

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO PARA CISTICERCOSIS BOVINA A PARTIR DE PROTEÍNA RECOMBINANTE RTSAG18

S. A. Cueto González¹, F. J. Monge Navarro¹, G. López Valencia¹ y L. E. Silva Paz¹. 2016. XXVI Producción de carne y leche en climas cálidos: Reunión Internacional.

1.-Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades parasitarias en general y de bovinos](#)

RESUMEN

En México, la inspección post mortem (IPM) es el procedimiento sanitario oficial para detectar cisticercosis bovina en rastros. La IPM ofrece <50% de sensibilidad por lo que una cantidad importante de canales infectadas con cisticercos pueden pasar desapercibidas. En este proyecto, se desarrolló un sistema de expresión en baculovirus para producción de proteína recombinante Tsag18 de *Taenia saginata*. Tsag18 es sumamente antigénica y estimula la producción de anticuerpos desde etapas iniciales de infección. La proteína recombinante denominada rTsag18 fue comparada con extractos crudos de *Taenia saginata*, *Cisticercus bovis*, *Echinococcus granulosus*, *Cisticercus ovis* y *Cisticercus tenuicollis* por SD-PAGE y western blot. Se identificaron siete proteínas con un patrón electroforético similar entre rTsag18 y los extractos crudos incluyendo bandas de tamaño esperado entre 18 KDa y 22 KDa. Se logró desarrollar exitosamente un sistema de expresión de proteína recombinante con aplicaciones diagnósticas para cisticercosis bovina y otras cestodosis en animales domésticos.

INTRODUCCIÓN

En Latinoamérica, el problema de la parasitosis ocasionada por *T. saginata* está subestimada debido a la escasa utilización de métodos de diagnóstico avanzados descuidándose incluso, el diagnóstico diferencial con otras parasitosis ocasionadas por cestodos. Existen distintas infecciones parasitarias causadas por cestodos que debido a su carácter zoonótico, implican un problema de salud pública y ocasionan pérdidas económicas; entre ellos sobresalen *T. saginata*, *T. solium*, *T. ovis*, y *E. granulosus*. Entre los factores que predisponen la existencia de esta parasitosis se incluyen el tipo de sistema de explotación animal, la falta de medidas higiénicosanitarias y el desconocimiento de la epidemiología de esas enfermedades. En la industria de la carne, las pérdidas económicas por estas parasitosis se encuentran estrechamente asociadas con la amplitud de la infección. La IPM es el procedimiento oficial utilizado en plantas sacrificadoras para la detección de la cisticercosis bovina y otras parasitosis. El procedimiento consiste en la inspección visual de las canales, haciendo cortes finos en músculos y vísceras predeterminados. Un limitante de esta técnica de diagnóstico es su baja sensibilidad, calculada en menos de 50% ya que solo detecta casos de animales altamente infestados con cisticercos muertos, degenerados o calcificados (Boa et al., 2002; Wanzala et al., 2003). Existen alternativas a la inspección visual post-mortem para el diagnóstico de cisticercosis como el ultrasonido y pruebas serológicas basadas en la detección de antígenos y anticuerpos de *Cisticercus bovis*. Las pruebas serológicas que detectan antígenos de cisticercos son poco utilizadas debido a que los antígenos de secreción y excreción del parásito tienen una vida muy corta dentro del huésped (Ferrer, 2007; Fleury et al., 2007). El diagnóstico de los ténidos sigue presentando importantes limitaciones que deben resolverse desarrollando sistemas de detección más sensibles y específicos. En este trabajo se desarrolló una plataforma de expresión de proteína recombinante Tsag18 (rTsag18), la principal proteína de adhesión que las oncosferas de *T. saginata* utilizan durante las primeras etapas de infección. rTsag18 fue expresada eficientemente en cultivos celulares de Sf9, extraída y caracterizada parcialmente por SDS-PAGE mostrando alta reactividad con extractos crudos de *Cisticercus bovis* y otros ténidos; resultando en una plataforma de diagnóstico serológico con un gran potencial para el diagnóstico antemortem de estas parasitosis en ganado bovino de engorda destinado al abasto con lo cual se evitaría la retención y destrucción de las canales en las plantas de sacrificio evitando pérdidas económicas para el sector ganadero (Wanzala et al., 2003).

MATERIAL Y MÉTODOS

Baculovirus recombinante. Para el desarrollo de la proteína recombinante se utilizó el gen del aislado 8 del antígeno de 18 KDa de *T. saginata* (GenBank HQ318711.1), el cual fue subclonado en el vector de baculovirus pFastBac1 (Life Technologies) con adición de ocho histidinas en la terminal C de la proteína para facilitar su

purificación. Para producir la primera generación de baculovirus recombinante (P1) se utilizó una línea de cultivo celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Lo anterior, fue desarrollado por la compañía Blue Sky Bioservices (Worcester, MA).

