

Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN, UNSAM) -
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos
de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” (ANLIS)

“Evaluación de proteínas antigénicas de *Trichinella spiralis* para su aplicación en inmunodiagnóstico”

Tesis presentada para optar al título de
Magister en Microbiología Molecular

Autor: Patricia Andrea Arbusti

Director: Dr. Silvio Jesús Krivokapich
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud - Instituto
Nacional de Enfermedades Infecciosas-Departamento de Parasitología

Resumen

La trichinellosis es una enfermedad zoonótica producida por el consumo de carnes y /o subproductos derivados de animales infectados con larvas de *Trichinella* spp. En Argentina, esta parasitosis es endémica y durante el periodo comprendido desde 2014 a 2023 se notificaron 9.583 casos. Dado que la trichinellosis humana se manifiesta con signos y síntomas comunes con otras patologías, el diagnóstico clínico se apoya en métodos auxiliares de laboratorio como las técnicas serológicas. En la actualidad, en el Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” se utiliza el sistema de diagnóstico serológico ELISA/Western blot, que emplea un antígeno total de Excreción/Secreción (E/S) del parásito. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el desempeño, mediante la técnica de ELISA, de productos purificados a partir del antígeno de E/S total de *T. spiralis* que presentan utilidad diagnóstica en el Western blot. Para este fin, se obtuvo el antígeno de E/S y se purificaron dos bandas antigénicas del Western blot correspondientes a los pesos moleculares de 45 y 53 kDa del antígeno de E/S. Por otro lado, se inocularon dos grupos de ratones CF-1, uno con 50 y otro con 500 larvas L1 de *T. spiralis* y otro grupo se mantuvo como control sin inocular. Cada grupo constó de 10 animales dividido a su vez en dos subgrupos de 5 machos y 5 hembras cada uno. Posteriormente, se obtuvo el suero de los animales los días 0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 52; 112; 167 y 316 post inoculación (pi) para emplearlo en la evaluación antigénica mediante la técnica de ELISA de las proteínas purificadas de 45 y 53 KDa y el antígeno total de E/S. Mediante la prueba de Mann-Whitney se analizaron las diferencias de reactividad, evaluadas como mediana de relación de positividad (RP%), respecto al sexo de los ratones, cantidad de larvas inoculadas y el antígeno empleado en el ELISA (45kDa; 53kDa y E/S). En este último caso se analizaron inicialmente las tres variables mediante el test de Kruskal Wallis y luego se aplicó la prueba de Mann-Whitney. El análisis no reveló diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de machos y hembras, en cada grupo de inóculo. No obstante, se evidenciaron diferencias significativas en la respuesta inmunológica de ratones inoculados con 50 y 500 larvas cuando comenzaron a ser positivos en los días 49pi y 35pi, respectivamente. Además, el análisis mostró diferencias en ambos grupos de inóculo (50 y 500L1) entre el E/S total y los antígenos purificados de 45kDa; 53kDa, pero no entre estos últimos antígenos entre sí.

En conjunto, los componentes antigénicos correspondientes a las bandas purificadas de 45 kDa y 53 kDa demostraron un buen desempeño en la detección de la técnica de ELISA y se proponen como candidatos para el futuro desarrollo de un sistema de diagnóstico inmunológico de la trichinellosis que contemple su uso como antígenos recombinantes, que reemplacen el uso del producto de E/S total.

Palabras clave: *Trichinella*, trichinellosis; antígenos; serología, diagnóstico

Summary

Trichinellosis is a zoonotic disease caused by the consumption of meat and/or by-products derived from animals infected with *Trichinella* spp. larvae. In Argentina, this parasitosis is endemic, and 9.583 cases were reported between 2014 and 2023. Since human trichinellosis presents common signs and symptoms with other diseases, clinical diagnosis relies on laboratory auxiliary methods such as serological techniques. Currently, the Parasitology Department at INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" uses the ELISA/Western blot serological diagnostic system, employing a total Excretion/Secretion (E/S) antigen of the parasite. This study aimed to evaluate the performance, using ELISA, of purified products from the total E/S antigen of *T. spiralis* for diagnostic utility in Western blot. The E/S antigen was obtained and two antigenic bands corresponding to molecular weights of 45 and 53 kDa were purified from the Western blot antigen. Additionally, two groups of CF-1 mice were inoculated, one with 50 and the other with 500 *T. spiralis* L1 larvae, while a control group remained uninfected. Each group consisted of 10 animals, further divided into two subgroups of 5 males and 5 females each. Serum samples were collected on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 52, 112, 167, and 316 post-inoculation (pi) for antigenic evaluation through ELISA of the purified proteins of 45 and 53 kDa and the total E/S antigen. Mann-Whitney test was used to analyze reactivity differences, assessed as the median of the positivity ratio (RP%), concerning mouse gender, quantity of inoculated larvae, and the antigen used in ELISA (45kDa, 53kDa, and E/S). The Kruskal-Wallis test was initially applied for the

latter case, followed by the Mann-Whitney test. The analysis did not reveal statistically significant differences between male and female populations in each inoculation group. However, significant differences in the immune response were observed in mice inoculated with 50 and 500 larvae, becoming positive on days 49pi and 35pi, respectively. Additionally, the analysis showed differences between the total E/S and purified antigens of 45kDa and 53kDa in both inoculation groups (50 and 500L1), but not between the latter antigens themselves.

Overall, the antigenic components corresponding to the purified bands of 45 kDa and 53 kDa demonstrated good performance in ELISA detection and are proposed as candidates for the future development of an immunological diagnostic system for trichinellosis, considering their use as recombinant antigens to replace the total E/S product.

Keywords: *Trichinella*, trichinellosis; antigens; serology, diagnosis

***“Evaluación de proteínas antigénicas
de Trichinella spiralis para su
aplicación en inmunodiagnóstico”***

Contenido

1. Introducción

1.1 El género <i>Trichinella</i>	4
1.2 Historia	6
1.3 Trichinellosis en Argentina	8
1.4 Ciclo biológico	10
1.5 Diagnóstico	12
1.6 Antígenos	18
1.7 Justificación y Objetivos	22

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento de <i>Trichinella</i>	25
2.2 Obtención de larvas infectivas	25
2.3 Preparación de Antígeno E/S	26
2.4 Purificación de Proteínas del Conjunto Excretor Secretor	26
2.5 Recuperación de las proteínas del gel y control de la purificación	27
2.6 Cuantificación de proteínas	27
2.7 Infección Experimental	28
2.8 Obtención de muestras de suero	28
2.9 Evaluación antigénica de las proteínas purificadas	29
2.10 Análisis estadístico de las DO obtenidas	29
2.11 Variables en estudio	30
2.12 Análisis de las variables	30
2.13 Análisis parasitológico	31

3. Resultados y discusión

3.1 Purificación de proteínas del conjunto E/S	33
3.2 Digestion Artificial	35
3.3 Evaluación antigénica de las proteínas purificadas	36

4. Conclusiones

63

Introducción

1.1 El género *Trichinella*

La trichinellosis es una enfermedad zoonótica producida por el consumo de carnes y/o subproductos derivados, elaborados a partir de cerdos domésticos o animales silvestres infectados con larvas de *Trichinella* spp.

El género *Trichinella* se ubica dentro del Phylum Nematoda e infecta un amplio rango de hospederos y se encuentra distribuido a nivel mundial. En el año 2007, la trichinellosis humana había sido documentada en 55 (27.8%) países de todo el mundo (1). Durante más de 100 años se consideró que el género *Trichinella* era monoespecífico, que el único agente causal de la trichinellosis era *Trichinella spiralis* y se lo denominaba históricamente “parásito del cerdo”. Sin embargo, a partir de 1960 diversos estudios revelaron la existencia de variantes biológicas, con diferencias de infectividad en hospederos domésticos y silvestres, entre distintos aislamientos (1)(2).

Si bien la presencia de larvas musculares de *Trichinella* se pueden detectar mediante técnicas directas, como la triquinoscopia y la digestión artificial (DA), los genotipos no presentan diferencias morfológicas conspicuas. Inicialmente, las clasificaciones se basaron en el hospedero, rangos geográficos, caracteres biológicos y en la presencia o ausencia de una cápsula de colágeno que rodea la larva muscular o L1(1)

En la actualidad, la diferenciación de las especies y genotipos de *Trichinella* se realiza mediante el empleo de distintas variantes de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) convencional y se reconocen 13 genotipos dentro del género *Trichinella*, diez con característica de especies (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *T. patagoniensis* y *T. chanchalensis*) y tres que aguardan una clasificación taxonómica (“T6”, “T8” y “T9”) (3)(4).

Los genotipos infectan un vasto número de especies y se hallan distribuidos a nivel mundial, siendo *T. spiralis* la especie que muestra una extensa distribución geográfica ya que fue identificada en todos los continentes, a excepción de la Antártida (2).

En Argentina, *T. spiralis* es la especie principalmente involucrada en los brotes humanos e infecciones porcinas, no obstante, en las últimas décadas se han identificado otras tres especies circulantes en el país, *T. pseudospiralis* hallada en un cerdo doméstico de la región Patagónica (5), *T. britovi* identificada en un subproducto elaborado con carne de origen porcino, en la provincia de Mendoza (6) y *T. patagoniensis*, una especie autóctona hallada en *Puma concolor*

que fue identificada por primera vez en la Región Patagónica, y luego en diferentes regiones de Argentina (7).

