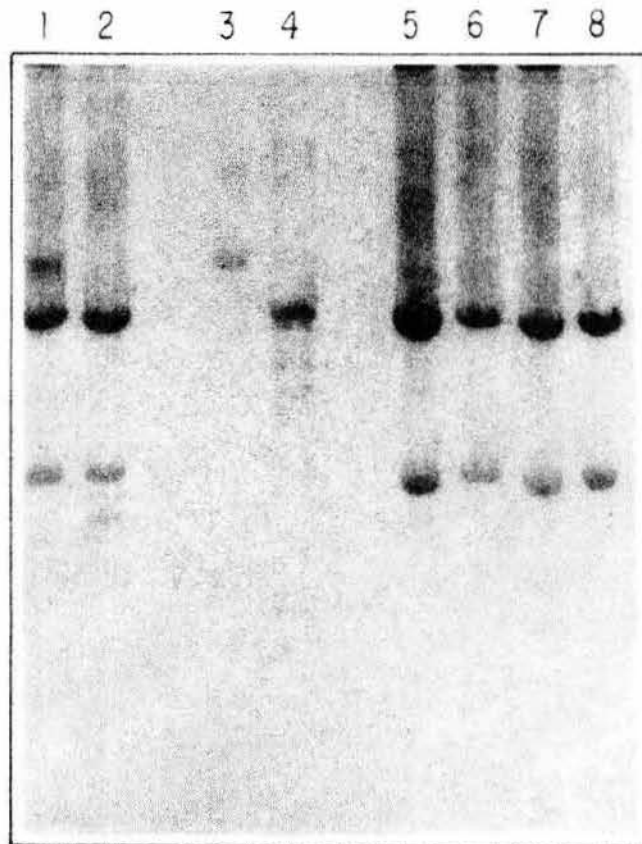


Fig. 10. Análisis electroforético del ADN de las clonas recombinantes seleccionadas. El ADN de las clonas seleccionadas se restringió con Eco RI y se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Carriles 1,2,5,6,7, y 8 ADN de las clonas candidatas restringidos con Eco RI. Carril 3, pGEX-3X circular; carril 4, pGEX-3X restringido con Eco RI.

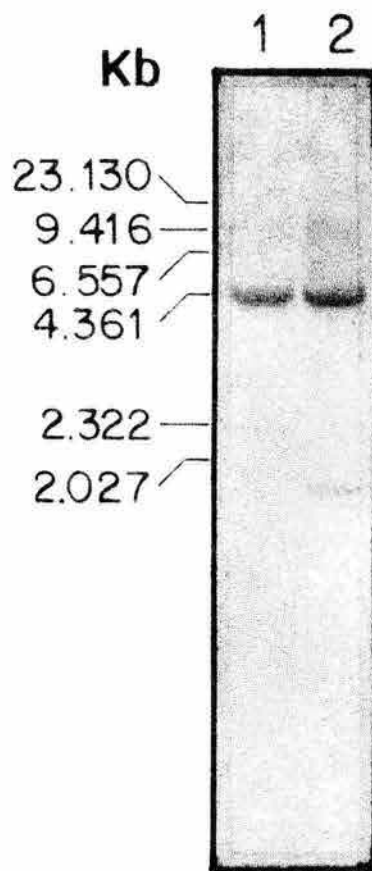


Fig. 11. Análisis electroforético del ADN de la clona 3.11 restringida con Eco RI. El ADN de la clona 3.11 se obtuvo por digestión con Eco RI y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1 ADN del pGEX-3X restringido con Eco RI, carril 2 ADN de la clona recombinante 3.11 restringida con la misma enzima. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de la figura.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE Trichinella spiralis.

La producción del péptido recombinante expresado por la clona 3.11 se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Smith y Johnson (1988), usando IPTG como inductor. El análisis electroforético del extracto total obtenido de la clona 3.11 en

geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 10 %, mostró la presencia de una molécula de 28 kDa la cuál no se detectó en el extracto obtenido de la clona parental; en este se observó una banda mayoritaria de 26 kDa correspondiente a la Glutation transferasa.

Considerando estos resultados se calculó que el péptido de *L. spiralis* expresado tiene un peso molecular de aproximadamente 2 kDa (Fig. 12).

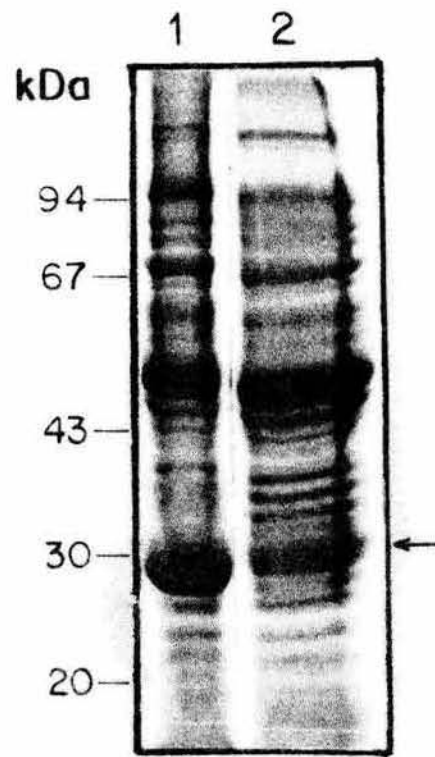


Fig. 12. Análisis electroforético del lisado total de la clona recombinante 3.11. El lisado de la clona 3.11 se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Smith y Johnson (1988) y se analizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %. Carril 1 Extracto total de la clona parental, carril 2 Extracto total de la clona 3.11. Los Marcadores de Peso Molecular se indican a la izquierda de la figura. El péptido recombinante se indica con la flecha.

ANÁLISIS DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE LA LARVA MUSCULAR DE *T. spiralis*.

A partir del lisado total expresado por la clona 3.11 inducida con IPTG se llevó a cabo la purificación del péptido recombinante mediante una cromatografía de afinidad empleando Glutación acoplado a Sefarosa 4B, obteniéndose de 5 a 10 mg/ml del péptido recombinante purificado. Posteriormente, éste se analizó electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 10 % y se observó una sola banda proteica de aproximadamente 28 kDa (Fig. 13).

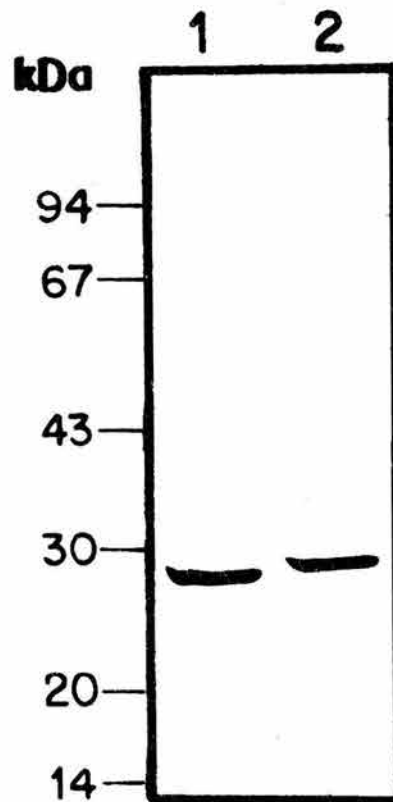


Fig. 13. Análisis electroforético de la proteína recombinante expresada por la clona 3.11. La proteína de fusión de la clona 3.11 se purificó por medio de una cromatografía de afinidad de Glutación acoplado a Sefarosa 4B y se analizó en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS. Carril 1., Glutación S-transferasa purificada de la clona parental; carril 2, Péptido recombinante de *T. spiralis* purificado. Los Marcadores de Peso Molecular se muestran a la izquierda de la figura.

ANÁLISIS DEL RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE *T. spiralis* POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS CON EL PARASITO.

Las muestras de suero de los cerdos infectados con *T. spiralis* fueron inicialmente analizadas en un ensayo de IET con el extracto total de la larva muscular del parásito. Mediante este análisis se observó el reconocimiento principal de 4 moléculas de la larva muscular, con pesos moleculares de 47, 52, 67 y 72 kDa. Como controles negativos se incluyeron sueros de cerdos no infectados y sueros de cerdos infectados con *Ascaris suum*, *Trichuris suis* y *Cysticercus cellulosae*, no observándose reactividad hacia estas moléculas. El patrón de reconocimiento obtenido por algunos de los sueros probados se muestran en la Fig. 14.