Producción de proteína recombinante Tsag18. Se infectaron cultivos de células Sf9 con baculovirus P1 e incubados por 68-70 horas a 27°C. Las células fueron cosechadas, lavadas con búfer de fosfatos y almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para la extracción de la proteína recombinante se procesó 1 gramo de Sf9 infectadas en búfer de lisis que contiene 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 25 mM Bicina, 1 M Ditioneitol diluido 1:1000 y 1% de coctel inhibidor de proteasas. Las células fueron maceradas durante 5 minutos sobre hielo empleando un homogenizador de células e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, los lisados celulares se mezclaron en vórtex por 1 minuto y centrifugados a 10,000 x g por 30 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante que contiene rTsag18.

Controles de referencia. Como control de referencia positivo para la proteína nativa de 18 KDa de *T. saginata* se procesó 1 gramo de *C. bovis* en estado vesicular siguiendo el mismo protocolo que para Sf9 infectadas. Los cisticercos fueron obtenidos de una canal confiscada en un Rastro TIF local, la cual resultó altamente infestada con el parásito. Como control de referencia negativo para rTsag18 o la proteína de 18 KDa de *T. saginata* se procesó 1 gramo de cultivo puro de Sf9 sin infectar, siguiendo el mismo protocolo que para Sf9 infectadas. Los lotes de lisados de rTsag18, *C. bovis* y Sf9, fueron almacenados a -80°C hasta el momento de los experimentos SDS-PAGE para caracterización parcial de proteínas.

Caracterización parcial e inmunoreactividad de rTsag18. La caracterización parcial de los extractos de rTsag18, *C. bovis* y Sf9 se realizó empleando SDS-PAGE; las bandas de proteína fueron reveladas con tinción de azul de Coomassie. Para determinar el peso molecular aproximado se utilizó el Novex Sharp Protein Estándar Ladder (Life Technologies). La inmunoreactividad de la proteína rTsag18 fue evaluada por western blot empleando un suero de bovino experimentalmente infectado con oncósferas de *T. saginata* desarrollado como control de referencia, amablemente proporcionado por la Dra. Edda Sciuto Conde, del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

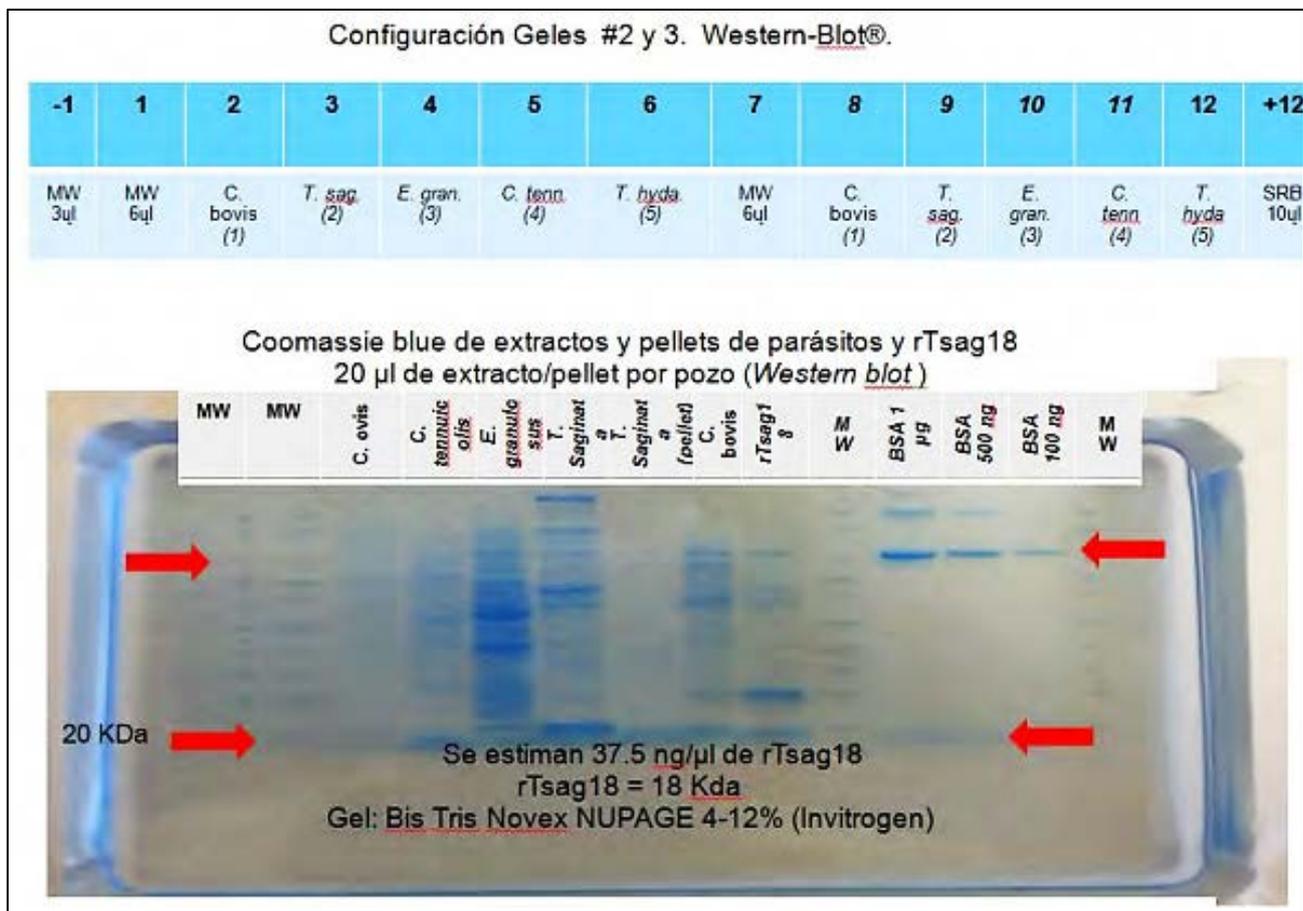
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desarrolló un sistema de expresión en baculovirus para la producción de la proteína recombinante de adhesión de 18 KDa de *T. saginata* denominada rTsag18 en cultivos de células Sf9. La proteína recombinante se expresó y almacenó en el citoplasma de Sf9 y se cosechó a las 68-70 horas post infección. La extracción de rTsag18 a partir de Sf9 infectadas se realizó por extracción química empleando un búfer de lisis que contiene una mezcla de detergentes iónicos y no iónicos así como inhibidores de proteasas. Se desarrolló un primer lote de ~90 gramos de Sf9 infectadas (50 botellas de cultivo de 150 cm²). De ese lote se procesaron 3 g de Sf9 infectadas para producir 30 ml de lisado que contiene rTsag18.