1.2 Historia

Los registros de casos humanos de trichinellosis son muy antiguos. En 1974, se hallaron larvas musculares de *Trichinella* en un cuerpo momificado de un joven egipcio cuya antigüedad fue estimada en más de 3.000 años. Sin embargo, recién a comienzos del siglo XIX se identificó el parásito y se lo asoció con la enfermedad (2).

En 1835, un estudiante de medicina, James Paget, y el zoólogo Richard Owen realizaron la primera identificación de larvas de *Trichinella* en muestras musculares provenientes de una autopsia de un paciente fallecido por tuberculosis, en el Hospital Londinense de St. Bartholomew. Richard Owen fue el primero en publicar este hallazgo y denominar al parásito como *Triquina spiralis* (8)(2).

En el año 1859 el Patólogo alemán Rudolph Virchow describió por primera vez las larvas adultas de *Trichinella* halladas en el intestino de un perro que falleció luego de ser infectado experimentalmente, luego en 1860 publicó las principales características del ciclo de vida de *T. spiralis*. Posteriormente, Zenker y R. Leuckart, mediante el estudio de infecciones experimentales en distintos hospederos, contribuyeron a asentar las bases del ciclo biológico de *Trichinella* (8).

La principal fuente de infección humana fue dilucidada por primera vez por Zenker, en 1860, cuando halló larvas de *Trichinella* en una muestra muscular del cadáver de una mujer. Luego de un estudio epidemiológico profundo, Zenker determinó que la causa de dicha infección fue la ingesta de carne porcina. Además, este fue el primer reporte de un caso fatal de trichinellosis en humanos. Entre los años 1860 y 1880, Alemania sufrió varios brotes de trichinellosis de gran notoriedad pública en todo el mundo, que comprendieron más de 8000 casos, con el 6% de mortalidad, adjudicados al consumo de carne y subproductos porcinos. En uno de estos brotes, se implementó por primera vez en forma masiva el método de examinación directa del parásito en una biopsia muscular humana, desarrollada por Friedreich en 1862, quien describió el primer caso clínico de trichinellosis (8).

El control veterinario de carcasas de animales destinadas a consumo humano fue iniciado en Alemania en el año 1866, para prevenir la enfermedad por el consumo de carne porcina infectada con el parásito (9).

En 1895, un Helmintólogo francés, llamado A. Railliet reconoció que el nombre *Triquina* se había asignado con anterioridad a un género de un díptero y por lo tanto propuso cambiar esta

denominación por *Trichinella spiralis* (8). Esta nueva designación del género fue universalmente aceptada, aunque en la actualidad algunos autores evocan erróneamente la antigua denominación del parásito en libros, informes y comunicaciones científicas.

1.3 Trichinellosis en Argentina

El primer reporte de un caso de trichinellosis humana en Argentina fue en el año 1898, en la provincia de Buenos Aires donde una familia consumió carne de cerdo, sus integrantes presentaron síntomas compatibles con esta parasitosis, y luego una porción del alimento consumido fue analizada y se hallaron larvas de *Trichinella* (10).

En nuestro país la trichinellosis es una enfermedad endémica, debido principalmente a las pautas culturales de consumo de alimentos elaborados con carne cruda o insuficientemente cocida en forma de chacinados, en particular embutidos, utilizándose mayormente cerdos faenados y procesados en el ámbito familiar, sin control sanitario (4).

Hasta el año 1990, la parasitosis se mantenía en Argentina entre 100 y 200 casos anuales. Sin embargo, luego se observó un notable incremento de personas afectadas (5.217 durante el período 1990-1999) y en las provincias de la zona central del país (Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba) se concentraron el 89% de los casos (10).

La carne de cerdo es la principal fuente de trichinellosis humana en Argentina. La cría de estos animales se realiza principalmente en las provincias de la región centro del país, que representan aproximadamente el 80% del total de la producción porcina nacional.

En porcinos del circuito comercial, de establecimientos habilitados, la prevalencia de infección por *Trichinella* es baja. Los brotes se producen principalmente por el consumo de “chacinados” en su mayoría, sin control veterinario (10).

En la actualidad a través de la resolución N° 555/2006, del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, se crea el Programa de Control y Erradicación de la Triquinosis Porcina en la República Argentina. El objetivo general es evitar la ocurrencia de casos de trichinellosis en los humanos. La normativa unifica criterios técnicos y diagnósticos en todos los niveles (nacional, provincial, municipal y de médicos veterinarios privados).

La trichinellosis es un evento de notificación obligatoria (ENO). La Ley N° 15.465 del 31 de octubre de 1960 establece el régimen legal de estos eventos, e incluye a la trichinellosis como evento de notificación obligatoria en todo el territorio nacional. Según la ley, esta parasitosis se encuentra en el grupo de enfermedades B, y ante la aparición de un caso sospechoso es obligatoria su notificación, en forma individual e inmediata (dentro de las 24 horas) (4). Desde

el año 2018 el sistema oficial de notificación para los ENO es el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud -SNVS2.

Durante el periodo comprendido desde 2014 a 2023, se notificaron 9.583 casos de trichinellosis. El siguiente gráfico muestra la distribución anual de los casos desde el año 2014 al 2023.

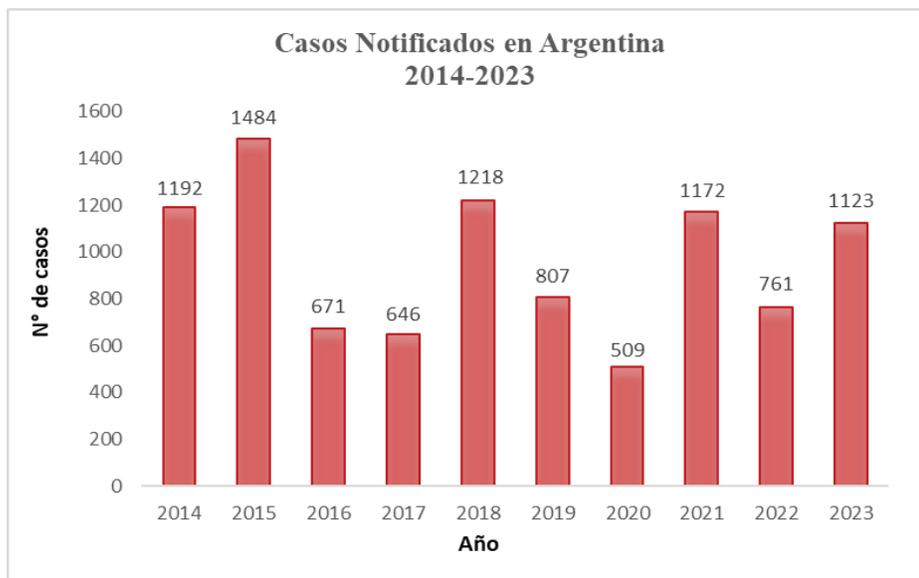


Figura 1: Número de casos humanos notificados de trichinellosis.

Argentina 2014 a 2023. Fuente: SNVS.

Los brotes de trichinellosis se producen en su mayoría durante la época de bajas temperaturas, relacionados al momento del año en que se realiza con mayor frecuencia la faena de animales provenientes de crianza familiar. Durante el invierno, aumenta la elaboración de chacinados y embutidos, muy probablemente debido a que se puede prescindir de una cámara frigorífica para preservar los alimentos (4).

1.4 Ciclo biológico

Los representantes del género *Trichinella* parasitan una amplia variedad de especies de mamíferos, además de reptiles y aves. En su estado de larva L1, el parásito se localiza en la musculatura estriada y puede permanecer viable largos períodos de tiempo. Durante su ciclo biológico los hospederos cumplen el rol de intermediarios y definitivos, ya que tanto los adultos como la forma larval se localizan en diferentes tiempos en el mismo individuo (11).

El ciclo comienza luego de la ingestión de tejido muscular conteniendo la larva infectiva (L1) por parte de un nuevo hospedero. Como resultado del proceso digestivo se produce la liberación de las larvas. En la mucosa del yeyuno e íleon, luego de una sucesión rápida de cuatro mudas que dura entre 8 a 30 hs, alcanzan el estadio adulto diferenciándose en machos y hembras. Luego de la cópula, las hembras grávidas penetran en la mucosa del duodeno y yeyuno, y entre el quinto y séptimo día comienza el proceso de larviposición, que puede durar varias semanas. Cada hembra elimina, aproximadamente, 1500 a 2000 larvas recién nacidas (newborn), dependiendo de la especie de *Trichinella* y del hospedero (8, 12).

Las larvas recién nacidas penetran en la pared intestinal y migran, a través del sistema circulatorio, al tejido muscular estriado. Los parásitos que alcanzan otros órganos y tejidos, incluyendo los músculos lisos, mueren en poco tiempo, generalmente solo las larvas que alcanzan los músculos estriados pueden continuar su desarrollo. Así, penetran en el sarcolema de la fibra donde se pueden encontrar tempranamente a partir del quinto día post-infección (pi). Los grupos musculares de elección son los que presentan mayor actividad metabólica y en consecuencia una mayor irrigación (12).