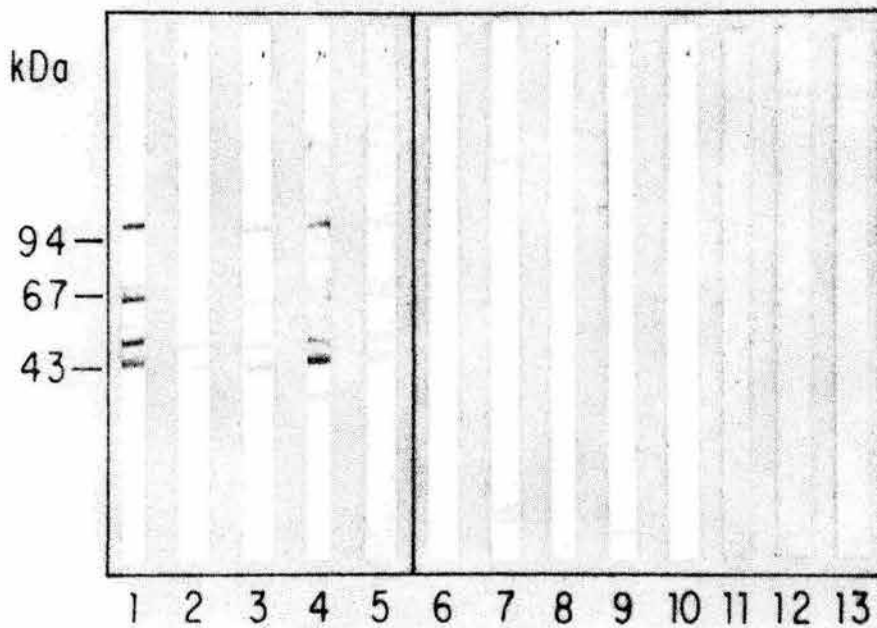
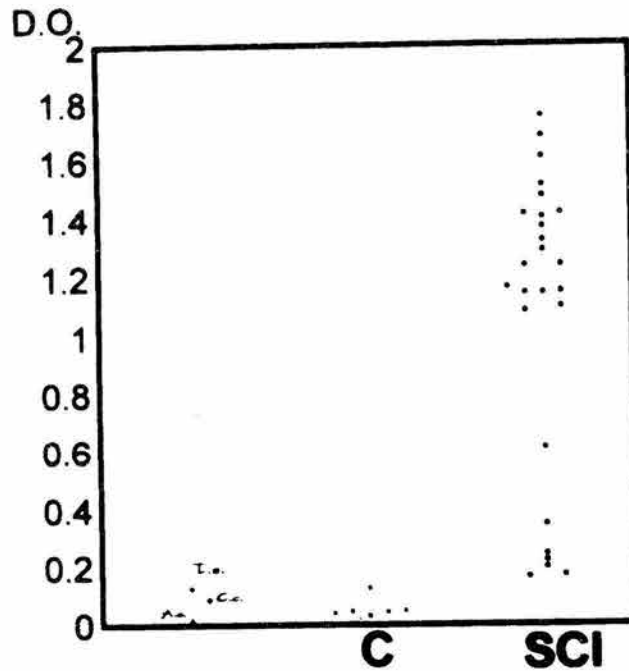


Fig. 14. Análisis del reconocimiento de antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* por algunos de los sueros de cerdos infectados con el parásito mediante IET. Los antígenos de la larva muscular se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Posteriormente las tiras se reaccionaron con sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* a una dilución de 1:100. Carriles 1 al 5, sueros de cerdos infectados con *T. spiralis*; carriles 6 al 10, sueros de cerdos no-infectados; carril 11, suero de cerdo infectado con *Cysticercus cellulosae*; carril 12, suero de cerdo infectado con *Trichuris suis*; carril 13, suero de cerdo infectado con *Ascaris suum*.

EVALUACION DEL USO DEL PEPTIDO RECOMBINANTE DE Trichinella spiralis EN EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS PORCINA MEDIANTE EL ENSAYO DE ELISA.

Los sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con T. spiralis fueron probados en un ensayo de ELISA, empleando 1 µg de los antígenos de superficie/esticosoma purificados con el anticuerpo monoclonal NIM-M1. Asimismo, se incluyeron como controles negativos sueros de cerdos que mediante IET no presentaron reactividad hacia los componentes de la larva muscular de T. spiralis; sueros de cerdos infectados con otros parásitos como Ascaris suum, Trichuris suis y Cysticercus cellulosae. Los resultados de este análisis mostraron la presencia de anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie/esticosoma en 26 sueros probados, por lo que fueron considerados como positivos, (Tabla 7). El punto de corte de este ensayo fue de 0.128 y se calculó considerándose la media de los valores de densidad óptica (D. O.) obtenidos por los sueros de los cerdos no infectados más 2 desviaciones estándar. Los valores de D. O. obtenidos con los sueros de cerdos infectados con otros parásitos quedaron por debajo del punto de corte calculado (Gráfica 1).

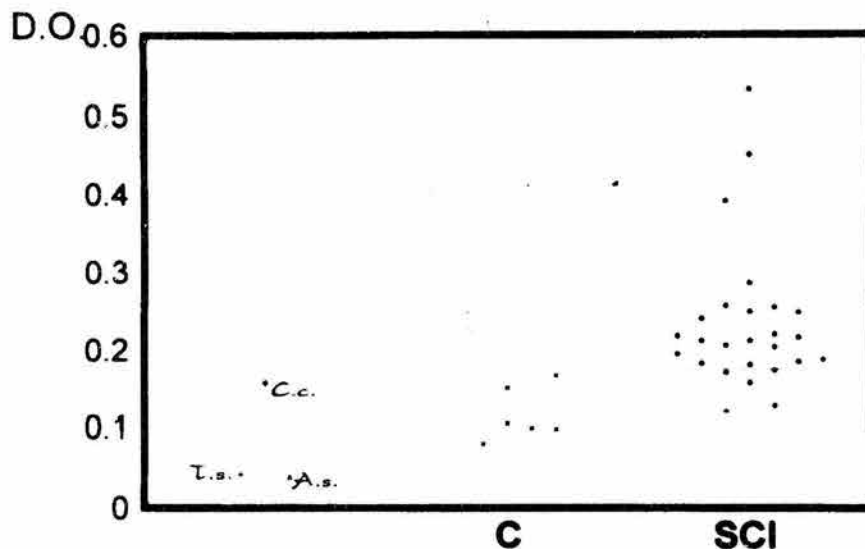


Gráfica 1. Valores de densidad óptica (D. O.) obtenidas en ensayos de ELISA empleando sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. El ensayo de ELISA se realizó empleando antígenos purificados de superficie/esticosoma de la larva muscular a una concentración de 1 µg/ml y los sueros de animales infectados experimentalmente y naturalmente con el parásito diluidos 1:250.

Los sueros que reconocieron por ELISA a los antígenos de superficie/esticosoma se emplearon posteriormente para evaluar el valor diagnóstico del péptido recombinante de *T. spiralis* producido por la clona 3.11. Para este fin, se empleó la proteína de fusión a una concentración de 5 µg/ml en un ensayo de ELISA y los sueros de cerdos infectados se probaron a diferentes diluciones (1:25, 1:50, 1:75 y 1:100). Los resultados obtenidos demostraron que la utilización de los sueros diluidos 1:100 es más conveniente ya que las reacciones inespecíficas se ven reducidas,

obteniéndose un punto de corte de 0.177 en comparación con 0.412 para la dilución 1:25 (Tabla 6), para calcular el valor de corte se consideró el valor medio de D. O. más 2 desviaciones estandar. Empleando la dilución 1:100 y considerando el punto de corte de 0.177, 21 de los 26 sueros de cerdos infectados reconocieron el péptido recombinante de *T. spiralis*, teniendo el ensayo una sensibilidad del 81 % (Gráfica 2 y Tabla 7), y especificidad del 100 % (Tabla 8).

Cuando se consideraron en este ensayo únicamente los sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* provenientes de rastro (10), se obtuvo una sensibilidad del 90 % comparada con 75 % obtenida con los sueros de cerdos infectados experimentalmente con el parásito (16). (Gráficas 3 y 4 respectivamente).



Gráfica 2. Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados con el parásito diluidos 1:100 y empleando el péptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml. Sueros de cerdos infectados con *Cysticercus cellulosae* (C. c.), *Ascaris suum* (A. s.), *Trichuris suis* (T. s.). Sueros de cerdos no infectados (C), Sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* (SCI).

TABLA 6.

Reactividad de los sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con *T. spiralis* hacia el péptido recombinante expresado por la clona 3.11 en ensayos de ELISA

Dilución de los sueros de cerdo no infectados	Valor de corte D.O._{492nm} X\pm 2S	Porcentaje de Sensibilidad*
1:25	0.412	26.92
1:50	0.341	15.38
1:75	0.320	23.07
1:100	0.177	80.7

X=Valor medio.

***=3 ensayos.**

TABLA 7.

Sensibilidad del ensayo de ELISA con la proteína recombinante de *T. spiralis* empleando muestras de sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con *T. spiralis*.

	Proteína			Antígeno de S/E		
	Recombinante (A)			Purificado (B)		
	N.S.	(+)	(-)	N.S.	(+)	(-)
Sueros de cerdos						
no infectados	6	0	6	6	0	6
Sueros de cerdos infectados con						
<i>T. spiralis</i>.	26	21	5	26	26	0
SENSIBILIDAD	81 %			100 %		

(A) = El péptido de fusión de *T. spiralis* se empleó a una concentración de 5 µg/ml y los sueros a una dilución 1:100.

(B) = El antígeno de superficie/esticosoma purificado se empleó a una concentración de 1 µg/ml y los sueros a una dilución 1:250.

N.S. = Número de sueros.

(+) = Positivos.

(-) = Negativos.

TABLA 8.

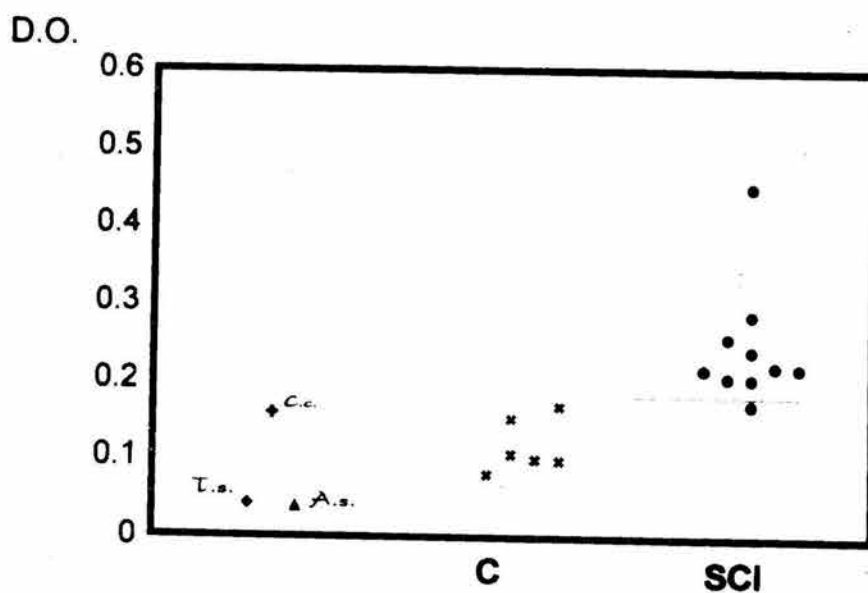
Análisis de la especificidad de la proteína recombinante de *T. spiralis* en el diagnóstico de triquinelosis porcina empleando sueros de cerdos infectados con otros parásitos.

