

La caracterización de los antígenos de superficie del nemátodo parásito *Trichinella spiralis*: estudio de su participación en los mecanismos de protección y su utilidad en el diagnóstico de la triquinosis

Ma. Guadalupe Ortega-Pierres*

Resumen

*Entre los aspectos más importantes en el estudio de la triquinosis, se encuentra el desarrollo de los métodos de diagnóstico específicos y confiables, que permitan la detección oportuna de la infección, así como la identificación y caracterización de antígenos del parásito que previenen la infección. En este contexto, la caracterización de los antígenos de superficie esticosoma y de excreción/secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis*, ha sido muy relevante, dada su alta inmunogenicidad prácticamente en todos los huéspedes hasta ahora estudiados. Así, durante el desarrollo de este trabajo se ha logrado identificar y caracterizar las moléculas de estos dos compartimentos de la larva muscular de *T. spiralis* que se han empleado tanto en la detección específica de la infección por *T. spiralis* (particularmente en cerdos), como en los ensayos para evaluar su potencial en la inducción de protección en modelos murinos.*

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, antígenos de superficie esticosoma y de excreción/secreción, protección, diagnóstico.

Summary

*Among the most important aspects in the study of trichinosis are the development of specific and sensitive diagnostic methods for the detection of the infection by the parasite as well as the characterization of antigens from *Trichinella spiralis* that induce protection in the host. In this context, the characterization of surface stichosome and excretory secretory antigens of *T. spiralis* muscle larvae has been an important issue due to the high immunogenicity of such components in most hosts so far studied. In this work, we have been able to identify and characterize molecules from both compartments of muscle larvae. These components have been used in assays for specific detection of *T. spiralis* infections particularly in pigs, as well as in assays to evaluate their role in the induction of protection in mice.*

Key words: *Trichinella spiralis*, surface stichosomal antigens, excretory secretory components, protection, diagnosis.

* Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Apartado Postal 14-740, México, D.F. 07000, DF. Tel. 7 52 06 77 ext. 5329 o 5349. Fax 7 52 6330

Introducción

A nivel mundial, la incidencia de enfermedades producidas por parásitos helmintos es muy alta. Las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud son del orden de 600 millones.¹ En la mayor parte de los casos, estos parásitos infectan primates o humanos, lo que dificulta su estudio en condiciones experimentales. Sin embargo, algunos como la *Trichinella spiralis*, son capaces de infectar a un gran número de huéspedes incluyendo a animales de experimentación. El poder contar con modelos experimentales ofrece muchas ventajas para llevar a cabo estudios sobre la respuesta inmune del huésped hacia el parásito, la interacción de éste con los mecanismos efectores del huésped, así como de la biología misma del parásito y la patología de la enfermedad que produce. Así, los estudios con *T. spiralis* pueden ofrecer perspectivas para entender los mecanismos que se desarrollan en enfermedades causadas por otros parásitos helmintos.

T. spiralis es un nemátodo que causa la enfermedad denominada triquinosis. En seres humanos, ésta tiene una amplia distribución y la fuente principal de transmisión es la carne de cerdo infectada con este parásito. En algunos países se considera endémica; sin embargo, en la mayor parte de las áreas geográficas en donde se presenta esta infección, ocurre en forma epidémica.^{2,3}

Específicamente en nuestro país, se han reportado brotes de la enfermedad en diversos estados de la República, a pesar de las medidas de control sobre la comercialización de la carne de puerco;^{4,5} por lo tanto, resulta muy importante detectar las fuentes de infección e implementar medidas de control, para evitar la transmisión de la enfermedad en seres humanos.

El diagnóstico clínico de la enfermedad resulta difícil, ya que los síntomas pueden confundirse con los de otros padecimientos.⁶ Debido a esto, resulta muy importante desarrollar métodos serológicos de diagnóstico para detectar tanto los anticuerpos, como los antígenos del parásito, a fin de conocer específicamente si el individuo se encuentra parasitado por *T. spiralis*.

La respuesta inmune que se genera en contra de este parásito, está en gran medida dirigida hacia los antígenos de superficie que se localizan

en la cutícula del parásito, así como hacia los antígenos de excreción/secreción de este mismo.⁷ Esto es debido, en gran parte, a que los antígenos presentes en estos compartimentos del parásito, constituyen el primer sitio de interacción entre el parásito y el huésped. Es por esto que la caracterización de estos antígenos de *T. spiralis* reviste gran importancia, ya que pueden participar en los mecanismos de protección en contra de la infección y también ser útiles en el desarrollo de los métodos de diagnóstico específicos y sensibles para esta parasitosis.

Considerando lo anterior, inicialmente nos propusimos llevar a cabo la caracterización de los antígenos de superficie de los tres estadios del ciclo de vida de este parásito, que son: la larva muscular (LM), el adulto (A) y la larvación nacida (LRN). Sin embargo, dada la importancia de los antígenos de superficie del estadio de LM en la inducción de inmunidad en el huésped infectado, se enfatizó el estudio de éstos en su posible uso para la inducción de protección, así como en su utilidad en el diagnóstico de la triquinosis.

Material y métodos

Parásitos. El ciclo de vida de *Trichinella spiralis* se mantuvo en ratones BALB/c del Bioterio del CINVESTAV-IPN. Las larvas musculares se obtuvieron por digestión en pepsina de músculo estriado de ratones sacrificados, por lo menos 30 días después de la infección. Los parásitos adultos se obtuvieron por incubación de los intestinos de ratas Sprague-Dale sacrificadas 6 días después de la infección con LM. Las LRN se colectaron después de incubar durante 18 h a 37°C los parásitos adultos en medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino.⁸

Preparación de los antígenos de T. spiralis.