La presencia de la larva en la fibra muscular induce la formación de una cápsula de colágeno (predominantemente tipo IV y VI), a partir de la secreción de proteínas del parásito que promueven la síntesis de colágeno por la célula nodriza. Este proceso comienza a partir de la segunda semana post infección y se completa, aproximadamente, a las 4 semanas de infección. Esta cápsula de colágeno es muy delgada y difícil de visualizar en las especies clasificadas como no encapsuladas (*T. pseudospiralis*, *T. papuae*, y *T. zimbabwensis*). A través del proceso de angiogénesis se forman nuevos vasos sanguíneos alrededor de esta cápsula y por lo tanto provee un mayor suministro en esta célula de nutrientes y oxígeno, vitales para la supervivencia del parásito. Este complejo hospedador-parásito, denominado célula nodriza, se deriva de una célula muscular. En el período que lleva la formación de la cápsula, la larva sigue creciendo hasta alcanzar una longitud de 0.65 a 1.45mm (el tiempo requerido para maduración es

aproximadamente 15 días). Con el transcurso del tiempo la cápsula se espesa. Este estadio infectivo se mantiene hasta ser ingerido por un nuevo hospedero, iniciándose de esta manera nuevamente el ciclo. Desde el punto de vista epidemiológico, es importante destacar la resistencia del estadio larval a factores físicos y químicos, no siendo mayormente afectada por procedimientos de salazón, desecación, ahumado, como tampoco por el proceso de putrefacción. Asimismo, son resistentes a factores ambientales, por ejemplo, en el Ártico se hallaron larvas viables e infectivas de *T. nativa* en las carcasas de osos polares muertos hace 20 años (12, 30).

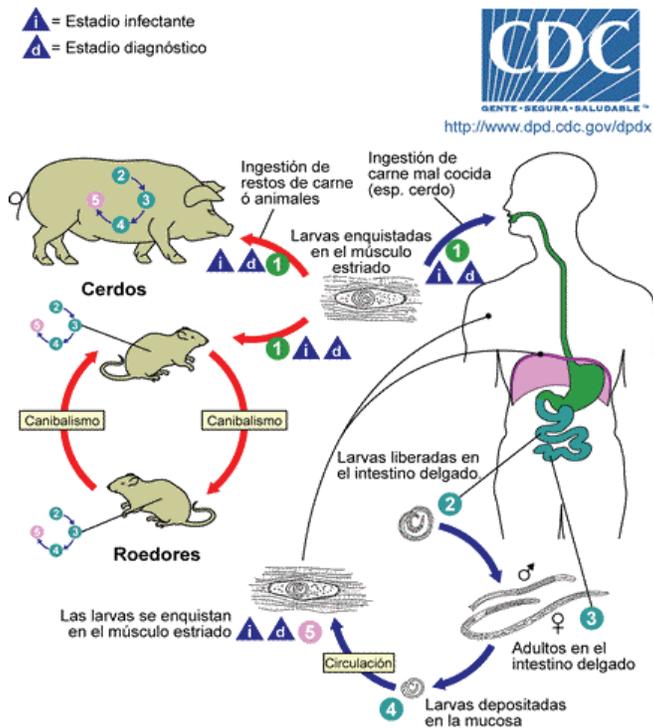


Figura 2: Ciclo Biológico *Trichinella spiralis*. Fuente: CDC.

1.5 Diagnóstico

La trichinellosis es una enfermedad de transmisión alimentaria y en humanos se presenta generalmente en forma de brotes que comprometen a un grupo de personas con una fuente de alimento común. El diagnóstico se basa en los tres criterios, el clínico a través del reconocimiento de los signos y síntomas, de laboratorio con parámetros inespecíficos y específicos y el criterio epidemiológico basado en el antecedente de consumo de carne de cerdo u otro animal silvestre, así como la presentación de casos similares con los que se haya compartido un alimento. Los signos y síntomas son compartidos con otras enfermedades infecciosas y están relacionados con el estadio de la infección. La duración del periodo de incubación presenta variaciones y está relacionado con el número de larvas ingeridas, que suele determinar la gravedad del cuadro clínico, la especie de *Trichinella* involucrada, el estado inmunitario y el estado general de salud de cada individuo. Todos estos factores determinaran el curso clínico de la enfermedad (11).

Inicialmente, en la fase enteral de la trichinellosis, se pueden observar los signos y síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea y fiebre) a partir de la primera semana de haber sido consumido el alimento conteniendo larvas infectivas. Posteriormente, y comenzando la segunda semana de infección, debido al daño tisular y proceso inflamatorio que se da como consecuencia de la migración de las larvas recién nacidas (fase parenteral) se pueden observar los signos y síntomas de la infección aguda como dolores musculares, inyección conjuntival, conjuntivitis tarsal bilateral, edema facial principalmente periorbital y fiebre. Los síntomas más frecuentes son: fiebre, mialgias y edema palpebral. El diagnóstico se sospecha fácilmente por las manifestaciones clínicas en el contexto de un brote, pero es mucho más dificultoso en los casos aislados (13). Debido a que el cuadro clínico de presentación de la enfermedad es variable, y similar a otras enfermedades, resulta dificultoso el diagnóstico cuando se trata de casos aislados o en los primeros pacientes afectados en un brote (11).

Las complicaciones se pueden observar en casos severos y moderados, generalmente se dan en la segunda semana de infección, más frecuentemente en pacientes adultos mayores que no han sido tratados o con tratamiento tardío o inadecuado. Las complicaciones reportadas son cardiovasculares, se desarrolla en el 20% de los pacientes (principalmente miocarditis), neurológicas, se da en trichinellosis severa (encefalitis), oculares, suelen estar relacionadas con complicaciones del SNC, respiratorias (neumonía), gastrointestinales y muerte (14). En mujeres embarazadas con trichinellosis se han descrito casos de aborto o parto prematuro, esta

complicación podría deberse a la modificación en la producción de gonadotropina coriónica humana, progesterona o citoquinas (11,14).

Es importante que el diagnóstico diferencial se realice antes o durante la etapa aguda de infección; de esta manera el tratamiento específico puede administrarse lo antes posible para asegurar su efectividad (14). El diagnóstico clínico se apoya en métodos auxiliares de laboratorio como los métodos serológicos, por ejemplo, enzimoimmunoanálisis (EIA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o Western blot (WB).

1.5.1 Laboratorio clínico

Los parámetros del laboratorio clínico que contribuyen principalmente con el diagnóstico son leucocitosis, eosinofilia y elevación de enzimas musculares, como creatinfosfoquinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa (LDH). La leucocitosis se observa tempranamente entre la segunda y la quinta semana de infección, detectándose valores entre 15.000 a 30.000 cel/ μ l, que disminuyen conforme remiten los signos y síntomas. Valores elevados de eosinófilos se detectan generalmente en la mayoría de los pacientes con trichinellosis. Se observa relativamente en forma temprana entre la segunda y la 5ta semana pi, pudiendo ser leve (menor a 1.000 cel/ μ l), moderada (1.000-3.000 cel/ μ l) y severa (mayor de 3.000 cel/ μ l) alcanzando valores de hasta 19.000 cel/ μ l. El valor de eosinófilos están generalmente relacionado con el grado de mialgias y es significativamente elevado en personas con complicaciones neurológicas. El valor disminuye lentamente pudiendo tardar aproximadamente 3 meses en normalizarse (14).

Por lo tanto, el hallazgo del aumento de eosinófilos brinda una herramienta temprana, característica para orientar el diagnóstico y está correlacionado con la intensidad de la infección (11).

Entre la segunda y quinta semana de infección, en el 75 a 90 % de las personas infectadas detectaron, también en el laboratorio clínico, niveles elevados de enzimas CPK, LDH y aldolasa (14). Este aumento se produce por la destrucción del tejido muscular debido a la migración de las larvas recién nacidas indicadas con la sigla NBL, por su denominación en inglés (newborn larvae). La enzima que aumenta en la mayoría de los casos es la CPK pudiendo llegar a alcanzar diez veces el valor normal. El incremento de los valores de estas enzimas no estaría correlacionado con la severidad del cuadro clínico. Por último, en el laboratorio de rutina en pacientes con trichinellosis, se pueden detectar hipoalbuminemia e hipocalcemia.

1.5.2 Diagnóstico específico

En la trichinellosis humana la mayoría de los signos y síntomas no son patognomónicos por lo tanto son importantes las técnicas inmunológicas para arribar al diagnóstico (15).

La infección por *Trichinella* desencadena una respuesta inmunológica específica debido a los antígenos que se exponen en los diferentes estadios larvales. La respuesta humoral está desarrollada por la aparición en circulación de anticuerpos específicos de varias clases de inmunoglobulinas, principalmente del tipo de IgG (mayoritariamente tipo IgG1 pero también IgG3 e IgG4) además de IgM, IgA e IgE. La identificación de las subclases de IgG no contribuye al diagnóstico (15). Cada clase de inmunoglobulina presenta una secuencia de tiempo diferente, IgM, IgA e IgG se detectan a partir de la segunda semana de infección y aumentan en el transcurso de las 2 o 3 semanas siguientes. Los anticuerpos IgE aumentarían tempranamente en etapa aguda pero rara vez se detectan por su relativamente corto tiempo de vida media. Los test serológicos para la detección de anticuerpos de tipo IgA e IgE demostraron una baja sensibilidad. Los anticuerpos IgM persistirían mucho tiempo y los anticuerpos de tipo IgG pueden perdurar durante años incluso en casos asintomáticos (15,16).

Luego de la infección primaria el tiempo de seroconversión en humanos generalmente ocurre entre la segunda y quinta semana de infección. El máximo nivel de anticuerpos específicos de tipo IgG es generalmente alrededor de la tercera semana, y no se correlacionan con el grado de severidad o el curso clínico de la infección en la etapa aguda (15,17).

El tiempo de seroconversión es variable y depende de la carga larvaria ingerida, de la especie de *Trichinella* involucrada, así como de la respuesta inmunológica individual (17).

Si bien la detección de antígenos circulantes podría ser de utilidad como prueba confirmatoria en etapas tempranas, en la fase enteral de la infección donde generalmente no habría niveles detectables de anticuerpos, tiene un limitado valor ya que no se detectan en la mayoría de los pacientes. Por esta razón, en la actualidad no se utiliza en el diagnóstico de trichinellosis (11).