Antígeno			
Valores de D. O.			
		Proteína Recombinante	GST♣
SUEROS 1:100		X	X
<i>Cysticercus cellulosae</i>	(8)*	0.158	0.072
<i>Trichuris suis</i>	(2)*	0.043	0.004
<i>Ascaris suum</i>	(2)*	0.039	0.001
Sueros de cerdos			
no infectados	(6)*	0.117	0.070
Sueros de cerdos			
infectados	(21)*	0.2537	0.060
		ESPECIFICIDAD	100 %

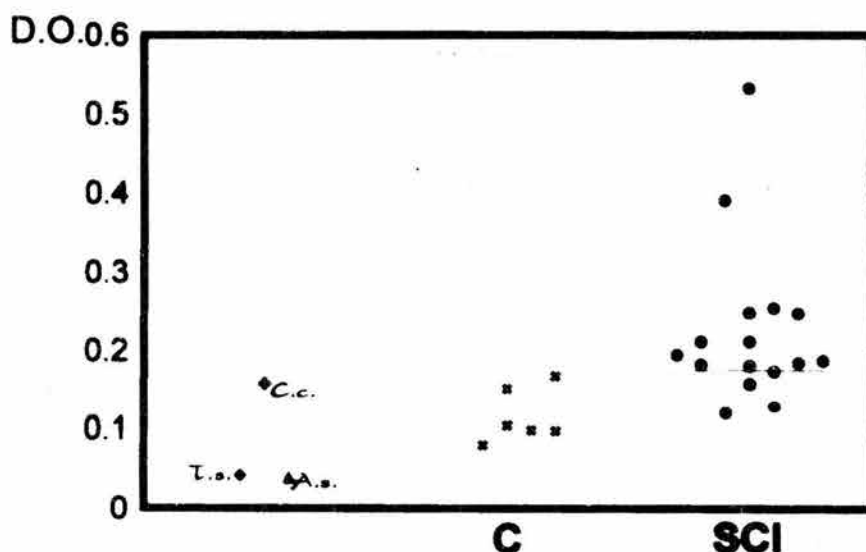
X= Valor medio.

*** Número de sueros.**

♣ GST= Glutación S-transferasa.



Grafica 3. Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* provenientes de rastro diluidos 1:100 y empleando el peptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml. Sueros de cerdos infectados con *Cysticercus cellulosae* (C. c.), *Ascaris suum* (A. s.), *Trichuris suis* (T. s.). Sueros de cerdos no infectados (C), Sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* (SCI).



Gráfica 4. Valores de D. O. obtenidos en ELISA empleando sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* diluidos 1:100 y empleando el péptido recombinante de la clona 3.11 a una concentración de 5 ug/ml. Sueros de cerdos infectados con *Cysticercus cellulosae* (C. c.), *Ascaris suum* (A. s.), *Trichuris suis* (T. s.). Sueros de cerdos no infectados (C), Sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* (SCI).

DETERMINACION DEL RECONOCIMIENTO DE LA PROTEINA DE FUSION DE *Trichinella spiralis* POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS EMPLEANDO IET.

Con la finalidad de demostrar el reconocimiento del péptido recombinante de *T. spiralis* por los sueros de cerdos infectados con el parásito, se transfirió la proteína de fusión a tiras de nitrocelulosa, las cuales se reaccionaron con sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con *T. spiralis* diluidos 1:100. Estos sueros se seleccionaron porque dieron valores de D. O. más altos en el ensayo de ELISA empleando el péptido recombinante. Como puede observarse en la figura 15 (A y B), estos sueros reconocieron el péptido recombinante de *T. spiralis* (3.11), sin embargo, en ambos casos no se observó reconocimiento de la Glutación S-transferasa expresada por la clona parental (3c). En este ensayo se incluyó también un suero de cerdo no infectado, observándose no reactividad hacia el péptido recombinante de *T. spiralis*.

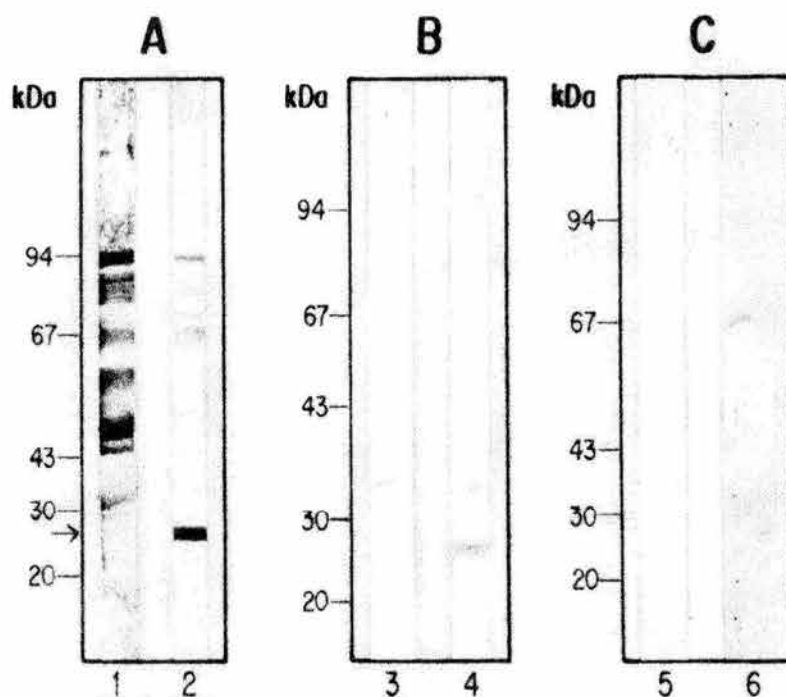


Fig. 15. Ensayo de IET para determinar el reconocimiento del péptido recombinante por muestras de sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. Extractos totales de la clona 3.11 (carriles 2,4,6) y la clona 3c (carriles 1,3,5) que expresa el plásmido parental se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Posteriormente, las tiras se reaccionaron con una dilución 1:100 de sueros de animales no infectados y de cerdos infectados experimental y naturalmente con *T. spiralis*. Los marcadores de peso molecular se indican en la figura. La flecha indica el péptido recombinante de *T. spiralis*.

DISCUSION

En los últimos años se ha observado en nuestro país un incremento en el número de casos clínicos de triquinosis, además de presentarse como una infección epidémica (Martínez-Marañón 1983, 1985; Hernández y cols., 1992). El consumo de carne de cerdo infectada con el parásito ha sido el mecanismo principal de transmisión de la infección a humanos. Debido a esto, es necesario que se apliquen pruebas de diagnóstico de la infección a dos niveles, 1) en el estudio masivo de cerdos con la finalidad de detectar carne contaminada con el parásito, para lo cual se requiere un método de diagnóstico con el cual se detecten infecciones crónicas, las cuales incluyan cargas parasitarias muy bajas y 2) en el diagnóstico de infecciones humanas durante la fase aguda de la infección, de tal forma que se pueda llevar a cabo un tratamiento con fármacos.

En relación con el diagnóstico de triquinosis porcina, éste se realiza en los rastros mediante la demostración directa de la larva muscular en biopsias de músculo (triquinoscopía). Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones ya que el tamaño de la muestra es pequeño y restringe la detección de las larvas en el músculo de animales aún con cargas parasitarias altas, pasando desapercibidas infecciones con cargas parasitarias bajas.

En algunos rastros de países europeos la detección de T. spiralis se realiza principalmente por digestión artificial del diafragma ó lengua de los cerdos. Este método ha sido aceptado por la Comunidad Europea por ser confiable en la detección de infecciones por T. spiralis en cerdos y en comparación con la triquinoscopía, ha resultado ser más preciso y menos laborioso (Ramisz 1985).

En la actualidad, una alternativa empleada en el diagnóstico de triquinosis es el uso de métodos serológicos, los cuales han sido reconocidos como métodos potenciales en la identificación de infecciones con parásitos específicos aún en la ausencia de síntomas clínicos característicos o sin la determinación del parásito. Una

de las técnicas más empleadas para este fin es el ensayo de ELISA, que es altamente sensible y útil en la determinación tanto de anticuerpos contra el parásito como de antígenos parasitarios. La sensibilidad de este ensayo en la detección de anticuerpos específicos contra T. spiralis ha sido comparada con la sensibilidad de los métodos directos (triquinoscopía y digestión artificial) así como con otros métodos serológicos indirectos (inmunofluorescencia, contraelectroforesis, fijación de complemento Ruitenberg y cols., 1976; van Knapen y cols., 1976; van Knapen y cols., 1981; van Knapen y cols., 1984) observándose con el ensayo de ELISA una mayor sensibilidad en el diagnóstico de triquinelosis.

Sin embargo, uno de los mayores obstáculos para el empleo del ensayo de ELISA es la obtención de reacciones falso-positivas. Esto se ha atribuido a los antígenos utilizados en estos ensayos, los cuales generalmente son extractos totales de la larva muscular del parásito, obteniéndose reacciones cruzadas con sueros de animales infectados con otros parásitos. Bajo estas condiciones se reduce la posibilidad de detectar niveles bajos de anticuerpos específicos contra T. spiralis, obteniéndose a su vez falsos-negativos.