Extracto total. El extracto se obtuvo por homogenización de las LM o A en solución amortiguadora de Tris pH 8.2, la cual contenía inhibidores de proteasas y desoxicolato al 4%. Los extractos solubles totales de LRN se obtuvieron de manera similar, excepto que se usó el método de sonicación para romper los parásitos.⁸

Antígenos purificados de superficie/esticosoma: S/E. Estos antígenos de la LM se obtuvieron por cromatografía de afinidad, empleando un anticuerpo monoclonal preparado vs antígenos de S/E, de acuerdo a lo descrito por Ortega-Pierres y col.⁹

Antígenos de excreciones-secreciones de la LM. Los antígenos de E/S fueron amablemente proporcionados por el doctor H.R. Gamble del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Beltsville MA, USA.

Marcaje de los antígenos de superficie y el análisis electroforético. El marcaje de componentes de superficie de los tres estadios de *T. spiralis*, se llevó a cabo empleando ¹²⁵I y cloramina T de acuerdo al protocolo reportado por Ortega-Pierres y col.⁸ Los antígenos así obtenidos, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Obtención de anticuerpos monoclonales, ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de actividad biológica de estos anticuerpos. La obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) en contra de los antígenos de superficie de los tres estadios de *T. spiralis* y los ensayos de IFI con parásitos vivos y para la localización de reactividad de los AcM en secciones fijadas de LM, se realizaron de acuerdo a lo descrito por Ortega-Pierres y col.⁸ y por McLaren y col.¹⁰ Como ensayos de actividad de AcM con LRN, se emplearon citotoxicidad mediada por anticuerpos y transferencia pasiva de inmunidad.¹¹

Evaluación de los antígenos de superficie de LM en la inducción de inmunidad protectora hacia T. spiralis en ratones. Los antígenos purificados de superficie de LM se evaluaron en cuanto a su papel en la inducción de la inmunidad protectora en ratones BALB/c, determinando el número de LM y A recuperados de animales inmunizados con los antígenos de superficie de LM y retados con LM.⁹

Muestras de suero. Las muestras de suero analizadas se obtuvieron de cerdos infectados experimentalmente, de cerdos de traspato y de animales sacrificados en rastros del Estado de México. Las muestras de sueros control se obtuvieron de cerdos no infectados con *T. spiralis* o de animales infectados con *Ascaris suum* o con *Trichuris suis* solamente.^{12,13}

ELISA. Los sueros colectados se analizaron por ELISA, empleando el extracto total, antígenos

purificados de S/E, antígenos de E/S, y el péptido recombinante de la LM, según la técnica escrita por Arriaga y col.¹²

Inmunoelctrotransferencia. La inmunoelctrotransferencia de las proteínas de la larva muscular de *T. spiralis* y la reactividad inmunológica de las muestras de suero de cerdos control e infectados, se realizaron como lo describen Arriaga y col.¹²

Detección de LM en tejido muscular de animales. La detección de LM en tejido muscular de diafragma y lengua de cerdos infectados experimentalmente y de manera natural con *T. spiralis* (cerdos de rastro), se llevó a cabo por triquinoscopia y digestión artificial de acuerdo a lo descrito por Arriaga y col.¹³

Obtención del banco de cDNA de T. spiralis, selección y caracterización de clonas recombinantes y subclonación del inserto de cDNA en el plásmido pGEX-3X. El banco de cDNA de la LM del parásito, se preparó en el bacteriófago lambda gt11 y las clonas recombinantes se seleccionaron, empleando anticuerpos de ratón preparados en contra de antígenos purificados de superficie de LM.¹⁴ La caracterización de las clonas recombinantes y la subclonación del inserto de cDNA de una de éstas en el plásmido pGEX-3X, se llevó a cabo como lo describen Yépez-Mulia y col.¹⁵

Purificación del péptido de fusión. La purificación del péptido de fusión de la LM de *T. spiralis* clonado en el vector pGEX-3X, se realizó empleando una columna de Glutación Sefarosa 4B de acuerdo a lo reportado por Yépez-Mulia y col.¹⁵

Resultados y discusión

En principio se llevó a cabo la caracterización de los antígenos de superficie de los tres estadios del parásito, por medio de radiomarcaje de superficie con ¹²⁵I. Estos estudios permitieron definir primeramente que los componentes de superficie de los tres estadios de vida de este parásito, que son accesibles al marcaje con el radioisotopo empleado, son pocos en número. Así se identificaron, por SDS-PAGE: 4 antígenos para la LM de 105, 90, 55 y 47 kDa; 3 componentes para el A de 40, 33 y 20 kDa y finalmente 4 moléculas para la LRN de 64, 58, 34 y 30 kDa (Figura 1). Es importante señalar que el número de antígenos radiomarcados,

aunque es reducido, puede variar, así como su migración electroforética, dependiendo del método de marcaje y del agente solubilizante que se emplee en la extracción de estos componentes, como ha sido reportado por nuestro grupo y por otros autores.^{9,16}

El hecho de que estos componentes de superficie sean pocos en número, facilitó su caracterización tanto por métodos bioquímicos como por ensayos inmunológicos. Considerando estos últimos, se prepararon AcM en contra de estos antígenos. De éstos se seleccionaron aquellos que presentaran reactividad en contra de las moléculas de superficie de los tres estadios y se designaron NIM-M1 y NIM-M2 para la LM, NIM-M3 y NIM-M4 para el A y NIM-M5 y NIM-M6 para la LRN. En ensayos de precipitación de antígenos marcados de los tres estadios con los AcM seleccionados, se observó que los AcM reconocieron específicamente los componentes marcados de cada estadio del parásito, sin presentarse reacciones cruzadas. Asimismo, se observó por IFI que algunos AcM reconocieron epítopes expuestos en la superficie del parásito mientras que otros AcM, aun cuando precipitaran antígenos radiomarcados similares, no reaccionaron con la superficie de parásitos vivos (Cuadro I)