La biopsia muscular (examen parasitológico directo) en humanos no se utiliza de rutina por tratarse de un método invasivo, doloroso y de baja sensibilidad (15). Sin embargo, podría ser de utilidad en pacientes con muy bajos niveles de anticuerpos, como es el caso de pacientes inmunosuprimidos.

1.5.2.1 Métodos inmunológicos

El diagnóstico inmunológico de la trichinellosis en el hombre, a través de la detección de anticuerpos específicos, comenzó en el año 1911 con el empleo de la fijación de complemento realizada por Strobel. Posteriormente se utilizaron tests de precipitación e intradermorreacciones, y recién, alrededor de 1940 se le dio un fuerte impulso al desarrollo de una gran variedad de test serológicos basados en la detección de anticuerpos en el suero del paciente, que fueron modificándose con el fin de proveer mayor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad (18,19).

En el pasado, para el diagnóstico de trichinellosis se utilizaron las técnicas de fijación de complemento, test de floculación de la bentonita, hemaglutinación indirecta y contraelectroforesis. En la actualidad los métodos más empleados son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la técnica de Western blot.

1.5.2.1.1 Inmunofluorescencia Indirecta

Jackson en el año 1959 fue el primero en aplicar la IFI para la detección de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* (20). A lo largo del tiempo se han utilizado distintas preparaciones antigénicas, como larvas musculares enteras obtenidas por digestión artificial, cortes por micrótomo de congelación de tejidos musculares de ratas infectadas y de larvas musculares libres embebidas en un componente criogénico. A través de esta técnica es posible detectar anticuerpos específicos en el suero de pacientes infectados. Los anticuerpos del tipo IgG pueden ser detectados entre el día 12-14 después de la infección. Si bien esta técnica es más sensible que la hemaglutinación o la fijación de complemento, algunos autores han reportado reacciones cruzadas con otras parasitosis, como *Onchocerca* spp., *Schistosoma mansoni* y enfermedades autoinmunes. Este método requiere un alto nivel de habilidad, experiencia del operador y resulta dificultoso para evaluar grandes cantidades de muestras, como sucede generalmente durante los brotes (17).

1.5.2.1.2 Test de ELISA

El ELISA es el método inmunológico utilizado con mayor frecuencia para detectar infección por *Trichinella* en humanos (17).

Desde la aplicación del ELISA para la detección de trichinellosis humana, varios han sido los métodos y antígenos empleados para la detección de las distintas clases de inmunoglobulinas específicas. La sensibilidad y especificidad dependen en gran medida del antígeno elegido. Se ha utilizado antígeno crudo, antígeno de E/S, antígenos purificados y carbohidratos sintéticos, de parásitos adultos, NBL y larvas musculares (LM) de *T. spiralis*. Inicialmente se ensayó en el ELISA el denominado antígeno somático de LM, dada su fácil obtención a un bajo costo, pero se observaron reacciones cruzadas con otras parasitosis como Ascariasis (*Ascaris suum*) y Filariasis. Por esta razón, no es recomendado su uso para los test serológicos (17).

A partir de la década del 80 se comenzó a utilizar en el ELISA el antígeno de excreción/secreción (E/S) de LM, dada la fácil recuperación y especificidad del diagnóstico comparado con el uso de antígeno somático. La utilización de tivelosa sintética en el ELISA demostró tener una especificidad similar al E/S para la detección de anticuerpos, pero tiene una baja sensibilidad comparada con el mencionado antígeno. Para el diagnóstico de la trichinellosis humana la Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT) recomienda la utilización de la técnica de ELISA con antígeno de E/S de larvas musculares (15).

Con respecto a las variantes metodológicas, se han utilizado enzimoimmunoensayos competitivos, tipo sándwich, así como el ELISA indirecto. La sensibilidad del ELISA para la determinación de anticuerpos de tipo IgG alcanza el 100% el día 50 pi y puede permanecer positivo hasta dos años posteriores, en el 88% de las personas infectadas. En la detección de otras inmunoglobulinas (IgE e IgA) se observó que las pruebas para su detección poseen una menor sensibilidad (11).

El ELISA es un método altamente sensible y específico, si se utilizan antígenos de E/S y posee como principales ventajas el bajo costo, la capacidad de estandarización del método y de los reactivos y la posibilidad de evaluar gran cantidad de muestras (17).

1.5.2.1.3 Western blot

Esta técnica se basa en la separación electroforética de las proteínas antigénicas en un gel de poliacrilamida y la posterior transferencia electroforética a una membrana de nitrocelulosa. Sobre este soporte se realiza la unión antígeno-anticuerpo y la reacción concluye con el agregado de un cromógeno que permitirá la visualización de las bandas antigénicas específicas. Se ha realizado utilizando las preparaciones antigénicas de extracto crudo y producto de E/S de la LM, donde se observan diferentes bandas de acuerdo al antígeno. Así, el patrón de bandas con extracto crudo es mucho más complejo que al utilizar el antígeno de E/S. Si bien mediante esta técnica se pueden detectar los pacientes con trichinellosis, se observó reacción cruzada con toxocariasis, filariosis, anisakiasis entre otras infecciones parasitarias (17).

El WB es usado generalmente como método confirmatorio y para validar resultados obtenidos por ELISA debido a que es un método sensible y específico, si se utilizan productos de E/S como antígeno, y porque permite claramente la visualización del patrón de bandas en sueros reactivos. Posee como desventaja que es un método complejo y de costo elevado.

La ICT recomienda la utilización de la prueba de ELISA como screening y el Wb como técnica confirmatoria, para validar los resultados obtenidos (15).

1.6 Antígenos

En la infección por *Trichinella* se desencadena una importante respuesta inmunológica dada por la diversidad de antígenos que exponen los distintos estadios larvales. El género *Trichinella* es antigénicamente complejo, además en su superficie expresa moléculas proteicas que cambian cualitativamente en los diferentes estadios y cuantitativamente durante el desarrollo del parásito. Según la respuesta inmunológica los antígenos pueden ser agrupados en dos categorías: 1) los antígenos de grupo I o de respuesta rápida (localizados en capas cuticulares, hemolinfa, glándula hipodermal y gránulos exocritos del tracto reproductor del macho), que pueden ser detectados a partir de la segunda semana de infección, y 2) los antígenos del grupo II o de respuesta tardía (localizados en la superficie larval y en los gránulos del esticosoma), que suelen detectarse aproximadamente a partir de la cuarta semana de infección. Estudios con anticuerpos monoclonales demostraron que los antígenos del grupo I poseen fosforilcolina (hapteno ampliamente distribuido en la naturaleza) y los del grupo II antígenos de E/S larvales (21).

1.6.1. Antígenos de excreción secreción

Los antígenos de E/S son sintetizados en los diferentes estadios larvales del desarrollo y la fuente de estos antígenos es el esticosoma. Esta estructura se localiza en la parte media anterior del parásito y posee células con actividad secretora que son denominados esticocitos, que contienen en su interior gránulos denominados alfa, beta y gamma. Estudios sobre la antigenicidad y composición proteica demostraron variaciones entre los productos de E/S de los distintos estadios larvales (17).

Las investigaciones sobre las proteínas de la larva muscular de *Trichinella* se orientaron hacia estos antígenos porque estarían implicados en una respuesta inmunológica específica y jugarían un rol preponderante en la formación de la nurse cell (cuando comienza a secretarse en las células musculares del hospedero), la cápsula de colágeno y por lo tanto en el establecimiento y persistencia por largos periodos de tiempo en el hospedero. Estudios sobre la funcionalidad de estas proteínas revelaron que tienen actividad de endonucleasas, proteinasas, protein quinasas, proteínas de shock térmico, glicosidasas y superóxido dismutasas (22).

Los antígenos de E/S de las larvas musculares consisten en un grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas (17). Inicialmente, el producto de E/S fue estudiado a través de

técnicas electroforéticas, filtración por geles y espectroscopia en relación a su peso molecular, punto isoeléctrico, contenido de hidratos de carbono y antigenicidad. Luego, con el desarrollo de nuevas técnicas, el producto de E/S se estudió mediante “matrix-assisted laser desorption- ionization time of flight” (MALDI-TOF y LC-MS/MS). Esta información fue analizada a través de la base de datos EST de *Trichinella*, donde se identificaron al menos 43 proteínas, representando 13 isoformas. Esto demostró que en el producto de E/S estaban presentes múltiples isoformas proteicas (22).

Los antígenos de la larva muscular de *Trichinella* han sido clasificados en 8 grupos (TSL-1 a TSL-8) basándose en su unión a anticuerpos monoclonales y policlonales. Los grupos TSL-1, TSL-2, TSL-3 y TSL-5 están presentes en el producto de E/S de las larvas. El TSL-1 es el principal epítipo antigénico reconocido por el suero de pacientes con trichinellosis. Las glicoproteínas identificadas dentro del grupo de antígenos TSL-1 poseen un hidrato de carbono como epítipo inmunodominante, denominado tivelosa (3,6 dideoxi D arabino hexosa), que se encuentra escasamente distribuida en la naturaleza y es responsable de provocar la principal respuesta de anticuerpos. Estudios de inmunocitocalización demostraron que este grupo antigénico (TSL-1) se localiza en la superficie cuticular y en los gránulos alfa y beta de los esticocitos (24). Son estadio específicos, están ausentes en el parásito adulto, son muy conservados y pueden ser reconocidos por anticuerpos inducidos por las diferentes especies de *Trichinella*. Las glicoproteínas de 45, 49 y 53 KDa son los principales antígenos (17).