El lisado conteniendo rTsag18, *C. bovis* y Sf9 fueron separados por SDS-PAGE y teñidos con tinción de azul de Coomassie. El revelado reveló múltiples bandas de proteína de aproximadamente 15 KDa, 21 KDa, 32 KDa, 34 KDa, 38 KDa, 46 KDa y 52 KDa entre el lisado de rTsag18 y el extracto de *C. bovis*, pero no en el extracto de Sf9 sin infectar. La inmunoreactividad de rTsag18 fue evaluada por western blot empleando un suero positivo de referencia de bovino, revelando al menos siete fracciones de proteína recombinante con un patrón de masa molecular similar a los desarrollados por el extracto de *C. bovis* empleando la tinción de azul de Coomassie.

El diagnóstico serológico de cisticercosis bovina depende en gran medida de la disponibilidad de antígenos específicos. La proteína de adhesión de 18 KDa de *T. saginata* produce potentes respuestas de anticuerpos y ha demostrado ser un buen candidato como antígeno para aplicaciones diagnósticas (Ferrer et al., 2007; Parkhouse et al., 2008). En este estudio se evaluó y demostró la utilidad diagnóstica de la proteína de adhesión de 18 KDa de *T. saginata* producida en forma recombinante en un sistema de baculovirus al compararla con extractos de *C. bovis* en estado vesicular.

La inmunoreactividad de rTsag18 fue probada y confirmada por western blot mostrando un patrón de bandas en al menos siete fracciones proteicas diferentes con peso molecular entre los 15 KDa y 52 KDa presentes en los extractos de rTsag18 y *C. bovis*. Los resultados indican que la rTsag18 aquí desarrollada significa una fuente potencial de antígeno para ser usado como base para desarrollar plataformas de diagnóstico serológico para cisticercosis bovina, particularmente el desarrollo de un sistema ELISA para detectar ganado infectado con *C. bovis*. Esto permitiría el escrutinio de *C. bovis* desde las primeras etapas del proceso de engorda, dando la oportunidad al productor de aplicar los tratamientos y medidas sanitarias para evitar la retención o decomiso de las canales y las pérdidas económicas derivadas de este problema.



LITERATURA CITADA

- Boa, M.E., Kassuku, A.A. Willingham, A.L. III, Keyyu, J.D. Phiri, Nansen, J.K. P. 2002 Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. *Veterinary Parasitology*. 106: 155-164.
- Ferrer, E., Bonay, P., Foster-Cuevas, M., Gonzalez, L.M., et al., 2007a. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8kDa diagnostic antigen family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152: 90-100.
- Ferrer, E., Gonzalez, L.M., Martinez-Escribano, J.A., Gonzalez-Barderas, M.E., et al., 2007b. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol. Res.* 101: 517-525
- Fleury, A., Hernandez, M., Avila, M., Cardenas, G., et al., 2007. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78: 970-974
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry G.F, Olins,P.O. 1993 Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*. 67(8): 4566-4579
- Parkhouse, R.M., Bonay, P., Gonzalez, L.M., Ferrer, E., et al., 2008. TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitol. Res.* 102: 921-926.
- Wanzala W, Onyango-Abuje JA, Kang EK, Zessin KH, Kyule NM, Baumann MPO, et al. 2003; Control of *Taenia saginata* by post mortem examination of carcasses. *Afr Health Sci.* 3:68- 76.
- Wanzala W, Kyule NM, Zessin KR, Onyango-Abuje AJ, Kang'ethe KE, Ochanda H, et al. 2007; Evaluation of an antigen-ELISA in the diagnosis of bovine cysticercosis in Kenyan cattle. *Parasitol Res.* 100:539-548.

Volver a: [Enfermedades parasitarias en general y de bovinos](#)