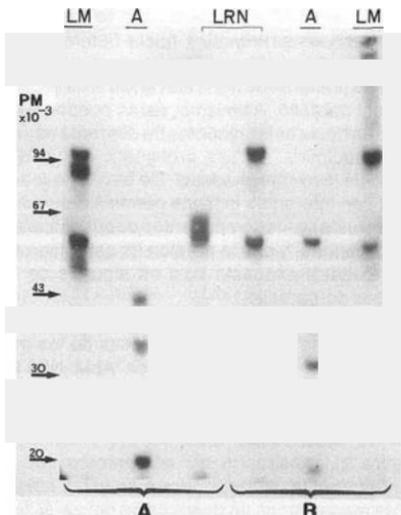


Figura 1. Análisis electroforético de antígenos de superficie de los tres estadios de *T. spiralis* marcados con ¹²⁵I. Los antígenos de LM, A y LRN se marcaron con ¹²⁵I empleando cloraminta T y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B). Los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores se indican en la figura

Cuadro I. Antígenos de superficie de *Trichinella spiralis* específicos de estadios y especificidad de los anticuerpos monoclonales

Estadio	Peso Molecular (X10 ³) Antígenos de superficie				Anticuerpos monoclonales			Reconocimiento de superficie
					Nombre	Especificidad		
Larva muscular	105,	90,	55,	47	NIM-M1 NIM-M2	105, 90, 55, 47 90, 47,		+
Adulto	40,	33,	20		NIM-M3 NIM-M4	40, 20 40, 20		+
Lava recién nacida	64,	58,	34,	30	NIM-M5 NIM-M6	64 64		+

1) Los pesos moleculares de los antígenos de superficie se determinaron en condiciones reductoras.

2) La especificidad de los anticuerpos monoclonales se determinó por coprecipitación de los antígenos de superficie marcados con ¹²⁵I

3) El reconocimiento de antígenos de superficie de cada estadio se analizó por medio de inmunofluorescencia indirecta.
Tomado de Ortega-Pierres y cols. 1984b

Estos resultados sugirieron que se pueden generar respuestas inmunes hacia determinantes expuestos, o no, en la superficie del parásito, siendo quizá las primeras de más relevancia en la eliminación del parásito. Asimismo, éstas pueden estar dirigidas hacia determinantes de diferente naturaleza bioquímica, ya sea protéica o glucosídica dentro de la misma molécula. De hecho, la reactividad con diferentes lectinas permitió determinar que algunos de los componentes de superficie son glicoproteínas, y que la porción de carbohidratos se encuentra expuesta sólo en algunos de los estadios del parásito.^{9,17}

El uso de los AcM permitió determinar asimismo algunas funciones biológicas de los mismos. Así, se determinó que los AcM NIM-M5 funcionan como enlace para la destrucción por eosinófilos de larvas recién nacidas, en una reacción de citotoxicidad mediada por anticuerpos (Figura 2), mostrando así por primera vez de manera directa, la participación de estas células en los mecanismos de destrucción del parásito, y por lo tanto, en el control de la infección que produce.¹¹ Asimismo, el uso de estos anticuerpos monoclonales NIM-M5 permitió demostrar que cuando éstos fueron transferidos pasivamente a ratones, se obtuvo un alto grado de protección cuando los animales se infectaron con LRN. Esto último se midió por la reducción en el número de LM que se establecieron en tejido muscular de los animales que recibieron pasivamente los AcM previo a la infección con LRN.¹¹ Así se demostró tanto *in vivo* como *in vitro* la importancia de la respuesta inmune humoral en el control del establecimiento de LRN en el hospedero infectado.

El uso de estos reactivos monoespecíficos permitió estudiar asimismo, la organización de componentes de la superficie del parásito. En el caso de las larvas recién nacidas se determinó, por ensayos de IFI con el AcM NIM-M5 y por inmunoprecipitación de antígenos radiomarcados de LRN, que el antígeno de 64 kDa se encuentra expuesto en la superficie del parásito solamente durante las primeras etapas de desarrollo de este estadio (Cuadro II). Posteriormente se detectan las otras moléculas de superficie y se pierde la reactividad con el AcM NIM-M5. Estos resultados indicaron que ocurren cambios dinámicos con respecto a los antígenos de superficie durante el desarrollo de la

LRN, lo cual puede tener implicaciones importantes en los mecanismos de evasión del parásito a la respuesta inmune del hospedero.⁸

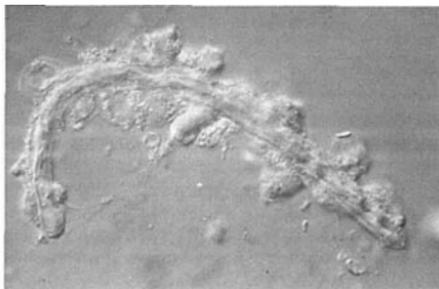


Figura 2. Microfotografía de LRN incubadas con el AcM NIM-M5 y eosinófilos. Las LRN fueron incubadas con el AcM NIM-M5 en presencia de eosinófilos. Después de incubarlas durante 2 h a 37°C, se determinó el número de LRN dañadas por acción de eosinófilos mediante el AcM NIM-M5. La microfotografía muestra la destrucción de eosinófilos y con sus gránulos se dañan a los cultivos. Tomado de Ortega-Pierres y col. 1984.¹¹

Cuadro II. Reactividad del anticuerpo monoclonal (AcM) NIM-M5 con larvas recién nacidas de *T. spiralis* determinada por IFI y precipitación de antígenos de superficie.

Tiempo de colecta de LRN*	Porcentaje de LRN positivos por IFI ^b	PMC del antígeno de superficie iodinado de LRN precipitados con el AcM
30 min.	100%	64
4 h	100%	64
6 h	100%	64
8 h	20%	64
18 h	0%	--
24 h	0%	--

- Las LRN se colectaron en los tiempos señalados, por centrifugación y lisis a partir de parásitos adultos cultivados en medio DMEM a 37°C con 10% de suero fetal bovino.
- El % de LRN con reactividad fluorescente, se reporta como el número de LRN que reaccionaron con el AcM NIM-M5 por IFI de un número definido de LRN empleado en el ensayo.
- Peso molecular en kDa del antígeno de superficie marcado con ¹²⁵I e inmunoprecipitado por el AcM NIM-M5. Datos tomados de Ortega-Pierres y col. 1984.¹¹