A este respecto, diversos grupos de investigación han empleado en el ensayo de ELISA, productos de secreción-excreción y de superficie esticosoma purificados de la larva muscular mediante anticuerpos monoclonales, obteniéndose un incremento en la especificidad y sensibilidad del diagnóstico de la infección, pudiéndose detectar cerdos aún con cargas parasitarias muy bajas (Gamble y Graham 1981, Arriaga y cols. 1989).

Por otro lado, los antígenos de superficie/esticosoma y de secreción-excreción de la larva muscular de T. spiralis considerados dentro del grupo de antígenos TSL-1 (Appleton y cols. 1991) son inmunodominantes y Wisnewski y cols. (1993) han caracterizado bioquímica e inmunológicamente al epítipo responsable de esta inmunodominancia. Mediante técnicas de cromatografía de gas/espectrometría de masa

(CG/EM) se han identificado y cuantificado a los azúcares asociados con los antígenos del grupo de TSL-1. Una característica de la composición de carbohidratos del grupo TSL-1 fue la elevada concentración de residuos de fucosa, la cual es conocida por su relevancia inmunológica en mamíferos y sistemas parasitarios. Este carbohidrato se presenta en parásitos como Toxocara canis (Glicoproteínas ES) y esquistosomas (Glicocalix). Por otro lado, una característica única de los antígenos TSL-1, fue la identificación de una 3,6-dideoxyhexosa denominada tivelosa. Esta familia de azúcares son comunes en Salmonella y en E. coli, se encuentran en los lipopolisacáridos y constituyen grupos inmunodominantes y son resistentes a la oxidación por periodato. En Ascaris se ha aislado en los huevecillos otro tipo de 3,6-dideoxihexosas denominada 3,6-dideoxiarabinohexosa. Se ha observado que este componente le confiere a los huevecillos las propiedades de resistencia a la desecación y a la penetración de otras sustancias tales como gases y solventes orgánicos. Sin embargo, la tivelosa parece ser específica del género Trichinella ya que otros antígenos de otros parásitos helmintos tales como Toxocara canis, Schistosoma mansoni, Hymenolepis diminuta, Heligmosomoides polygyrus, Dirofilaria immitis, Trichuris muris, Aspicularis tetraptera y Syphacea obvelata no mostraron reactividad cruzada con esta molécula en ensayos de ELISA por inhibición competitiva (Denkers y cols., 1991). De esta forma se ha sugerido que dado que la tivelosa es específica y es un epítipo inmunodominante que constituye a los antígenos TSL-1, ésta puede ser utilizada en el diagnóstico de la triquinosis porcina.

Un aspecto importante para poder realizar lo anterior es que la tivelosa puede ser sintetizada químicamente, lo cual asegura su estabilidad así como su pureza, las cuales son características limitantes en el empleo de cualquier molécula en el desarrollo de métodos de diagnóstico. Sin embargo, dado que la tivelosa se encuentra presente en bacterias Gram negativas como Salmonella y E. coli, resulta relevante evaluar si los sueros de cerdos infectados con T. spiralis tienen reactividad hacia

extractos de estos organismos, esto con la finalidad de evitar la existencia de falsos positivos en el diagnóstico de la triquinelosis porcina.

Por otro lado, los antígenos del grupo TSL-1 además de tener utilidad en el diagnóstico de la triquinelosis, participan en la inducción de protección contra T. spiralis (Ortega-Pierres y cols. 1989). Además, Jarvis y Pritchard (1992) demostraron que los antígenos de secreción-excreción desglucosilados obtenidos de la larva muscular de T. spiralis inducen protección en ratones en contra de la infección por el parásito. Los autores sugieren que aunque el epítipo dominante del grupo TSL-1 es de naturaleza de carbohidrato, la parte proteica participa activamente en la inducción de inmunidad protectora. Cabe mencionar que los autores usaron periodato de sodio para desglucosilar los antígenos de secreción-excreción y como se mencionó anteriormente, la tivelosa es resistente a este tratamiento, por lo que es posible que los productos de superficie/esticosoma hayan contenido residuos de este azúcar y parte de la protección conferida se deba a este azúcar, por lo que es necesario realizar nuevos experimentos de protección con antígenos tratados mediante hidrólisis ácida suave.

Por otro lado, la utilización de los antígenos TSL-1 en el diagnóstico de la triquinelosis requiere su producción a gran escala. Una forma de lograr lo anterior es el empleo de técnicas de ingeniería genética para realizar la clonación de los genes que codifican para los antígenos de interés y que pueden ser expresados en sistemas bacterianos permitiendo su producción eficiente, de tal forma que puedan ser usados en el diagnóstico de triquinelosis en poblaciones abiertas.

En la actualidad existen vectores de expresión los cuales han sido usados en la clonación de genes que codifican para antígenos parasitarios, útiles en el diagnóstico de diferentes infecciones parasitarias. En especial, el vector pGEX-3X ha permitido expresar antígenos recombinantes de Trypanosoma cruzi (Ibañez y cols., 1987), Taenia taeniaeformis (Bowtell y cols., 1983, 1984, 1986), Echinococcus multilocularis (Gottstein y cols., 1983, 1987; Vogel y cols., 1988; Müller y cols., 1989; Hemmings y

McManus, 1989, 1991), Toxoplasma gondii (Tenter y Johnson 1991; Parker y cols., 1991) y Babesia bovis (Böse y cols., 1990) entre otros. En el presente trabajo se empleó este vector para subclonar el inserto de ADNc de la clona Ts-3, la cual codifica para un péptido de T. spiralis, el cual comparte determinantes antígenicos con los antígenos de superficie/esticosoma del parásito. El empleo del pGEX-3X permitió la purificación del péptido de T. spiralis fusionado a la Glutación S-transferasa mediante el uso de una cromatografía de afinidad empleando Glutación reducido y bajo condiciones no desnaturalizantes. La proteína de fusión purificada se obtuvo a una concentración de 5 a 10 mg/ml lo cual concuerda a lo reportado por Smith y Johnson (1988), quienes obtuvieron alrededor de 8 mg/ml de una proteína de fusión expresada en el vector pGEX-3X y purificada empleando el mismo tipo de cromatografía descrita en este trabajo. El análisis electroforético del péptido purificado reveló una sola banda de proteína con peso molecular de 28 kDa (Fig. 12). De esta forma la expresión y purificación del péptido recombinante de T. spiralis fue altamente eficiente empleando este vector. Asimismo, en este trabajo se evaluó mediante un ensayo de ELISA el uso de este péptido en el diagnóstico de triquinosis porcina. Para realizar esto, se utilizaron sueros de cerdos cuya infección con T. spiralis se había probado previamente mediante IET, evidenciándose el reconocimiento de un patrón antígeno característico de animales infectados con el parásito. Además, se demostró la reactividad de estos sueros hacia los antígenos de superficie/esticosoma purificados de la larva muscular de T. spiralis empleando un ensayo de ELISA. Los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA empleando el péptido recombinante purificado demostraron que 21 de los 26 sueros de cerdos infectados con T. spiralis reconocieron al péptido de fusión, confiriendo una sensibilidad del 81 % (Tabla 7) y una especificidad del 100 % (Tabla 8). Es importante hacer notar que la sensibilidad del ensayo de ELISA empleando el péptido recombinante purificado aumentó al incrementarse la dilución de los sueros de cerdos infectados con el parásito, de tal forma que a la dilución 1:25 se obtuvo una

sensibilidad del 27 % comparado con una sensibilidad del 81 % a la dilución 1:100 (Tabla 6). Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren la utilidad del péptido recombinante de T. spiralis en el diagnóstico de triquinosis porcina. Sin embargo la sensibilidad del ensayo aún podría aumentarse reduciendo la reactividad de los sueros empleados hacia la Glutación S-transferasa, lo cual permitiría reducir los valores de D. O. de los sueros de cerdos no infectados y por consiguiente un punto de corte más bajo, obteniéndose menos falsos negativos. Lo anterior se puede realizar mediante el uso del Factor X el cual reconoce una secuencia específica en la proteína recombinante liberándose el péptido de T. spiralis. Otro aspecto que debe ser considerado es el tiempo que los sueros son mantenidos en congelación, ya que se ha reportado que pueden ocurrir reacciones inespecíficas o pérdida de reactividad cuando las muestras de suero son mantenidas en congelación por periodos mayores de 3 meses (van der Leek y cols., 1992).

Por otro lado, el empleo en este tipo de ensayos de una mezcla de péptidos recombinantes redituaría en una mayor sensibilidad, ya que aumentaría el número de epítomos a reconocerse por los sueros de animales infectados con T. spiralis, eliminando los problemas inherentes a la heterogeneidad de la respuesta inmune del huésped. En otras parasitosis como en el caso de oncocercosis, el empleo de 3 proteínas recombinantes en un ensayo de ELISA confirmó una sensibilidad del 96 % comparable a la obtenida con un extracto total de Onchocerca volvulus (Bradley y cols., 1993). Asimismo, lo anterior se ha demostrado en el diagnóstico de Echinococcus multilocularis (Gottstein y cols., 1993).

El uso de péptidos sintéticos también permitiría reducir las reacciones inespecíficas haciendo posible la utilización de una mezcla de ellos (Vergara y cols., 1992). A este respecto existen numerosas evidencias que demuestran que el uso de péptidos sintéticos ha permitido desarrollar métodos de diagnóstico altamente sensibles y específicos en otros parasitosis (Hemmings y McManus, 1989 y 1991; Müller y

cols., 1989; Felleisen y Gottstein, 1993; Gottstein y cols., 1993; Tenter y Johnson, 1991).