El producto de E/S del parásito adulto es escasamente inmunogénico, no contiene las glicoproteínas específicas identificadas en el gel de poliacrilamida de 45 -53 kDa y las NBL no poseen ningún antígeno del producto de E/S, ya que comienzan a formar el esticosoma luego de invadir la célula muscular (17).

1.6.1.1 Antígenos caracterizados del producto de E/S

TSL-1: Estos antígenos fueron purificados por cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. Los epítopes antigénicos TSL-1 son altamente conservados, ensayos de ELISA han demostrado que pueden ser reconocidos por anticuerpos que son inducidos por diferentes especies de *Trichinella* (17).

Glicoproteína de 53KDa: Los genes que codifican para la glicoproteína de 53 kDa en *T. spiralis* se expresan luego de la formación de la cápsula de colágeno en la larva muscular y el parásito

adulto, pero no previamente a la formación de la misma (pre cápsula) de LM y larvas recién nacidas (NBL). La glicoproteína mostró alta similitud en secuencia con *T. britovi* (90,7%) y *T. nativa* (89,7%) y una menor con *T. pseudospiralis* (66,6%) y *T. papuae* (68,8%). Se encuentra presente en los gránulos beta, pero no en los denominados alfa. La respuesta de anticuerpos contra esta glicoproteína es dada principalmente hacia epítopes proteicos, mientras que la respuesta a epítopes glucídicos es menor. (17,22)

Zarlenga y Gamble fueron los primeros en identificar los genes que codificaban para una glicoproteína de 53 kDa de *T. spiralis*, a partir de una biblioteca de expresión ADNc de *Trichinella spiralis* en *Escherichia coli* e identificaron la secuencia génica completa a partir de un clon denominado TsA 12 (24). Posteriormente esta secuencia, que codifica para la proteína de 53 KDa, fue clonada y expresada en un sistema de expresión de Baculovirus. La proteína de fusión mostró reactividad inespecífica frente a sueros porcinos previa inmunización tanto con la técnica de ELSA como con Western blot. Cuando se evaluó esta proteína recombinante con paneles de sueros porcinos infectados con *T. spiralis* de dos experimentos diferentes, los resultados no fueron consistentes entre ambas poblaciones, lo que indicaría una baja sensibilidad al ELISA (25).

Glicoproteína de 43 KDa: Esta glicoproteína podría ser responsable de la formación de la cápsula de colágeno, ya que se expresa previa y posteriormente a su formación (en la pre y post cápsula), pero no en el parásito adulto. La comparación de secuencia aminoacídica entre la glicoproteína de 43 kDa de *T. spiralis* y *T.pseudoespiralis* demostró una alta similitud (alrededor del 84% de homología) con diferencias de pesos moleculares (38 kDa en el caso de *T. pseudoespiralis*). Esta glicoproteína podría tener actividad desoxirribonucleasa II α (DNasa II α) (22). Fue aislada del producto de E/S de la larva muscular de *T. spiralis* y caracterizada con respecto a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas (29).

Glicoproteína de 45 kDa: Posee como hidrato de carbono tivelosa y está presente en los gránulos beta y gamma de los esticocitos de la larva muscular. El gen que codifica para esta glicoproteína pertenece a la familia de genes multicopia, que codifica para varias proteínas larvales en el rango de 40-50 kDa. Análisis bioinformáticos identificaron que la proteína secretada de 45 kDa pertenece a la familia de las serin proteasas similar, a la tripsina (22).

Glicoproteína de 46 kDa (Ts-CLP): Bin Tang y colaboradores (2015) identificaron y caracterizaron a partir de una biblioteca de expresión cDNA una proteína antigénica que denominaron Ts- CLP (cystatin-like protein). Determinaron que probablemente, se trataría de

una proteína de excreción a partir del estudio de la secuencia de péptido señal y de los sitios de N glicosilación. Estudios de inmunocitocalización y PCR cuantitativa mostraron que la Ts- CLP nativa se encontraría localizada principalmente en los β -sticocitos y que el gen Ts-clp se transcribiría y expresaría en todas las etapas de desarrollo de *T. spiralis*. Concluyen que Ts- CLP puede desempeñar un papel importante en la infección temprana de *T. spiralis* y que la proteína Ts-CLP recombinante es un antígeno candidato para el diagnóstico debido a que rTs- CLP fue reconocida por sueros porcinos a los 15 días post inoculación (pi) (31). Posteriormente esta proteína recombinante fue evaluada en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas competitivo (cELISA) para el diagnóstico de la infección por *T. spiralis* en sueros murino, porcinos y humanos (32).

Beta tivelosa sintética: Este hidrato de carbono fue identificado como el epitope inmunodominante de los antígenos glicosilados denominados TSL-1 (27). Por esta razón, la beta-tivelosa sintética ha sido ensayada como alternativa para la detección de anticuerpos específicos. Presenta como ventajas su estabilidad y fácil estandarización. Ensayos realizados con sueros de porcinos infectados con *Trichinella*, demostraron que comparativamente con el antígeno de E/S, este hidrato de carbono posee una menor sensibilidad en la detección de anticuerpos específicos de tipo IgG (28).

1.7 Justificación

En la actualidad, en el Departamento de Parasitología del INEI, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” se utiliza el sistema de diagnóstico serológico ELISA/Western blot en serie, desarrollado in house para satisfacer la demanda diagnóstica de gran parte de los brotes de trichinellosis que acontecen en Argentina, con un promedio de 420 determinaciones anuales. No obstante, este sistema presenta distintas dificultades, como la necesidad de producción del antígeno de E/S, que requiere el empleo de animales de laboratorio para su elaboración. Esta etapa implica inocular ratones con larvas L1 de *T. spiralis*, mantenerlos en bioterio un mínimo de 35 días, practicarles la eutanasia, procesar el tejido muscular para aislar las larvas y cultivar las mismas para obtener su producto secretado. Otras desventajas son las variaciones en la concentración de los productos de E/S de un lote a otro, la laboriosidad, el costo y tiempo que demanda el procedimiento. En conjunto, estas razones hacen que se plantee la necesidad de desarrollar un sistema inmunodiagnóstico que reemplace el empleo del antígeno E/S por un antígeno recombinante.

Este estudio experimental tiene como finalidad a través del análisis preliminar del desempeño de los productos purificados en la técnica de ELISA, sentar las bases para la elección de un sistema que contemple el uso de componentes antigénicos de las bandas de 45 kDa y 53 kDa, como candidatos para la obtención de antígenos recombinantes, para el reemplazo futuro del producto de E/S total.

Objetivo general

Evaluar las proteínas antigénicas correspondientes a las bandas de 45 y 53 kDa del producto de E/S de *T. spiralis*, para su aplicación en inmunodiagnóstico de la trichinellosis en un modelo experimental murino.

Objetivos específicos

- Purificar bandas antigénicas 45 y 53 KDa del producto de E/S de *T. spiralis*.
- Generar respuesta inmunológica en ratones CF1 machos y hembras, inoculados con diferente cantidad de larvas de *T. spiralis*.

-Evaluar la antigenicidad de los productos purificados de 45 y 53 KDa y el producto de E/S total, frente a los sueros de los ratones CF1 infectados experimentalmente, mediante la técnica de ELISA

-Realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos según tipo de antígeno empleado, el sexo y carga larvaria de los animales donde se obtuvo el suero.

Materiales y métodos

2.1 Aislamiento de *Trichinella*

El aislamiento de referencia Internacional de *T. spiralis* ISS 643, fue aislado en Chile en el año 1985 y depositado e identificado a nivel de especie en el Centro de Referencia Internacional de *Trichinella* Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia. Este aislamiento se mantiene, en la actualidad, por pasajes sucesivos en ratones CF-1. A partir de la técnica estándar de digestión artificial (Ver sección 2.2) se recuperan las larvas L1 viables del tejido muscular del ratón y luego se inoculan nuevos animales con el fin de reiniciar el ciclo biológico y mantener el parásito.

2.2 Obtención de larvas infectivas

Para la obtención de larvas infectivas se inocularon con el aislamiento *T. spiralis* ISS 643 un total de 20 ratones machos, cepa CF-1, de 25-30 gramos de peso, provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

El procedimiento se realizó mediante inoculación vía oral con 500 larvas musculares. Transcurridos los 35 días fueron eutanasiados mediante la utilización de cámara de dióxido de carbono, según la guía sobre eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA), 2020. Luego se evisceraron y se recuperaron las larvas infectivas del tejido muscular de acuerdo al siguiente procedimiento:

La carcasa muscular de cada animal se trituró mediante una picadora de carne manual e incubó en una solución de 1% de pepsina A, proveniente de mucosa gástrica porcina (Sigma) y 1% HCl 37% (Anedra), en una proporción de 1:10 de muestra muscular en relación al líquido de digestión. Se mantuvo en agitación permanente en un vaso de precipitado, dispuesto en un agitador magnético, a una temperatura de alrededor de 42 °C, hasta completar la digestión del tejido muscular. Después, la mezcla se tamizó mediante una gasa, el contenido se trasvasó a una ampolla de decantación de 1 litro y se dejó decantar durante 30 minutos. Luego, se drenó un volumen de 45 ml de la ampolla de decantación a un tubo plástico cónico de 50 ml. Se dejó decantar 10 minutos, se retiró el sobrenadante hasta dejar 10 ml de volumen y se llevó nuevamente a un volumen de 45 ml con agua. Este último paso se reiteró dos o tres veces hasta obtener un sobrenadante sin turbidez. Después de 10 minutos de decantación, se retiró el sobrenadante hasta dejar 10 ml de volumen, se trasvasó a una placa de Petri y se examinó al

microscopio invertido para contabilizar el número de larvas por gramo de la muestra muscular analizada. Para este fin, el contenido final de 10 ml se colocó en un tubo cónico de plástico de 50 ml se tomaron 10 muestras individuales de 50 μ l, y se colocaron en portaobjetos provistos con cubreobjetos, para calcular la media aritmética y así estimar el número total, de larvas en el volumen inicial.