Con relación en la reactividad de AcM hacia componentes de superficie del A, se determinó que el AcM NIM-M3 reconoce específicamente el órgano copulatorio del macho adulto (Figura 3), sugiriendo la especialización regional en componentes de la superficie de este parásito.⁸

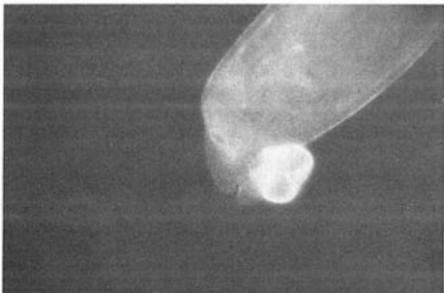


Figura 3. Reactividad por IFI del AcM NIM-M3 con parásitos adultos de *T. spiralis*. La reactividad del AcM NIM-M3 con parásitos adultos se determinó, por IFI, las preparaciones se observaron en un microscopio óptico marca Zeiss equipado con el sistema de epifluorescencia. Tomado de Ortega-Pierres y Parkhouse, 1985.⁸

Cuando se emplearon los AcM en ensayos de IFI para determinar su reactividad *in situ* empleando secciones fijadas de los tres estadios del parásito, se comprobó que éstos reconocen antígenos en la superficie de los tres estadios, así como en el órgano copulatorio del macho adulto.¹⁰ Se determi-

no que los AcM NIM-M1 y NIM-M2 dirigidos contra la LM, reconocieron también una estructura interna del parásito denominada esticosoma, el cual es un órgano en donde se producen los antígenos de E/S del parásito. De estos dos AcM sólo el AcM, N1M-M1 reconoció antígenos expuestos en la superficie (Figura 4 A y B). Así se demostró que estos compartimentos de la LM comparten determinantes antigénicos y que los componentes de superficie quizá se generen en el esticosoma; los mecanismos por lo cuales estos se transportan a la superficie aún se desconocen. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que los antígenos de superficie se produzcan a otro nivel y sólo compartan determinantes antigénicos con los productos de E/S. Considerando estos hallazgos, los antígenos reconocidos por el AcM NIM-M1 se denominaron antígenos de superficie/esticosoma (S/E).

Otro aspecto importante del uso de los AcM dirigidos en contra de los antígenos de S/E de la LM, fue purificarlos empleando columnas de afinidad con Sefarosa 4B y el AcM NIM-M1. Así se obtuvieron cuatro antígenos con pesos moleculares de 72, 65, 52 y 47 kDa (Figura 5). Considerando varios reportes relacionados con el hecho de que los estadios de LM y pre-adulto de *T. spiralis* inducen respuestas inmunes protectoras más eficaces que los otros estadios del parásito,¹⁹ se decidió evaluar el potencial de los antígenos de S/E para generar protección en contra de la infección con *T. spiralis* en un modelo experimental murino.

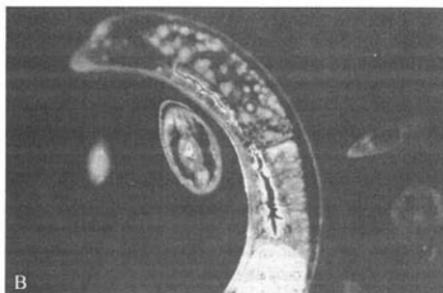
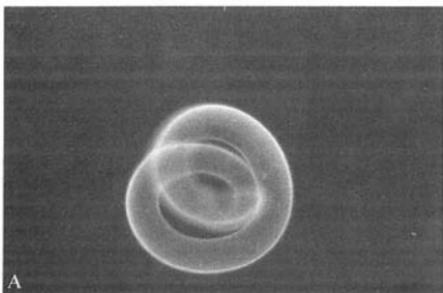


Figura 4. Reactividad por IFI del AcM NIM-M1 con LM vivas y con secciones fijadas de éstas. La reactividad del AcM NIM-M1 se analizó con LM vivas y con secciones fijadas de éstas empleando IFI. Las preparaciones de la LM así procesadas, se observaron en un microscopio óptico marca Zeiss equipado con el sistema de epifluorescencia. Las microfotografías muestran LM vivas (A) y secciones de éstas (B.) teñidas con el AcM-NIM-M1. Tomado de Sclaren y col. 1987. (10).

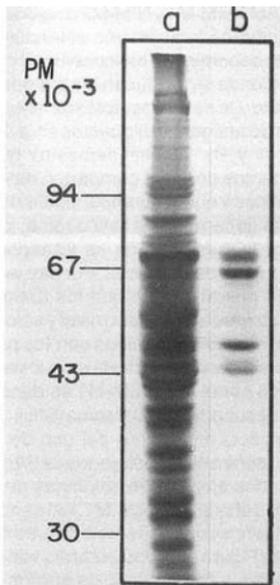


Figura 5. Análisis electroforético de los antígenos de superficie/estricosoma de la LM purificados con el AcM NIM-M1. El extracto total de la LM se pasó por una columna de Sefarosa 4B a la que se acopló el AcM NIM-M1 para purificar los antígenos de S/E. Los componentes de S/E así purificados, se analizaron por SDS-PAGE. a) Componentes del extracto total, b) antígenos de S/E purificados. Tomado de Ortega-Pierres y col., 1989. *

Los estudios realizados mostraron que la inmunización de ratones con los antígenos purificados de S/E de la LM, activó una respuesta inmune en estos animales, capaz de conferir protección ante un reto de los animales con el parásito.⁹ Esto último se midió tanto por la reducción de LM que se establecieron en tejido muscular, como por una expulsión temprana de parásitos adultos en los animales inmunes comparado con animales control (Figuras 6 y 7). Estos hallazgos son de gran importancia, ya que los componentes de S/E aislados, pueden tener un uso potencial en métodos inmunoprolácticos y de control de esta enfermedad.

Otro aspecto de gran relevancia en el estudio de la triquinosis, ha sido el desarrollo de métodos de diagnóstico que permitan, de manera eficaz, detectar al hospedero infectado. En nuestro país,

resulta particularmente importante la implementación de métodos sensibles y específicos para la triquinosis porcina, debido a que los cerdos se consideran la fuente principal de infección para seres humanos en los brotes de la enfermedad, reportados en los últimos años en diversos estados de la República Mexicana.