En cuanto al uso de péptidos recombinantes como vacunas, Mitchell (1984) ha considerado algunas ventajas en éstas, que incluyen: a) Mejor control de calidad y monitoreo de la estabilidad de la vacuna, b) La probabilidad de evitar inducir respuestas inmunes no deseadas, reacciones tóxicas y efectos dañinos después de la vacunación y c) Obtención de antígenos recombinantes de organismos de diferentes estadios del ciclo de vida de éstos, que simplemente no pueden ser obtenidos en grandes cantidades.

Así, la utilización de péptidos recombinantes en la inducción de inmunidad protectora contra diferentes parasitosis ha sido exitosa. Gottstein y cols., (1990) emplearon péptidos recombinantes para inducir una respuesta inmune humoral y celular en ratones y perros infectados con Salmonella typhimurium en la cual habían clonado el gene II/3-10 del parásito Echinococcus multilocularis. La vacuna recombinante se denominó S. typhimurium+pVM II/3-10 y fue administrada por 2 vías: la subcutánea y la oral. Se observó que los niveles de anticuerpos fueron mayores en animales que recibieron la vacuna por vía subcutánea y que la respuesta humoral y celular fue aumentada después de la administración de la vacuna. Así, es evidente que la elección del péptido y la vía por la cual se presenta el mismo al sistema inmune pueden ser factores críticos a considerar cuando se apliquen péptidos recombinantes o sintéticos como vacunas.

Por otro lado, Johnson y cols. (1989) emplearon una proteína recombinante de Taenia ovis fusionada a Glutación S-transferasa en la vacunación de ovejas observándose una protección del 94 % contra el desafío con los huevecillos del parásito. Un aspecto importante de mencionar es el hecho de que la misma proteína fusionada a β -galactosidasa no indujo protección. Con respecto a la utilización de vacunas moleculares en la inmunoprofilaxis de triquinosis, sería de interés evaluar el

uso del péptido recombinante de T. spiralis obtenido en este trabajo de tesis en la inducción de una respuesta inmune en contra de la infección por el parásito. Lo anterior, en base a que esta proteína de fusión comparte determinantes antígenicos con los componentes de superficie/esticosoma de la larva muscular del parásito los cuales participan en la inducción de protección en contra de la infección (Ortega-Pierres y cols. 1989; Jarvis y cols., 1992) . Además, el péptido recombinante no está glicosilado, por lo que su uso permitiría determinar la participación de la parte proteica de estos antígenos en la inducción de protección. El hecho que existen anticuerpos dirigidos contra este péptido en el suero de cerdos infectados tanto natural como experimentalmente con T. spiralis demostrados en esta tesis tanto por ELISA como por IET es una evidencia de la inmunogenicidad de estos antígenos.

Por otro lado, el empleo de péptidos sintéticos en la inmunoprofilaxis de infecciones parasitarias es una alternativa a la utilización de péptidos recombinantes, un ejemplo de esto es el estudio realizado por Patarroyo y cols. (1988). Estos autores emplearon la vacuna denominada SPf(66)30, la cual es una mezcla de 3 péptidos sintéticos (83.1, 55.1 y 35.1) del merozoito de Plasmodium falciparum, obteniéndose una supresión en el desarrollo de la parasitemia en voluntarios humanos inmunizados. Esta es la primera vacuna elaborada y probada en humanos la cual confiere un buen grado de protección contra el estadio sanguíneo asexual de Plasmodium falciparum. Más recientemente Millet y cols. (1993) evaluaron la inmunogenicidad de la vacuna SPf66 contra Plasmodium falciparum en seres humanos voluntarios. El resultado de este estudio señala que la inmunización con la vacuna induce títulos elevados de anticuerpos contra los péptidos sintéticos mostrando así la presencia en estas moléculas de epítomos para células B, confiriendo un 79 % de protección.

Es evidente que el empleo de antígenos recombinantes o sintéticos de T. spiralis tanto en el diagnóstico como en la inmunoprofilaxis de la triquinosis permitirá desarrollar medidas de control de esta infección en áreas endémicas

redituando finalmente en el control de la transmisión de esta parasitosis al humano.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 24 clonas recombinantes por subclonación del ADNc de la clona Ts-3 en el vector pGEX-3X y en 6 de ellas se demostró la presencia del inserto clonado.

2. La clona 3.11 que fue seleccionada de las clonas recombinantes obtenidas expresó eficientemente el péptido recombinante de T. spiralis, después la inducción con IPTG.

3. Se obtuvo un alto rendimiento en la purificación del péptido recombinante (5 a 10 mg/100ml) por cromatografía de afinidad empleando Glutación acoplado a Sefarosa 4B.

4. El análisis electroforético del péptido recombinante purificado mostró la presencia de una sola banda proteica de 28 kDa, calculando así que el péptido clonado de T. spiralis tiene un peso molecular de 2 kDa.

5. El empleo del péptido recombinante purificado de T. spiralis permitió detectar con una sensibilidad del 81 % a sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito.

6. La especificidad del ELISA empleando el péptido recombinante con sueros de cerdos infectados con otros parásitos fue del 100 %.

7. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mostraron que el péptido recombinante de T. spiralis es útil en el diagnóstico de triquinosis porcina.

APÉNDICE A

FENOL SATURADO

El fenol se destiló y se congeló, el pH era menor a 7.8, se sacó el fenol del congelador y se dejó que se descongelara a T. A., después se calentó a 68°C y se le agregó hidroxiquinoleina a una concentración final de 0.1 %. Después de hervir el fenol se le adicionó un volumen igual de Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a T. A., se mezcló durante 15 min, cuando las 2 fases se habían separado, se aspiró la fase acuosa. Después se adicionó un volumen igual pero de Amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 al fenol y se agitó de nuevo por 15 min a T. A., se removió la fase acuosa y se repitieron las extracciones hasta que la fase fenólica tenía un pH mayor de 7.8 (medido con papel indicador de pH). Cuando el fenol ya había sido equilibrado se le adicionó 0.1 volumen de Amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0) conteniendo 0.2 % de β -Mercaptoetanol, y se mantuvo en congelación hasta su utilización.

APÉNDICE B

GENE CLEAN

Protocolo para aislar y limpiar ADN de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la banda del gel de agarosa de bajo punto de fusión en donde se encontraba el ADN de la clona Ts-3 y se añadieron 3 volúmenes de la solución de Yoduro de Sodio del Kit (Gene Clean, Bio 101) volumen a volumen correspondiente al pedazo recortado del gel de agarosa de bajo punto de fusión, se dejó 3 min a 42°C y se depositaron 5 µl de glass milk del Kit, resuspendiendo las perlas con la solución del ADN y el Yoduro de Sodio, después se centrifugó (centrífuga eppendorf) a 10000 rpm por 30 seg. se decantó el sobrenadante y las perlas de vidrio con el ADN se lavaron 3 veces con New Wash del Kit resuspendiendo las perlas en esta solución y centrifugando en cada lavado a 10000 rpm por 30 seg. Posteriormente se resuspendieron las perlas en 10 µl de agua estéril, se incubaron 3 min a 42°C y se centrifugaron a 10000 rpm por 30 seg. Se extrajo la fase acuosa y se llevó a un gel de agarosa (Ultra Pure, BRL) al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio, para ver la concentración del ADN limpiado.

APÉNDICE C

MEDIOS DE CULTIVO (por litro)

SOB

Bacto triptona 20.0 g, Extracto de Levadura 5.0 g, Cloruro de Sodio 0.5 g, ajustar el pH a 7.5 con KOH.

LURIA

Bacto triptona 10.0 g, Bacto Levadura 5.0 g, Cloruro de Sodio 5.0 g.

Psi-b

Extracto de levadura 5.0 g, Bacto triptona 20.0 g, Sulfato de Magnesio 2.0 g ajustar el pH a 7.6 con KOH.

SM

Cloruro de Sodio 5.8 g, Sulfato de Magnesio 2.0 g, Tris-HCl 1 M pH 7.5 50.0 ml, Solucion de Gelatina al 2% 5.0 ml.

APÉNDICE D

Amortiguadores

PBS

Cloruro de Sodio 150 mM, Fosfato de Sodio Dibásico 16 mM, Fosfato de Sodio Monobásico 4 mM ajustar el pH a 7.3.

TBF 1

Acetato de Potasio 30 mM, Cloruro de Rubidio 100 mM, Cloruro de Calcio 10 mM, Cloruro de Manganeso 50 mM, Glicerol 15 % ajustar el pH 5.8 con 0.2 M de Acido acético. FILTRAR

TBF 2

MOPS 10 mM, Cloruro de Calcio 75 mM, Cloruro de Rubidio 10 mM Glicerol 15 % ajustar el pH 6.5 con KOH. FILTRAR

Alkali-strip

Dietilamina 50 mM, Deoxicolato de Sodio al 2% pH 11.5.

Amortiguador de Columna

Tris-HCl 20 mM, Deoxicolato de Sodio al 0.5% pH 8.3

Pre-strip

Glicina 50 mm, Deoxicolato de Sodio al 2% pH 9.3

Tris-Boratos 5X

54 g Trisma-base, 27.5 g Acido Borico, 20 ml EDTA al 0.5 M pH.8.0

Colorante 6X

Azul de Bromofenol 0.25 %, Xilen Cianol FF 0.25 %, Glicerol 30 %.

Amortiguador para extracción rápida de ADN

Cloruro de Sodio 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 2 mM pH 7.5..

Set

Lisozima 2 mg/ml, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0

Amortiguador de Carbonatos

Carbonato de Sodio 1.59 g, Bicarbonato de Sodio 2.93g, pH 9.6

Amortiguador para Electroforesis

Tris-base 3.02 g, Glicina 14.41 g, y 5 ml de SDS al 20 %, aforado a 1 litro
pH a 8.3.

Amortiguador de transferencia

12.11 g de Trisma base, 57.68 g de Glicina y 800 ml de Metanol, aforado a 4
litros durante 1 hr a 4°C con cambios de la solución cada 30 min.