2.3 Preparación de Antígeno E/S

Al sedimento conteniendo las larvas obtenidas en la sección 2.2, se le realizaron tres lavados de 40 ml c/u con medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina (1 ml de solución de penicilina/estreptomicina cada 100 ml de DMEM) y fraccionaron en frascos de cultivo en proporción de 25.000 larvas por cada 5 ml de medio de cultivo. Se incubó durante 18 hs, a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente se separó el medio conteniendo el producto de E/S mediante precipitación de las larvas y se concentró por filtración tangencial utilizando una columna Pellicon XL (filter PLCGC 10K).

2.4 Purificación de Proteínas del Conjunto Excretor Secretor

El producto de E/S obtenido, se separó mediante la técnica de electroforesis (Bio Rad Mini Protean 3) y se recuperaron dos bandas mayoritarias antigénicas correspondientes a los pesos moleculares de 45 y 53 kDa. La muestra de E/S se sembró junto con buffer muestra (Glicerol; SDS, 2 mercaptoetanol y azul de bromofenol) en un gel de poliacrilamida, de 1,5 mm de espesor, al 12.5%, y se corrió a 150 voltios durante 1 hora en buffer tris 1,5%, glicina 7.2%, SDS 1%). Posteriormente se realizó el método de tinción negativa, con sulfato de zinc (SO₄Zn 0,4 M, Imidazol 0,2M), para la visualización y posterior escisión de dichas bandas del gel.

2.5 Recuperación de las proteínas del gel y control de la purificación

Las bandas antigénicas escindidas del gel en la sección 2.4 se colocaron en tubos de vidrio con buffer de elución (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) y se procedió a la electroelución en un equipo Bio rad- modelo 422, durante 5 hs a razón de 10 mA por tubo. Los eluatos se recolectaron en 400 µl de buffer de elución y se conservaron a -20°C.

Luego se realizó el control de la purificación mediante la técnica de Western blot. Cada producto eluido se sembró en un gel de poliacrilamida de 0.75 mm de espesor al 12,5%, (se corrió 150 voltios durante 1 hora, en buffer tris base 1,5%, glicina 7.2%, SDS 1%). Posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad 0.45µm) durante 1 hora a 100 v en buffer de transferencia (Tris base 1.5%, glicina 7.2%, SDS 1%, metanol 10%) y bloqueada a 4° ON con PBS/tween 0,05%/ leche descremada 5%. La técnica de Western blot se llevó a cabo utilizando, como anticuerpo primario, un pool de sueros controles positivos humanos (1/100 con PBS/ Tween 0,5%, leche descremada 5%). Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario, anti igG conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), (1/5.000 con PBS/Tween 0,5%, leche descremada 5%). Ambas incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora en agitación permanente. Para el revelado se utilizó Diaminobencidina (Sigma) (PBS, DAB 0,012mg, H₂O₂).

La purificación se consideró correcta ante la visualización de una banda de precipitación única del correspondiente peso molecular.

2.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de los eluatos y del producto de E/S se llevó a cabo mediante el método de Bradford, basado en la variación de absorbancia (595nm) producida por el cambio de color del Coomassie Brilliant Blue G-250, donde se determinó la concentración de proteínas totales.

En el caso de las bandas extraídas del gel, la cuantificación se llevó a cabo mediante pooles, de cada banda (45 y 53 kDa).

Con el objetivo de generar respuesta inmunológica en ratones para la evaluación de la antigenicidad de los productos purificados de las bandas antigénicas de 45 kDa y 53 kDa y el producto de ES, se realizaron las actividades que se detallan a continuación.

2.7 Infección Experimental

Se realizó una infección experimental en ratones exocriados de cepa CF-1 machos y hembras, de 30 días de edad, entre 25-30 gr de peso provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Los animales se mantuvieron dentro de jaulas de poliestireno, a temperatura ambiente con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y acceso libre de alimento balanceado para roedores y agua. En total se emplearon 30 animales repartidos en 6 grupos de 5 animales cada uno, de acuerdo al siguiente esquema:

-Ratones inoculados con baja carga (50 L1): Un grupo de - 5 ratones machos y otro grupo de 5 hembras inoculados con 50 larvas L1 de *T. spiralis*.

-Ratones inoculados con alta carga (500 L1): Un grupo de - 5 ratones machos y otro grupo de 5 hembras inoculados con 500 larvas L1 de *T. spiralis*

-Grupo control: Un grupo de 5 ratones machos y 5 hembras no inoculados, que se mantuvieron en las mismas condiciones que los ratones inoculados experimentalmente.

2.8 Obtención de muestras de suero

Se realizó una extracción de sangre en cada animal los días 0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 52; 112; 167 y 316 días post inoculación (pi). Cada muestra de sangre consistió en un volumen de aproximadamente de 70µl que se obtuvo a partir de la escisión de la punta de la cola, mediante el auxilio de una hoja de bisturí. Las muestras se colectaron en tubo seco, posteriormente se separó el suero y se conservó a -20°C hasta su utilización.

2.9 Evaluación antigénica de las proteínas purificadas

A través del análisis de los valores de densidad óptica (DO) vs días pi se evaluó la antigenicidad de las proteínas purificadas, por la técnica de ELISA. Para este fin se sensibilizaron placas de polivinilo de alto pegado (Greiner Bio-one) con 0,5 ug de proteína por well (pool 45 kDa, pool 53 kDa y E/S) con buffer carbonato bicarbonato (PH 9.6), durante toda la noche, a 4°C. Luego fueron bloqueados los sitios inespecíficos con PBS/Tween /Albúmina al 3%, a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se incubaron los sueros correspondientes a todos los días de sangrado, por duplicado (dilución 1/200 en PBS tween albúmina 3%) a 37°C durante 30 min, y luego de tres lavados de 3 min c/u con PBS/tween 0,05%, se incubaron durante 30 min a con anti IgG total de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, a 37°C durante 30 min. La reacción colorimétrica se llevó a cabo mediante el agregado de orto-fenilendiamina (OPD 2 mg /buffer citrato PH 5/H₂O₂). Luego de 10 min se realizó la lectura a 450 y 620 nm.

2.10 Análisis estadístico de las DO obtenidas

Con el fin de realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos con las variables de trabajo se procedió de la siguiente manera:

Se calcularon los valores de DO como Relación de positividad % (RP%) mediante el volcado de las lecturas en una base de Excel, y se realizaron de esta manera comparaciones entre ensayos diferentes, por medio de la siguiente fórmula:

$$RP(\%) (muestra x) = \frac{\text{Densidad óptica (muestra x)}}{\text{Densidad óptica suero control positivo}} * 100$$

Se consideró para el análisis e interpretación de los resultados un valor de relación de positividad (RP) mayor a 20 como positivo el Elisa.

Posteriormente los resultados de RP % fueron volcados a una base de datos SPSS versión 23 y se efectuó el análisis estadístico de las variables.

2.11 Variables en estudio

Se analizaron las siguientes variables, todas se comportan como variables cualitativas porque, aunque los valores posibles son números no se efectuaron cálculos matemáticos con ellos, a excepción de la variable RP que es una variable cuantitativa continua.

Variable	Operacionalización
RP %	0 a 100
Sexo de los ratones	machos y hembras
Cantidad de larvas inoculadas por ratón	0; 50; 500
Antígeno	45 kDa; 53 kDa; E/S
Día de toma de muestra post inoculación (pi)	0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 52; 112; 167 y 316

2.12 Análisis de las variables:

- **Sexo:**

Se realizó el análisis estadístico mediante el test de Mann Whitney para evaluar la reactividad según sexo de los ratones inoculados con 50 y 500 larvas infectivas y de esta manera determinar la existencia de diferencias en la respuesta inmunológica entre machos y hembras. El análisis de las RP% se realizó para cada inóculo, según antígeno por sexo.

- **Cantidad de larvas inoculadas:**

Se identificó dentro de cada grupo de antígeno (45 kDa, 53 kDa y E/S) el día pi que la mediana de la RP% arrojó un valor igual o superior a 20, para los diferentes inóculos (50 y 500 larvas). Posteriormente se realizó la comparación de reactividades entre dos variables de inóculo utilizando el Test de Mann Whitney para cada antígeno, para analizar si hay diferencias entre las dos poblaciones (en este estudio las dos poblaciones serán cada antígeno evaluado con los

dos inóculos ensayados, un día dado). En todos los casos se consideró un nivel de significación alfa = 0.05.

- **Antígenos:** En primer lugar, se realizó la comparación global de los tres antígenos para cada inóculo (50 y 500) el día que la mediana de RP% arrojó un valor igual o mayor a 20 para los tres antígenos; para esto se utilizó el test de Kruskal Wallis. Luego, en los casos en que la comparación global presentó diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de inoculación, se continuó el análisis con una comparación de a pares aplicando el test de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró un nivel de significación alfa = 0.05.