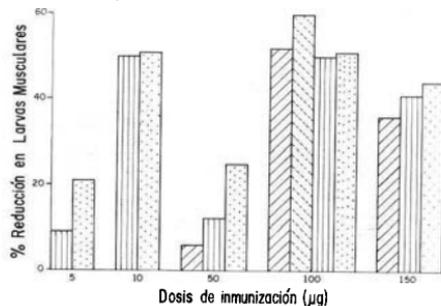


Figura 6. Determinación del porcentaje de reducción en el número de LM obtenidas de ratones inmunizados con los antígenos purificados de S/E de la LM. Ratones BALB/c fueron inmunizados con diferentes dosis (5, 10, 50, 100 y 150 ug) de antígenos purificados de S/E de la LM. A los 30 días pos-infección se sacrificaron los animales y se determinó el porcentaje de reducción en el número de LM recuperadas de estos anima es. Las barras representan e número de experimentos rea zaos para cada dosis. Tomado de Ortega-Pierres y co., 1989. *

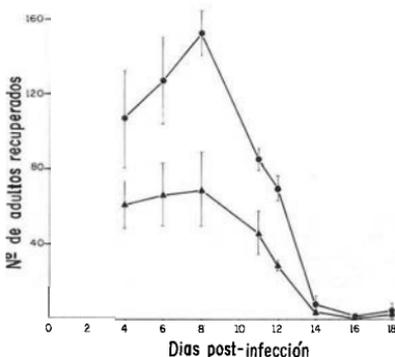


Figura 7. Determinación del número de adultos recuperados de ratones inmunizados con los antígenos purificados de S/E de la LM. Ratones BALB/c fueron inmunizados con 100 ug de antígenos de S/E purificados de LM. Como controles se utilizaron ratones de la misma cepa inyectados con PBS. Todos los animales se infectaron con LM a los días 4 6 8 10 12 14 16 y 18 pos-infección. Los animales se sacrificaron y los adultos se recuperaron del intestino de éstos. Adultos recuperados de animales control (●—●) y de ratones inmunes (▲—▲). Tomado de Ortega-Pierres y col., 1989. *

Considerando esto último, llevamos a cabo en principio, un estudio longitudinal en cerdos infectados experimentalmente con LM del parásito, para determinar qué antígenos de este estadio eran reconocidos más frecuentemente por los animales infectados. En este estudio se determinó que los componentes de la LM reconocidos durante la infección experimental, tuvieron pesos moleculares similares a los antígenos de S/E purificados por el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (Figura 8). Estos componentes no fueron reconocidos por muestras de suero control. Con base en estos datos, se decidió evaluar la eficacia de los componentes purificados de S/E de la LM para el diagnóstico de la triquinosis en cerdos de traspatio de varias localidades de la República Mexicana. Esto se llevó a cabo empleando ELISA y en estos ensayos se comparó el uso de los antígenos de S/E con el empleo de extractos totales y antígenos de E/S del mismo estadio del parásito (Figura 9).

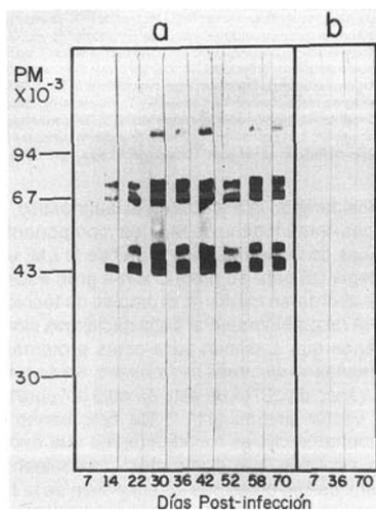


Figura 8. Antígenos de LM de *T. spiralis* reconocidos por sueros de cerdos infectados experimentalmente con el parásito. Los componentes del extracto total de LM se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Las tiras de PNC se incubaron con sueros de cerdos infectados experimentalmente con LM y colectados a diferentes intervalos después de la infección (a) y con sueros de cerdos no infectados (b). Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Arriaga y col. 1989.¹⁴

Los resultados de este estudio mostraron que con el uso del extracto total se determinaron un gran número de muestras de suero aparentemente positivas (Figura 9a). Sin embargo, al emplear los antígenos purificados de S/E (Figura 9b) o de E/S (Figura 9c), el número de muestras positivas disminuyó considerablemente, sugiriendo que el extracto total da reacciones inespecíficas. Los sueros control incluidos en estos ensayos dieron valores altos de absorbancia con el extracto total y valores negativos con los antígenos de S/E y E/S (12). Estos resultados sugieren que los antígenos de S/E y de E/S, permiten la detección específica de la infección en cerdos de traspatio con mayor sensibilidad que los extractos crudos de la LM. Así mismo, se empleó el ensayo de inmunoelectrotransferencia para identificar a los antígenos de la LM que son reconocidos por los sueros de cerdos de traspatio, que presentaron valores positivos en ELISA con antígenos de S/E y E/S. Los resultados mostraron que estos sueros presentaron un reconocimiento de antígenos de S/E con pesos moleculares de 72, 65, 52 y 47 kDa similar al observado en los cerdos infectados experimentalmente (Figura 10). Las muestras de sueros control no presentaron reactividad con los antígenos de la LM. Estos datos mostraron que los antígenos de S/E de la LM de este parásito son reactivos específicos que permiten la detección, con alta sensibilidad, de cerdos infectados naturalmente con *T. spiralis*.¹²