Solucion Sustrato para inmunoelectrotransferencia

20 ml de PBS, 4 ml de un stock 6X de 4-cloro-1-naftol en Metanol absoluto: 3
mg/ml, y 8 µl de Peróxido de Hidrógeno al 30 %.

APÉNDICE E

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (SDS-PAGE).

Para la elaboración de geles de poliacrilamida en presencia de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) fue necesario preparar las siguientes soluciones stock.

1. Amortiguador para el gel concentrador (BGC 8X).

Trisma base 2 M pH 6.8 (50 ml), SDS al 20 % (4 ml), aforar a 100 ml con agua bidestilada.

2. Amortiguador para el gel espaciador (BGE 5X) .

Trisma base 2 M pH. 8.8 (187.5 ml), SDS 20 % (5 ml), aforar a 200 ml con agua bidestilada.

3. Acrilamida 30 % /Bisacrilamida 0.8 %.

Acrilamida 60 g, N'N'-metilen-bis-acrilamida 1.6 g, Glicerol 60 ml, aforar a 200 ml con agua bidestilada y posteriormente filtrar varias veces.

4. Amortiguador de Muestra 5X.

Trisma base 2M pH.6.8 (0.78 ml), SDS 20 % (2.5 ml), Glicerol (0.97 ml), Azul de Bromofenol al 2% en glicerol al 60 % (25 μ l), llevar a 5 ml con agua bidestilada.

PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 10 %. CONCENTRADOR AL 5%.

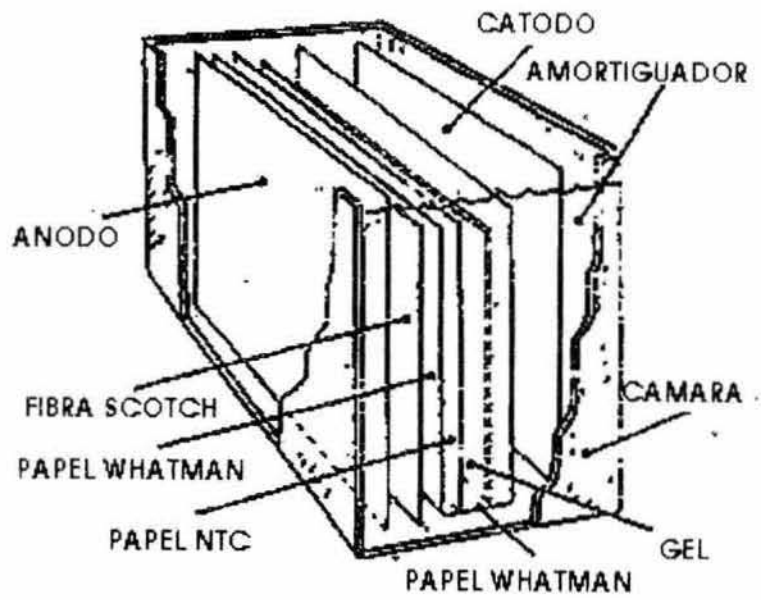
BGC 8X (0.25 ml), H₂O (1.41 ml), Acril/Bisacrilamida 30:0.8 % (0.33 ml), N', N', N', N'-Tetrametiletilediamina (TEMED) (1.5 μ l), Persulfato de Amonio (APS) 10 % (12 μ l).

ESPACIADOR AL 10%.

BGE 5X (1.88 ml), H₂O (4.44 ml), Acril/Bisacrilamida 30:0.8 % (3.16 ml), TEMED (5 μ l), APS 10% (20 μ l).

APÉNDICE F

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aluja, A. S. (1982) **Frequency of porcine cysticercosis in México.** In: Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. A. Flisser, K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (ed.) New York, Academic Press pp. 53.

Andrews, J. S., D. E. Zinter and N. E. Schultz. (1969) **Evaluation of the Trichinosis Pilot Project.** En Proc. 73rd Ann Meet. U. S. Animal Health Assoc. p.332.

Appleton, J. A., R. G. Bell, W. Homan and F. van Knapen. (1991) **Consensus on Trichinella spiralis Antigens and Antibodies.** Parasitology Today. 7(8):190-192.

Arriaga, C., E. Muñiz, A. Morilla, and G. Ortega-Pierres. (1989) **Trichinella spiralis: Recognition of Muscle Larva Antigens during Experimental Infection of Swine and its Potential Use in Diagnosis.** Experimental Parasitology. 69:363-372.

Bautista-Garfias, C. R. (1985) **Diagnóstico serológico de la triquinosis porcina.** En: Avances en Enfermedades del Cerdo. Editado por Morilla, A., Correa, P. y Stephano, A. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A. C. México, D. F., 587-589.

Bell, R. G. and D. D. McGregor. (1979) **Trichinella spiralis: Role of Different Cycle Phase in Induction, Maintenance and Expression of Rapid Expulsion in Rats.** Experimental Parasitology 48:51.

Birnboim, H. C. and J. Doly. (1979) **A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA.** Nucl. Acids Res. 7:1513-1523.

Bowtell, D. D. L., G. F. Mitchell, R. F. Anders, M. W. Lightowers and M. D. Rickard. (1983) **Taenia taeniaeformis: Immunoprecipitation Analysis of the Protein Antigens of Oncospheres and Larvae.** Exp. Parasitol. 56:417-427.

Bowtell, D. D. L., R. B. Saint., M. D. Rickard and G. F. Mitchell. (1984) **Expression of Taenia taeniaeformis Antigens in Escherichia coli.** Mol. Biochem. Parasitol. 13:173-185.

Bowtell, D. D. L., R. B. Saint, M. D. Rickard and G. F. Mitchell. (1986) **Immunochemical Analysis of Taenia taeniaeformis Antigens Expressed in Escherichia coli.** Parasitology 93:599-610.

Böse, R., R. H. Jacobson, K. R. Gale, D. J. Waltisbuhl and I. G. Wright. (1990) **An Improved ELISA for the Detection of Antibodies Against Babesia bovis Using Either a Native or a Recombinant Babesia bovis Antigen.** Parasitology Research.

Bradley, J. E., K. R. Trenholme, A. J. Gillespie, R. Guderian, V. Titanji, Y. Hong and L. McReynolds. (1993) **A sensitive serodiagnostic Test for Onchocerciasis Using a Cocktail of Recombinant Antigens.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 48(2):198-204.

Campbell, W. C. (1983) **Epidemiology. I Modes of Transmission.** Cap. 13 in "Trichinella and Trichinosis" (ed. Campbell W. C.) p. 425 Plenum Press New York.

Campbell, W. C. (1988) **Trichinosis Revisited- Another Look at Modes of Transmission.** Parasitology Today. 4(3):83-86.

Davis, L. G., M. Dibner and J. Battey. (1986) Basic Methods in Molecular Biology. Ed. ELSEVIER. E. U. A. 338 pp.

Dennis, D. T., D. D. Despommier and N. Davis. (1970) **Infectivity of the New Born Larvae of Trichinella spiralis in the Rat.** Journal of Parasitology 56:974.

Denkers, E. Y., C. E. Hayes and D. L. Wassom. (1991) **Trichinella spiralis: influence of an Immunodominant, Carbohydrate-Associated Determinant on the Host Antibody Response Repertoire.** Experimental Parasitology. 72:403-410.

Despommier, D. D. and M. Muller. (1976) **The Stichosome and its Secretion Granules in the Mature Muscle Larva of Trichinella spiralis.** The Journal of Parasitology. 62(5):775-785.

Despommier, D. D. (1981a) **Partial Purification and Characterization of Protection-Inducing Antigens from the Muscle Larva of Trichinella spiralis by Molecular Sizing chromatography and Preparative Flatbed Isoelectric Focusing.** Parasite Immunology. 3:261-272.

Despommier, D. D. and A. Laccetti. (1981b) **Trichinella spiralis: Partial characterization of Antigens Isolated by Immuno-Affinity Chromatography from the Large-Particle Fraction of the Muscle Larvae.** Journal of Parasitology. 67(3):332-339.

Despommier, D. D. and A. Laccetti. (1981) **Trichinella spiralis: Proteins and Antigens Isolated from a Large-Particle Fraction Derived from the Muscle Larva.** Experimental Parasitology. 51:279-295.

Faubert, G. M., P. Viens, and P. Magluilo. (1985) **Superiority of the ELISA Technique over Parasitological Methods for Detection of Trichinellosis in Slaughtered Pigs in Canada.** Can. J. Comp. Med. 49:75-78.

Felleisen, R. and B. Gottstein. (1993) **Echinococcus multilocularis:**

Molecular and Immunochemical Characterization of Diagnostic Antigen 11/3-10. Parasitology. 107:335-342.

Gamble, H. R., W. R. Anderson, C. E. Graham and K. D. Murrell. (1983) **Diagnosis of Swine Trichinosis by EnzymeLinked Immunosorbent Assay (ELISA) Using an Excretory-Secretory Antigen.** Veterinary Parasitology. 13:349-361.

Gamble, H. R. and C. E. Graham. (1984a) **Comparison of monoclonal Antibody-Based Competitive and Indirect EnzymeLinked Immunosorbent Assays for the Diagnosis of Swine Trichinosis.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 6:379-389.

Gamble, H. R. and C. E. Graham. (1984b) **Monoclonal Antibody-Purified Antigen for the Immunodiagnosis of Trichinosis.** The American Journal of Veterinary Research. 45(1):67-74.

Gamble, H. R. (1985a) **Comparison of Immune Effects in Mice Immunized with *Trichinella spiralis* Adult and Larval Antigens.** The Journal of Parasitology. 71(5):680-682.

Gamble, H. R. (1985b) ***Trichinella spiralis*: Immunization of Mice Using Monoclonal Antibody Affinity-Isolated Antigens.** Experimental Parasitology. 59:398-404.