2.13 Análisis parasitológico

Transcurridos los 316 días de la experiencia, se eutanasiaron mediante la utilización de cámara de dióxido de carbono (AVMA,2020) los ratones inoculados con 50 y 500 larvas y los del grupo control. Al total de tejido muscular de cada ratón se le determinó el peso y luego se analizó mediante la técnica estándar de digestión artificial, como se describe en la sección 2.2.

Resultados y Discusión

3.1 Purificación de Proteínas del Conjunto E/S: Análisis cuali-cuantitativo

En el diagnóstico de la trichinellosis, la técnica de Western blot empleando el antígeno de E/S de *T. spiralis* es utilizada en el Departamento de Parasitología, INEI, "Dr. Carlos G. Malbrán", mediante la detección de las bandas de 45, 49 y 53 kDa, como método confirmatorio para validar los resultados obtenidos por ELISA.

En el presente estudio, las bandas diagnósticas de 45 y 53 kDa detectadas en el Western blot, se pudieron extraer por electroelución (Figuras 3 A y B) y cuantificar mediante método de Bradford (Tabla 1).

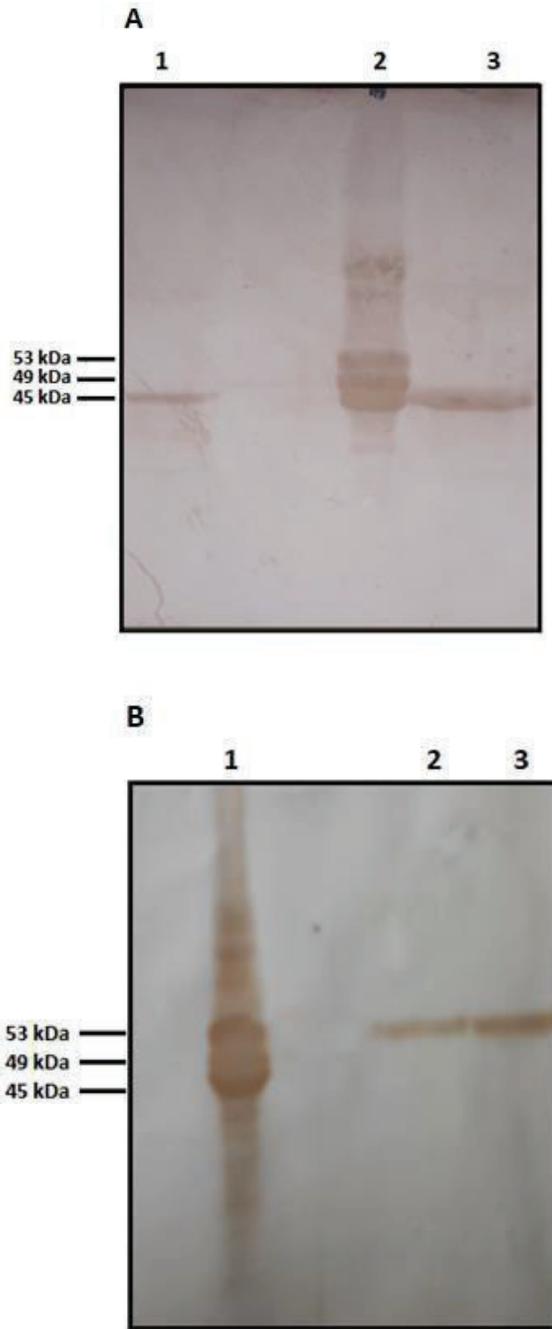


Figura 3: Análisis por Western blot de las bandas eluidas de 45 y 53 kDa del producto de E/S total, donde se observa el peso molecular correspondiente a cada banda. **A)** Elución de la banda de 45kDa. Las calles 1 y 3 corresponden al eluato 45kDa y la calle 2 al producto de E/S. **B)** Elución de la banda de 53 kDa. La calle 1 muestra el producto E/S y las calles 2 y 3 el eluato de 53kDa. En el margen izquierdo los números representan el tamaño del peso molecular del marcador.

Tabla 1: Cuantificación de proteínas totales en los pools elaborados con las bandas eluidas (correspondientes a 45 y 53kDa) y del antígeno de E/S utilizado durante toda la experiencia.

Antígeno	Concentración (µg/µl)
E/S	0,89
Pool banda 45kDa	0,32
Pool banda 53kDa	0,19

3.2 Digestión artificial (D.A)

La técnica estándar de digestión artificial, permite detectar y cuantificar larvas de *Trichinella* en un tejido muscular. En esta experiencia, este método se empleó como control de infección de los ratones. Se verificó la infección por *T. spiralis* en todos los animales inoculados, a excepción de las hembras inoculadas con 500 Larvas L1 que no pudieron analizarse debido a un inconveniente técnico. La carga larvaria se correspondió con la cantidad de larvas inoculadas, dado que los ratones machos inoculados con 500 L1 mostraron una carga larvaria 22.5 y 7.8 veces mayor que los ratones machos y hembras inoculados con 50 L1, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Digestión artificial de los grupos de ratones inoculados con 50 y 500 larvas al finalizar la experiencia (día 316 post inoculación).

Grupo	Inóculo(L1)	Larvas/gr (promedio)
Machos	50	65,5
Machos	500	1472
Hembras	50	188
Hembras	500	n/d

n/d: No determinado.

3.3 Evaluación antigénica de las proteínas purificadas mediante la técnica de ELISA

3.3.1 Análisis de reactividades según sexo:

En los estudios inmunológicos es importante incluir poblaciones representativas de ambos sexos debido a que esta variable biológica afecta las respuestas inmunitarias, innatas y adaptativas, enfermedades infecciosas y autoinmunes (33).

A partir del análisis estadístico, se concluye que en el presente trabajo no hay diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de ratones CF-1 machos y hembras, en cada grupo de inóculo para cada antígeno ($p > 0.05$) (Tabla 3). Los análisis subsiguientes, por lo tanto, se realizaron considerando los datos de ambas poblaciones en conjunto, sin tener en cuenta esta variable, agrupando las poblaciones de ratones según la carga larvaria inoculada (grupo de inóculo).

Tabla 3: Análisis estadístico de las reactividades según sexo, realizado mediante test de Mann Whitney.

Inóculo	Antígeno	Sexo	N	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
50	45	Machos	60	1703	0,72
		Hembras	59		
	53	Machos	60	1743	0,886
		Hembras	59		
	ES	Machos	58	1635	0,795
		Hembras	58		
500	45	Machos	48	1288	0,83
		Hembras	55		
	53	Machos	48	1260	0,692
		Hembras	55		
	ES	Machos	44	1139	0,617
		Hembras	55		

3.3.2 Análisis de la variable cantidad de larvas inoculadas

En la evaluación antigénica según los grupos de ratones inoculados con diferentes cargas larvarias, se detectaron anticuerpos en los ratones inoculados con 50 y 500 larvas en el ELISA utilizando tanto el antígeno E/S como con los antígenos obtenidos de las bandas purificadas (45 kDa y 53 kDa). No se detectó respuesta inmunológica frente a ningún antígeno en el suero de ratones del grupo sin inocular (Figura 4,19,20). Al comparar las diferentes inoculaciones, 50 y 500 larvas L1, se observó un valor mayor de la mediana de RP% en el grupo de ratones inoculados con alta carga en comparación con los inoculados con menor carga larvaria (Figura 4). El análisis demostró que, como era de esperar, hay diferencias estadísticamente significativas en la respuesta inmunológica de ratones inoculados con 50 y 500 larvas al estudiar las reactividades cuando comienzan a ser positivos, en los días 49pi y 35pi, respectivamente (Figuras 5,6 Tablas 4,5,6,7). Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando compararon ambas cargas larvarias el día 49 pi frente al antígeno de 45 kDa, esto puede deberse a la amplia dispersión de los datos de RP% obtenidos con el suero de ratones inoculados con 50 larvas puntualmente frente al mencionado antígeno (Figura 6, Tabla 7).

Así mismo, luego de realizar el análisis de las reactividades dentro de cada grupo de inóculo (50 y 500 larvas), se observó una mayor reactividad global (mediana de RP%) y una detección de anticuerpos de forma más temprana al enfrentar el suero de los ratones infectados al antígeno de E/S total comparado con los antígenos purificados correspondientes a las bandas de 45 y 53 kDa. Esta diferencia de tiempo, entre los antígenos purificados y el producto de E/S, en alcanzar una RP mayor a 20 en el grupo inoculado con 500 larvas es menor que en el grupo de 50 larvas (1 semana vs 2 semanas, respectivamente) (Figuras 4,8-12,15-19).

Según otros estudios experimentales realizados con *T. spiralis* en modelo porcino, el tiempo necesario para la detección de anticuerpos depende de la carga larvaria (34). En el presente trabajo pudimos concluir que, tanto al utilizar como antígeno el producto de E/S como cada banda antigénica purificada, a mayor inóculo, menor fue el tiempo para la detección de anticuerpos y fue mayor la respuesta inmunológica que se detectó al analizar días puntuales y reactividad global. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio experimental son esperables y concuerdan con lo reportado por otros autores (34).

Se realizó un análisis de las reactividades globales para cada grupo de ratones inoculados con 50 larvas, 500 larvas y grupo control, frente a cada antígeno mediante la técnica de ELISA (Figura. 4).