Con la finalidad de evaluar el ELISA empleando antígenos de S/E y el método de inmunoelectrotransferencia desarrollado para triquinosis porcina, llevamos a cabo varios estudios en donde se realizaron en forma paralela y en el mismo animal, los ensayos mencionados, empleado muestras de suero, así como los métodos de digestión artificial de tejido muscular y la detección de larvas por triquinoscopia. Los resultados de estos ensayos mostraron una correlación directa entre la detección de larvas en tejido muscular por los métodos empleados, la positividad en ELISA y el patrón de antígenos de SE reconocidos por las muestras de sueros de animales infectados, naturalmente determinado por inmunoelectrotransferencia. (Figura 11). Así, se propone que los métodos serológicos desarrollados, ofrecen mejores posibilidades para llevar a cabo estudios epidemiológicos confiables sobre triquinosis porcina.¹³

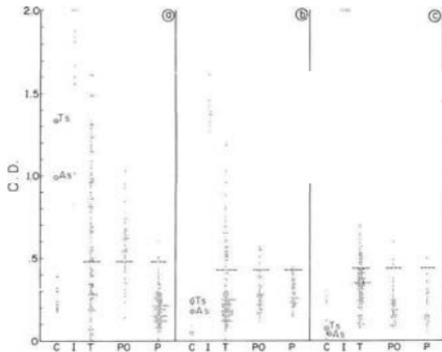


Figura 9. Valores de densidad óptica. (O.D.) de muestras de suero de cerdo de traspaso obtenidos en ensayos de ELISA al zanco extracto total de LM (a) antígenos purificados de S/E (b) o antígenos de E/S (c). Como controles se utilizaron muestras de suero de cerdos no infectados y de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* (I), *Ascaris suum* (A.s.) o *Trichuris suis* (T.s.). Los sueros provenían de Toluca, Edo de México (T), Paso de Ovejas, Ver. (PO) y de Paracho, Mich. (P). Tomado de Arriaga y col. 1989.¹⁰

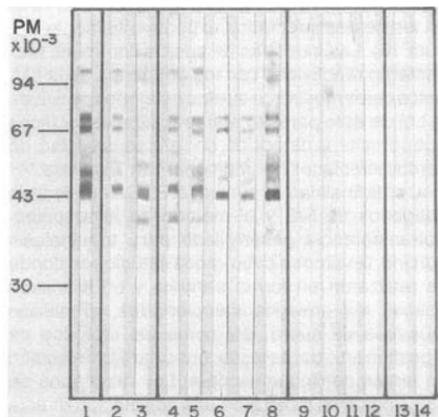


Figura 10. Antígenos de LM de *T. spiralis* reconocidos en inmunoelectro-transferencia por muestras de suero de cerdos de traspaso. Los componentes del extracto total de LM se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Las tiras de PNC se incubaron con diferentes muestras de suero. Carril 1: Muestra de suero de cerdo infectado experimentalmente. Carriles 2 al 8: muestras de suero de cerdos de traspaso positivos en ELISA con los antígenos purificados de S/E. Carriles 9 a 12: muestras de suero de cerdos no infectados. Carril 13: muestra de suero infectado con *T. suis*. Carril 14: muestra de suero de cerdo infectado con *A. suum*. Los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Arriaga y Col., 1989.¹²

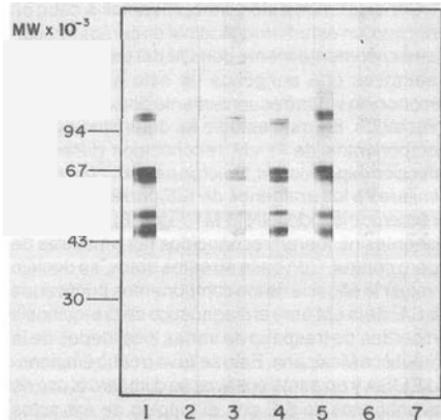


Figura 11. Antígenos de LM de *T. spiralis* reconocidos por muestras de suero de cerdos sacrificados en rastros del Edo. de México. Los componentes de extracto total de LM se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Las tiras de PNC se incubaron con muestras de suero de cerdo de rastros de Estado de México. Carril 1: muestra de suero de cerdo no infectado experimentalmente con *T. spiralis*. Carril 2: suero de cerdo no infectado. Carriles 3 al 5: muestras de suero de cerdos en los que se encontraron por digestión artificial 5, 741 y 483 LM en el diafragma, respectivamente. Carriles 6 y 7: muestras de suero de cerdos negativos en digestión artificial y negativos en ELISA con antígenos purificados de S/E. Los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Arriaga y col. 1989.¹³

Considerando la eficacia en el diagnóstico, de epítopes inmunogénicos en los componentes protéicos de los antígenos de S/E de la LM, una estrategia útil para su producción a gran escala, puede abordarse mediante el empleo de técnicas de DNA recombinante. Para ello decidimos clonar los genes que codifican para estas proteínas y expresarlas en sistemas bacterianos. Se construyó un banco de cDNA de este estadio del parásito en el vector lambda gtl1.¹⁴ De este banco se seleccionaron clones recombinantes que expresan péptidos que comparten determinantes antígenicos con proteínas de superficie de la LM, empleando anticuerpos de ratón en contra de antígenos de S/E de este estadio. Las clones recombinantes aisladas se caracterizaron con relación al tamaño del inserto de DNA clonado, de acuerdo a la proteína de fusión que expresaron y por hibridación del DNA clonado con RNA del parásito, para determinar el tamaño del o de los transcritos. Se aislaron tres clones recombinantes

denominadas Ts-1, Ts-2 y Ts-3, las cuales expresaron proteínas de fusión de 118 y 121 kDa. Los fragmentos de DNA clonados tuvieron un tamaño de 1500 y 500 pb y la hibridación de éstos con RNA total del parásito, mostró tres bandas de RNA cuyo tamaño fue de 950, 1350 y 2130 nucleótidos.¹⁴

Con el objeto de expresar y de purificar de manera más eficaz uno de los péptidos recombinantes, el inserto de 1500 pb de la clona Ts-3 se subclonó en el vector pGEX-3X, obteniéndose el péptido del parásito fusionado a la enzima glutatión transferasa. Una vez purificado el péptido de fusión de la clona Ts-3 (Figura 12) se procedió a emplearlo en ELISA para evaluar su potencial en el diagnóstico de la triquinosis en cerdos. Los resultados de estos ensayos mostraron valores positivos en ELISA para muestras de cerdos infectados tanto de manera experimental, como aquellos que se infectan naturalmente (Figura 13). Las muestras de sueros control no presentaron reactividad positiva, demostrando la especificidad del método. Por lo que se propone que el péptido recombinante de la LM de *T. spiralis* puede ser útil en estudios epidemiológicos para triquinosis porcina.¹⁵