Gamble, H. R., K. D. Murrell, H. P. Marti. (1986) **Inoculation of Pigs Against *Trichinella spiralis*, Using Larval Excretory-Secretory Antigens.** The American Journal of Veterinary Research. 47(11):2396-2399.

Gold, A. M., D. D. Despommier and S. W. Buck. (1990) **Partial characterization of Two Antigens Secreted by Larvae of *Trichinella spiralis*.** Molecular and Biochemical Parasitology. 41:187-196.

Gottstein, B., J. Eckert and H. Fey. (1983) **Serological Differentiation Between *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* Infections in Man.** Z. Parasitenkd 69:347-356.

Gottstein, B. C., Langeler, P. Bachmann, P. Hagemann, P. Kpcher, M. Brossard, F. Witassek and J. Eckert. (1987) **Sero-epidemiological Survey for Alveolar Echinococcosis (by Em2-ELISA) of Blood Donors in an Endemic Area of Switzerland.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:960-964.

Gottstein, B., N. Müller, S. J. Cryz, M. Vogel, I. Tanner and T. Seebeck. (1990) **Humoral and Cellular Immune Response in Mice and Dogs Induced by Recombinant *Echinococcus multilocularis* Antigen Produced by a *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain.** Parasite Immunology 12:163-174.

Gottstein, B., P. Jacquier, S. Bresson-Hadni and J. Eckert. (1993) **Improved Primary Immunodiagnosis of Alveolar Echinococcosis in Humans by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using the Em2^{plus} Antigen.** Journal of Clinical Microbiology.31(2):373-376.

Grencis, R. K., C. Crawford, D. I. Pritchard, J. M. Behnke and D. Wakelin. (1986) **Immunization of Mice with Surface Antigens from the Muscle Larvae of *Trichinella spiralis*.** Parasite Immunology. 8:587-596.

Hanbury, R. D., P. B. Doby, H.O. Miller and K.D. Murrell. (1986) **Trichinosis in Herd of Swine: Canivalism as a Major Mode of Transmission.** Journal of American Veterinary Medical Association 188:1155-1159.

Hemmings, L. and D. P. McManus. (1989) **The Isolation, by Differential Antibody Screening, of *Echinococcus multilocularis* Antigen Gene Clones with Potential for Immunodiagnosis.** Molecular and Biochemical Parasitology. 33:171-182.

Hemmings, L. and D. P. McManus. (1991) **The Diagnostic Value and Molecular Characterization of an *Echinococcus multilocularis* Antigen Gene Clone.** Molecular and Biochemical Parasitology. 44:53-62.

Hernández, M., E. Ramos-Martínez, E. J. Casco-Sanchez, J. M. Morales-Gómez, E. M. Perez-Matos. (1992) **Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción.** Gaceta Medica de México. 128(1):45-50.

Homan, W. L., A. C. G. Derksen and F. van Knapen. (1992) **Identification of Diagnostic Antigene from *Trichinella spiralis*.** Parasitology Research. 78:112-119.

Huyhn, T. U., A. R. Young and R. W. Davis. (1985) **Construction an Screening cDNA Library in Lambda gt10 and Lambda gt11.** En: DNA cloning A practical approach. Vol. 1, ed. by Glover D. M. IRL Press limited. Oxford p.p. 49-78.

Ibañez, C. F., J. L. Affranchino and A. C. C. Frasch. (1987) **Antigens Determinants of *Trypanosoma cruzi* Defined by Cloning of Parasite DNA.** Molecular and Biochemical Parasitology 25:175-184.

James, E. R. and D. A. Denham. (1975) **Immunity to *Trichinella spiralis*. VI. The Specificity of the Immune Response Stimulated by the Intestinal Stage.** J. Helminthol 49:43.

James, E. R., A. Maloney and D. A. Denham. (1977) **Immunity to *Trichinella spiralis*. VII. Resistance Stimulated by Parenteral Stages of the Infection.** J. Parasitol. 63:720.

Jarvis L. M. and D. I. Pritchard. (1992) **An evaluation of the role of carbohydrate epitopes in immunity to *Trichinella spiralis***. Parasite Immunology. 14:489-501.

Johnson, K. S., G. B. L. Harrison, M. W. Lightowers, K. L. O'Hoyr W. G. Cogle, R.P. Dempster, S. B. Lawrence, J. G. Vinton, D. D. Heath and M. D. Rickard. (1989) **Vaccination Against Ovine Cysticercosis Using a Defined Recombinant Antigen**. Nature. 338:585-587.

Kazura, J. W., D. I. Grove. (1978) **Stage-specific Antibody-dependent Eosinophil-mediated Destruction of *Trichinella spiralis***. Nature 274:588-589.

Kelly, J. M. and M. L. Blaxter. (1987) **Rapid Characterization of Recombinant Lambda gt11 Clones Expressing Parasite Antigens**. Parasitology Today 3(10):

Kozar, Z. (1968) **Incidence of Trichinellosis in Poland and its Control**. Pw Ril Warszawa. 334 p.

Laemmli, U. K. (1970) **Claveage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4**. Nature 227:680.

Lowry, O. N., N. J. Rosenbrauh, A. L. Al Farr, and R. J. Randall. (1951) **Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent**. Journal of Biochemistry 193:265.

Martínez-Marañón, R. (1983) **Cuatro Nuevos Casos de Triquinosis Aguda en Naucalpan. Consideraciones Sobre la Frecuencia Real de la Enfermedad en México**. Sal. Pub. Méx. 25:712.

Martínez-Marañón, R. (1985) **Esta Aumentando la Triquinosis en México? Podría ser esto una Consecuencia Inesperada de Nuestro Desarrollo?** Sal. Pub. Méx. 27:40.

Marti. H. P. and K. D. Murrell. (1986) ***Trichinella spiralis*: Antifecundity and Antinewborn larvae Immunity in Swine**. Experimental Parasitology. 62:370-375.

McIntyre, P., R. L. Coppel, D. B. Smith, H. D. Stahl, L. M. Corcoran, C. J. Langford, J. M. Favaloro, P. E. Crewther, G. V. Brown, G.. F. Mitchell, R. F. Anders, and D. J. Kemp. (1987) **Expression of parasite antigens in *Escherichia coli***. International Journal of Parasitology. 17:59-67.

McLaren, D. J., G. Ortega-Pierres and R. M. E. Parkhouse. (1987) ***Trichinella spiralis*: Immunocytochemical Localization of Surface and Intracellular Antigens**

Using Monoclonal Antibody Probes. Parasitology. 94:101-114.

Miles, M. and J. L. Clark. (1989) **Immunoselection Techniques for Cloning DNA-encoding Parasite-specific Antigens.** Parasitology Today 5(1):

Millet, P., G. H. Campbell, A. J. Silzer, K. K. Grady, J. Pohl, M. Aikawa and W. E. Collins. (1993) **Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* Asexual Blood-Stage Synthetic Peptide Vaccine SPf66.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 48(3):424-431.

Mitchell, G. F. (1984) **Towards Molecular Vaccines Against Parasites.** Parasite Immunology 6:493-498.

Muller, N., B. Gottstein, M. Vogel, K. Flury and T. Seebeck. (1989) **Application of a Recombinant *Echinococcus multilocularis* Antigen in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Immunodiagnosis of Human Alveolar Echinococcosis.** Molecular and Biochemical Parasitology. 36:151-160.

Murrell, K. D. (1985a) **Strategies for the Control of Human Trichinosis Transmitted by Pork.** Food Technology. 39(3) 65-68 y 110-111.

Murrell, K. D. (1985b) ***Trichinella spiralis*: Acquired Immunity in Swine.** Experimental Parasitology. 59:347-354.

Murrell, K. D., W. R. Anderson, G. A. Schad. (1986) **Field Evaluation of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Swine Trichinosis: Efficacy of the Excretory-secretory Antigen.** Am J. Vet. Res. 47: 1046-1049.

Murrell, K. D., F. Stringfeliow, J. B. Dame, D. A. Leiby and G. A. Schad. (1987) ***Trichinella spiralis* in an Agricultural Ecosystem. 11. Evidence For Natural Transmission of *Trichinella spiralis spiralis* from Domestic Swine to Wildlife.** Journal of Parasitology. 73(1):103-109.

Ogilvie, B. M. and M. Philipp. (1980) **The Host-parasite Interaction, En: Molecules, Cells and Parasites in Immunology** (C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz-Ortiz and M. Sela eds.) pp 79-189. Academic Press, New York.

Ortega-Pierres, M. G., A. Chayen, N. W. T. Clark and R. M. E. Parkhouse. (1984) **The Occurrence of Antibodies to Hidden and Exposed Determinants of Surface Antigens of *Trichinella spiralis*.** Parasitology 88:359-369.

Ortega-Pierres, M. G., N. W. Almond and R. M. E. Parkhouse. (1987) **Applications of Biochemical Defined Antigens of *Trichinella spiralis* in Host Immunity, Protection and Diagnosis.** Wiadomosci Parazytologiczne. 33:423-452.

Ortega-Pierres, G., E. Muñiz, R. Coral-Vázquez and R. M. E. Parkhouse.

(1989) **Protection Against *Trichinella spiralis* Induced by Purified Stage-Specific Surface Antigens of Infective Larvae.** Parasitology Research. 75:563-567.

Parker, S. J., F. M. Smith and A. M. Johnson. (1991) **Murine Immune Responses to Recombinant *Toxoplasma gondii* Antigens.** Journal of Parasitology. 77(3):402-409.

Parkhouse, R. M. E., Phillip, M. and Ogilvie, B. M. (1981). **Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae.** Parasite Immunology, 3:339-352.

Parkhouse, R. M. E. and N. W. T. Clark. (1983) **Stage Specific Secreted and Somatic Antigens of *Trichinella spiralis*.** Molecular and Biochemical Parasitology. 9:319-327.