Conclusiones

En función de los avances obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, y considerando los resultados obtenidos por otros grupos de investigación referentes a la caracterización de antígenos de superficie esticosoma y de excreción/secreción,^{20,21} se tiene actualmente un consenso respecto a la alta inmunogenicidad de los componentes mencionados, así como de su utilidad en el diagnóstico de triquinosis. Así mismo, se ha demostrado su participación en el desarrollo de los mecanismos que inducen protección en el huésped. Esto último ofrece perspectivas del uso de estos componentes del parásito en la implementación de métodos inmunoprolifácticos.

Con relación a la utilidad de los antígenos de superficie/esticosoma en la detección de la infección, y considerando que actualmente se han desarrollado métodos de diagnóstico sencillos y de fácil aplicación, se puede proponer el uso de estos ensayos a gran escala, para evaluar la incidencia real de la enfermedad en el ganado

porcino en nuestro país. Esto último permitirá contar con elementos indispensables para establecer programas de control efectivos, que permitan prevenir y eventualmente erradicar fuentes de infección para este padecimiento de parasitosis en México.

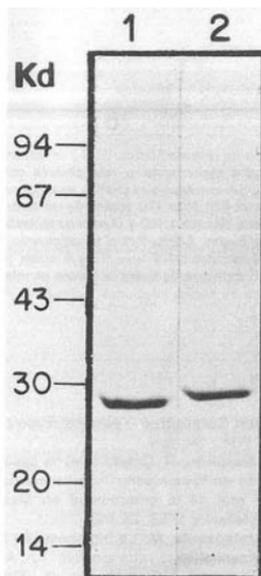


Figura 12. Análisis electroforético de la proteína de fusión de Ts-3 cuyo cDNA se clonó en el vector pGEX-3x. El cDNA de la clona Ts-3 se subclonó en el vector pGEX-3x y la proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad empleando una columna de Glutatión-Sefarosa 4B y posteriormente se analizó por SDS-PAGE. Carril 1 glutatión S-Transferasa purificada de la clona parental; Carril 3 péptido recombinante de *T. spiralis* purificado. Los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Yépez-Mulia y col. 1994.¹⁶

Agradecimientos

La realización de este trabajo fue apoyada en parte por la Fundación Wellcome de Gran Bretaña, la Fundación MacArthur de Estados Unidos de Norteamérica y el Consejo de Ciencia y Tecnología de México. Agradecemos a Lidia Yépez y Camelia Arraga por compartir conmigo tantas experiencias durante el desarrollo de este trabajo, a Nancy Arizmendi por su participación en la obtención del péptido recombinante, a Ana Flisser por los comentarios tan útiles que realizó durante la elaboración del manuscrito y a Guadalupe Ruiz por el excelente trabajo secretarial.

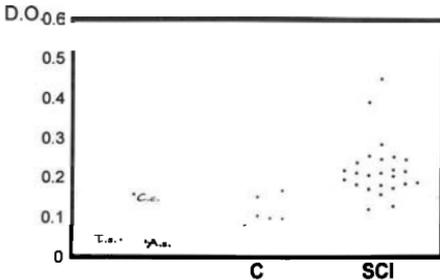


Figura 13. Valores de densidad óptica (O.D.) de muestras de suero de cerdo infectados experimental o naturalmente con *T. spiralis* analizados en ELISA empleando el péptido recombinante de la LM clonado en el vector pGEX-3x. Los sueros de los cerdos infectados se emplearon a una dilución 1:100 y el péptido recombinante a una concentración de 5µg/ml. Como control se emplearon muestras de suero de cerdos infectados con *T. suis* (T.s.), *A. suum*, y *Cysticercus cellulosae* C.c.; C muestras de suero de cerdos no infectados; SCI. Muestras de suero de cerdos infectados. Tomado de Arizmendi, N. 1994.²²

Referencias

1. WHO Expert Committee. Technical Report Series No 597, 1976.WHO Geneva.
2. Martínez-Marañón, R. Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. Ciudad Pública de México. 1983; 25:712.
3. Ramírez-Valenzuela, M. La triquinosis en México. Un estudio epidemiológico retrospectivo. En: Avances en enfermedades del cerdo. Morilla, A., Correa, P. y Stephano, A. ed. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. México, D.F., 1985; 557-573.
4. Ramírez Valenzuela, M. Epidemiología de la triquinosis. En: *Ciencia Veterinaria*. Moreno Chan, R. ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 1981; 3:278-334.
5. Hernández M, Ramos-Martínez E., Casco-Sánchez EG, Morales-Gómez JM y Pérez-Matos EM. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chih. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. Gaceta Médica de México. 1992; 128:45-50.
6. Martínez-Marañón R. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? Salud Pública de México, 1985; 27:40.
7. Ortega-Pierres G, Almond NW, and RME. Applications of biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis* in host immunity. Protection and diagnosis. *Wiad. Parazytol*, 1987; 33: 423-478.
8. Ortega-Pierres MG, Chayen A, Clark NWT, and Parkhouse RME. The occurrence of antibodies to hidden

and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis* Parasitol. 1984; 88:359-369.

9. Ortega-Pierres MG, Muñiz E, Coral-Vázquez R, and Parkhouse RME. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitol. Res. 1989;75:563.
10. McLaren DJ, Ortega-Pierres MG, Parkhouse, RME, *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. Parasitol. 1987;94:104-114.
11. Ortega-Pierres MG, Mackenzie CD, and Parkhouse RME. Protection against *Trichinella spiralis* induced by a monoclonal antibody that promotes killing of new born larvae by granulocytes. Parasite. Immunol. 1984;6:275-284.
12. Arriaga C, Muñiz E, Morilla A, Ortega-Pierres MG, *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp. Parasitol. 1989;69:363.
13. Arriaga C, Salinas-Tobón R, Morilla A, Ortega-Pierres MG. Use of purified surface/stichosomal antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae in the detection of naturally infected swine. Res. Rev. Parasitol, 1991;51: 103-105.
14. Yépez-Mulia L, Montañez C, Ortega-Pierres MG. Surface antigens from *Trichinella spiralis* muscle larvae expressed by *Escherichia coli*. En: Tanner, C., Martínez-Fernández, A. and Bolas-Fernández, F. (ed). Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. 1989:47-50.
15. Yépez-Mulia L, Arizmendi N, Ortega-Pierres MG. Production of *Trichinella spiralis* recombinant peptide useful in diagnosis of swine trichinellosis. En: Tanner C Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis, 1994 (en prensa).
16. Grecis RK, Crawford C, Pritchard DI, Behnke JM and Wakelin, D. Immunization of mice with surface antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis*. Parasite. Immunol. 1986; 8:587-596.
17. Clark NWT, Philipp M & Parkhouse RME. Noncovalent interactions result in aggregation of surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem. J.* 1982; 207:27-32
18. Ortega-Pierres MG, Clark NWT, Parkhouse RME, Regional specialization of the surface of a parasitic nematode. Parasite Immunol. 1986;8:613-618
19. Campbell WC. Immunizing effect of enteral and parenteral infections of *Trichinella spiralis* in mice. J. Parasitol. 1965;51:185-194.
20. Gamble HR and Graham CE. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. Am. J. Vet. Res. 1984;13:349.
21. Siberstein DS, Despommier D. Immunization with purified antigens protects mice from lethal infection with *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 1985; 71(4):516.
22. Arizmendi N. Tesis. Empleo de péptidos recombinantes de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en el diagnóstico de triquinosis porcina. UNAM. Campus Iztacala. 1994.

Comentario

Ana Flisser

El trabajo de ingreso de la doctora Guadalupe Ortega, muestra ante todo la amplia gama de experiencias científicas que ha adquirido la autora durante los años que le llevó realizar el trabajo. Incluye aspectos de inmunología, tales como estandarización de técnicas para diagnóstico, preparación de anticuerpos monoclonales, demostración del efecto de anticuerpos y células sobre el parásito de su interés, así como aspectos bioquímicos tales como marcaje de proteínas de superficie, purificación de dichas proteínas y su caracterización y también incluye aspectos de biología molecular, como obtener una genoteca, seleccionar clonas positivas, subclonarlas en un vector adecuado y demostrar que la proteína recombinante es reconocida por anticuerpos dirigidos en contra del parásito.

La doctora Ortega ingresa a la Academia Nacional de Medicina para integrarse y reforzar el grupo de Parasitología, área que cada vez tiene mayor reconocimiento por su importancia para México, e ingresa con un trabajo sobre un parásito poco estudiado en nuestro medio, *Trichinella spiralis*. La triquinosis es una enfermedad, que si bien no es endémica y no constituye un problema de salud pública en nuestro país, sí ocasiona brotes en diversas entidades, y es frecuentemente diagnosticada en algunos estados como Zacatecas. Me llama la atención que el enfoque del trabajo de la doctora Ortega, es hacia el control de la triquinosis porcina, lo cual apoya la importancia de las zoonosis, que son infecciones del hombre adquiridas de animales vertebrados. En su trabajo, la doctora Ortega abarca tanto al cerdo, que es el huésped que nos transmite al parásito cuando ingerimos su carne, como al ratón, modelo experimental de gran utilidad para adquirir los conocimientos básicos de esta relación huésped-parásito.

La doctora Ortega corrió con mucha suerte al encontrar que únicamente se marcaban pocos antígenos de superficie, lo que muy probablemente facilitó la producción y la selección de anticuerpos monoclonales. Estos reactivos, a su vez, permitieron demostrar su participación como eslabones para que los eosinófilos del ratón pudieran destruir

a las larvas de la triquinela y mostraran tener capacidad para inducir protección pasiva.

El empleo de técnicas que permiten visualizar con detalle a los componentes del parásito, como el marcaje yodado y la inmunofluorescencia, favorecieron la identificación de los antígenos de superficie y del sitio de su producción, el esticosoma, así como de los antígenos que el parásito secreta.

Estos son los componentes de los agentes patógenos que más interesa estudiar, pues constituyen el arma principal de ataque y por lo tanto, su conocimiento permite entender los mecanismos que ejerce el huésped para su defensa; en este caso, participan tanto mecanismos de la respuesta inmune humoral como los de la celular.

La obtención de antígenos puros y la demostración de su capacidad para inducir protección en contra de la infección con parásitos vivos, es el inicio de la producción de una vacuna, lo que probablemente, la doctora Ortega retomará empleando técnicas de DNA recombinante. Por ahora, este tipo de tecnología la ha utilizado con gran éxito para la producción de proteínas recombinantes para uso diagnóstico. Este es uno de los ideales de cualquier parasitólogo dedicado al inmunodiagnóstico, pues es, en teoría, un medio de producción ilimitada de antígenos, los que frecuentemente constituyen el aspecto más complicado del inmuno-diagnóstico. Para esto, inicialmente demostró que es posible detectar anticuerpos en cerdos y en ratones infectados, empleando a los antígenos de superficie y esticosoma y también a los de secreción.

La doctora Ortega abordó con éxito la producción de un banco de cDNA y la identificación de clonas positivas empleando anticuerpos contra los antígenos de superficie y esticosoma, para finalmente obtener proteínas recombinantes a partir de un vector adecuado. La demostración del éxito reside en que estas clonas reaccionaron en ELISA con los sueros de los cerdos. Ahora seguramente ensayará este sistema en los rastros para identificar cerdos infectados, y con esto, evitar la ingestión de carne con triquinelas, y por lo tanto, el surgimiento de brotes de triquinelosis humana.

Bienvenida Guadalupe.