Parkhouse, R. M. E. (1984) **Immunopurification.** Research Medical Bulletin 40 (3):297-301.

Patarroyo, M. E., R. Amador, P. Clavijo, A. Moreno, F. Guzmán, P. Romero, R. Tascon, A. Franco, L. A. Murillo, G. Ponton and G. Trujillo. (1988) **A Syntetic Vaccine Protects Humans Against Challenge with Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum* Malaria.** Nature. 332:158-161.

Phillipp, M., R. M. E. Parkhouse, B. M. Ogilvie. (1980) **Changing Proteins on the Surface of a Parasitic Nematode.** Nature 287:538-540.

Phillipp, M., P. M. Taylor, R. M. E. Parkhouse and B. M. Ogilvie. (1981) **Immune Response to Stage-Specific Surface Antigens of the Parasitic Nematode *Trichinella spiralis*.** The Journal of Experimental Medicine. 154:210-215.

Phillipp, M. and F. D. Rumjanek. (1984) **Antigenic and Dynamic Properties of Helminth Surface Structures.** Molecular and Biochemical Parasitology. 10:245-268.

Pozio, E., G. La Rosa and P. Rossi. (1989) ***Trichinella* Reference Centre.** Parasitology Today. 5(6):169-170.

Ramisz, A. (1985) **Current problems of epidemiology and epizootiology of trichinellosis.** Proceedings of the 6th International Conference on Trichinellosis. Ed. by Kim, C. New York Press, Albany, p.p. 190-200.

Ramírez Valenzuela, M. **Epidemiología de la triquinelosis.** (1981) En: Ciencia Veterinaria. Editado por Moreno Chan, R. Universidad Nacional Autónoma de México. 3:278-334.

Robinson M., C. J. Krco, T. G. Beito and C. S. David. (1991) **Genetic Control**

of the Immune Response to ***Trichinella spiralis***: Recognition of Muscle Larval Antigens. Parasite Immunology. 13:391-404.

Ruitenbergh E. J., I. Ljungstrom, P. A. Steerenberg and J. Buys. (1975) **Application of Immunofluorescence and Immunoenzyme Methods in the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* Infection.** Annals New York Academy of Sciences. 298-303.

Ruitenbergh E. J., P. A. Steerenberg, B. J. M. Bros and J. Buys. (1976) **Reability of the enzyme immunoabsorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection in conventionally raised pigs.** J. Immunol. Methods. 10:67-83.

Ruitenbergh, E. J., F. van Knapen and A. Elgersma. (1983) **Incidence and Control of *Trichinella spiralis* Throughout the World.** Food Technology 37(3):98.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor, 2a. ed., E. U. A. 3 vol.

Seawright, G. L., D. Despommier, W. Zimmermann and R. S. Isenstein. (1983) **Enzyme Immunoassay for Swine Trichinellosis Using Antigens Purified by Immunoaffinity Chromatography.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 32(6):1275-1284.

Silberstein, D. S. (1983) **En: *Trichinella* and Trichinosis.** (ed. by Campbell W. C.) Plenum Press. New York pp 309-334.

Silberstein, D. S. and D. D. Despommier. (1984) **Antigens from *Trichinella spiralis* that Induce a Protective Response in the Mouse.** The Journal of Immunology. 132(2):898-903.

Silhavy, T. J., M. L. Berman and L. W. Enquist. (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

Simons, P. C. and D. L. Vander Jagt. (1981) **Purification of Glutathione S-transferase by Glutathione-affinity Chromatography Methods.** Enzymol 77(81):235-237.

Smith, H. J. and K. F. Snowdon. (1987) **Detection of *Trichinella spiralis* nativa Antibodies in Porcine Sera by ELISA Using *Trichinella spiralis* Excretory-Secretory Antigen.** The Canadian Journal of Veterinary Research. 51:413-414.

Smith, H. J. (1987) **Evaluation of the ELISA for the Serological Diagnosis of Trichinosis in Canadian Swine.** The Canadian Journal of Veterinary Research.

51:194-197.

Smith, D. B. and K. S. Johnson. (1988) **Single-step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* as Fusions with Glutathione S-transferase.** *Gene* 67:31-40.

Stewart, G. (1983) **Pathophysiology of the Muscle Phase.** En: "*Trichinella* and Trichinosis" (ed W. C. Campbell) pp. 241-264. Plenum Press, New York.

Sugane, K and T. Matsuura. (1990) **Molecular Analysis of the Gene Encoding and Antigenic Polypeptide of *Trichinella spiralis* Infective Larvae.** *Journal of Helminthology* 64:1-8.

Su, X., Prestwood, A. K. and McGraw. R. A. (1991). **Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45:331-336.

Takahashi, Y., N. Mizuno, T. Uno, C. Tokuda and T. Araki. (1990) **Direct Evidence that the Cuticle Surface of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae Shares Antigenicity with Sticocyte α -Granules and the Esophagus-Occupying Substance.** *The Journal of Parasitology*. 76(2):290-293.

Tenter A. M. and A. M. Johnson. (1991) **Recognition of Recombinant *Toxoplasma gondii* Antigens by Human Sera in an ELISA.** *Parasitology Research*. 77:197-203.

Towbin, H., T. Staehelin and L. Gordon. (1979) **Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications.** *Proceedings of the National Academic. Sciences U. S. A.* 76:4350-4354.

van Knapen, F., Framstad, K. and Ruitenber, E. J. (1976). **Reability of ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) as control method for the detection of *Trichinella spiralis* infections in naturally infected slaughter pigs.** *The Journal of Parasitology*, 62(2):332-333.

van Knapen, F., J. H. Franchimont, A. R. Verdonk, J. Stumpf and K. Undeutsch. (1982) **Detection of Specific Immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and Total IgE Levels in Human Trichinosis by Means of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 31(5):973-976.

van Knapen, F., J. H. Franchimont, E. J. Ruitenber, P. Andre, B. Baldelly, T. E. Gibson, C. Gottal, S. A. Henriksen, G. Kohler, O. Roneus, N. Skovgard, C. Soule, K. L. Strickland and S. M. Taylor. (1981) **Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infections in pigs.** *Vet. Parasitol*

9:117-123.

van Knapen, F., J. H. Franchimont, E. J. Ruitenbergh, P. Andre, B. Baldelly, T. E. Gibson, S. A. Henriksen, G. Kohler, O. Roneus, N. Skovgard, C. Soule, K. L. Strickland, S. M. Taylor, D. U. Thomsen and F. Wolff. (1984) **Comparison of Three Methods for Detection of Prolonged Experimental Trichinellosis in Pigs.** *Veterinary Parasitology*. 16:167-171.

van der Leek, M. L., J. B. Dame and R. C. Littell. (1992) **Minimizing ELISA Background in the Diagnosis of Swine Trichinellosis.** *Journal of Parasitology*. 78(5):822-829.

van der Leek, M., J. B. Dame, C. L. Adams, K. D. Gillis, R. C. Littell. (1992) **Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Trichinellosis in Swine.** *The American Journal of Veterinary Research*. 53(6):877-882.

Vergara, U., C. Veloso, A. González and M. Lorca. (1992) **Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Chagas' Disease Using Synthetic Peptides.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 46(1):39-43.

Vogel, M. B., Gottstein B., N. Muller and T. Seebeck. (1988) **Production of a Recombinant Antigen of *Echinococcus multilocularis* with High Immunodiagnostic Sensibility and Specificity.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 31:117-126.

Wakelin, D. and D. A. Denham. (1983) **The Immune Response.** En: "*Trichinella* and Trichinosis" (W. C. Campbell ed.) pp. 265. Plenum Press, New York.

Wakelin, D., W. Harnett and M. E. Parkhouse. (1993) **Nematodes.** En: **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections.** Editor K. S. Warren. Blackwell Scientific Publications. 3a. edition.

Wassom, D. L., D. Wakein, B. O. Brooks, C. J. Krco and C. S. David. (1984) **Genetic Control of Immunity to *Trichinella spiralis* Infections in Mice. Hypothesis to Explain the Role of H-2 Genes in Primary and Challenge Infections.** *Immunology* 51:625-631.

Wilson, S. M. (1991) **Nucleic Acid Techniques and the Detection of Parasitic Diseases.** *Parasitology Today*. 7(9):225-259.

Wisniewski N., M. McNeil, R. B. Grieve and D. L. Wassom. (1993) **Characterization of Novel Fucosyl- and Tyvelosyl Containing Glycoconjugates from *Trichinella spiralis* Muscle Stage Larvae.** *Molecular and Biochemical Parasitology*. 61:25-36.

Xinzhuan S. and A. K. Prestwood. (1991) **A Dot-ELISA Mimicry Western Blot Test for the Detection of Swine Trichinellosis.** Journal of Parasitology. 77(1):76-82.

Yepéz-Mulia, L., C. Montañez and Ortega-Pierres M. G. (1988) **Surface Antigens from Trichinella spiralis Muscle Larvae Expressed by Escherichia coli.** En: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis. eds. C. E. Tanner, A. R. Martínez-Fernández and F. Bolas-Fernández. pp. 47-52. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España.

Yepéz, Mulia Lilián. (1993) **Clonación y Expresión de Genes que Codifican para Antígenos de Superficie/Esticosoma de la Larva Muscular de Trichinella spiralis Útiles en el Diagnóstico.** Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.

Young, R. A. and R. W. Davis. (1983) **Efficient Isolation of Genes by Using Antibody Probes.** Proc Natl. Acad. Sci, U. S. A. 80:1194-1198.

Zarlenga, D. S. and H. R. Gamble. (1990) **Molecular Cloning and Expression of an Immunodominant 53-kDa Excretory-Secretory Antigen from Trichinella spiralis Muscle Larvae.** Molecular and Biochemical Parasitology. 42:165-174.