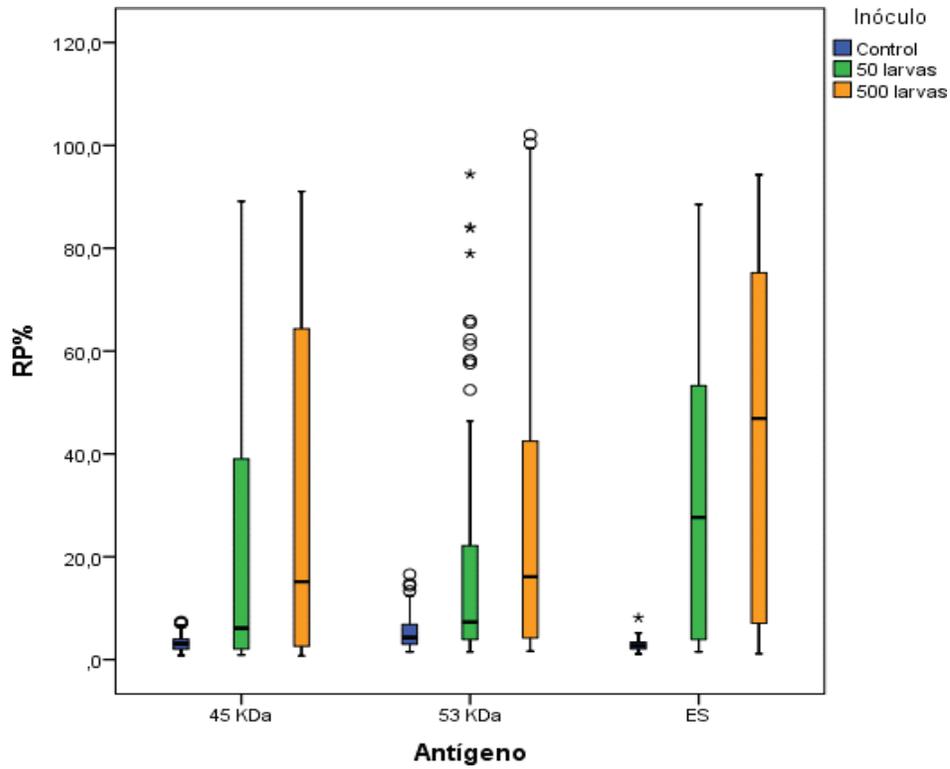


Figura 4: Reactividad global (Box plot de RP%) para los diferentes grupos de inóculos frente a los antígenos 45kDa; 53kDa y E/S. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

3.3.2.1 Análisis de reactividades al día 35 pi

Tabla 4: Casos estudiados para el análisis de RP% el día 35, para cada antígeno y grupo de inóculo (50 y 500 larvas).

Antígeno	Larvas inoculadas	Válido		Perdidos	
		N	%	N	%
45 kDa	50	10	100.0	0	0.0
	500	8	80.0	2	20.0
53 kDa	50	10	100.0	0	0.0
	500	9	90.0	1	10.0
ES	50	9	90.0	1	10.0
	500	8	80.0	2	20.0

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

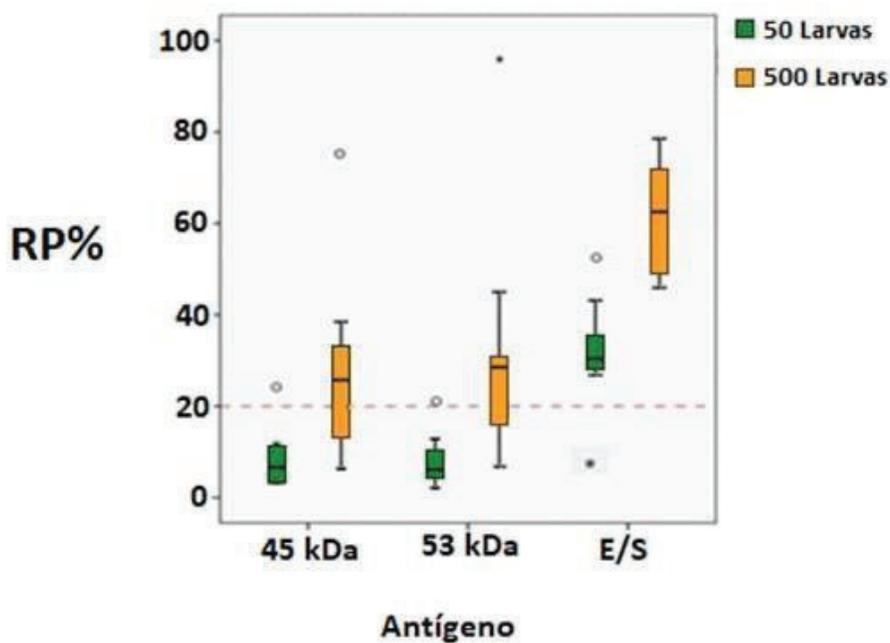


Figura 5: Blox plot de RP% para cada antígeno con los diferentes inóculos el día 35pi. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

En el gráfico puede observarse que el día 35 pi. resultaron positivos los sueros de ratones inoculados con 500 larvas frente a los tres antígenos (45 kDa, 53 kDa y E/S), mientras que los sueros obtenidos de ratones inoculados con 50 larvas resultaron positivos únicamente cuando se utilizó el antígeno E/S.

3.3.2.1 a) Test de Mann Whitney

Tabla 5: Análisis estadístico de cada grupo de inóculo (50 y 500 larvas) frente a cada antígeno (45 kDa, 53 kDa y E/S) el día 35 pi.

Antígeno	Larvas inoculadas	N	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
45	50	10	8	0,004
	500	8		
53	50	10	8	0,003
	500	9		
ES	50	9	3	0,001
	500	8		

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los resultados del test de Mann Whitney (Tabla 5) indican que hay diferencia estadísticamente significativa entre las reactividades de los sueros de ratones inoculados con 50 y 500 larvas, evaluando cada antígeno (45 kDa, 53 kDa y ES) el día 35 p i($p < 0.05$).

3.3.2.2 Análisis de reactividades el día 49 pi

Tabla 6: Casos estudiados para el análisis de RP % el día 49, para cada antígeno y grupo de inóculo (50 y 500 Larvas).

Antígeno	Larvas inoculadas	Válido		Perdidos	
		N	%	N	%
45 kDa	50	10	100.0	0	0.0
	500	9	80.0	1	20.0
53 kDa	50	10	100.0	0	0.0
	500	9	90.0	1	10.0
ES	50	9	90.0	1	10.0
	500	9	80.0	1	20.0

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

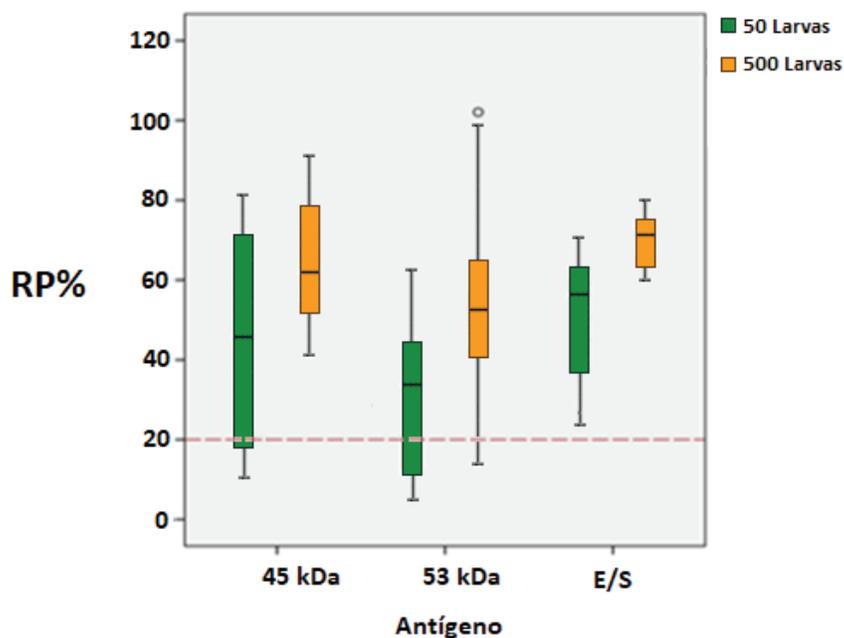


Figura 6: Blox plot de RP% por antígeno para cada inóculo el día 49 pi. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual. El día 49 pi son positivos los sueros de ratones inoculados con 50 y 500 larvas frente a los tres antígenos (45 kDa, 53 kDa y ES).

3.3.2.2 a) Test de Mann Whitney

Tabla 7: Análisis estadístico mediante el Test de Mann Whitney de cada grupo de inóculo (50 y 500 larvas) frente a cada antígeno (45 kDa, 53 kDa y E/S) el día 49 pi.

Antígeno	Larvas inoculadas	N	U de Mann- Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
45 kDa	50	10	24	0,086
	500	9		
53 kDa	50	10	17	0,022
	500	9		
ES	50	9	12	0,012
	500	8		

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los resultados del Test de Mann Whitney (Tabla 7) indican que hay diferencia estadísticamente significativa entre las reactividades de los sueros de ratones inoculados con 50 y 500 larvas, el día 49 cuando se enfrentan al antígeno 53 kDa y E/S, pero no en el caso del antígeno de 45 kDa.

3.3.3 Análisis de la variable antígeno

Respecto a la evaluación según el antígeno, cuando se analizó la diferencia de detección dentro de cada grupo de inoculación, de alta y baja carga larvaria, comparando las RP% el primer día de la experiencia que fueron positivos (35pi.) frente a los tres antígenos, se observó que los ratones inoculados con altas dosis (500 larvas) exhibieron diferencias entre el E/S total y los antígenos purificados, aunque no hubo diferencias significativas entre estos últimos entre sí (Tablas 15,16,17,18 y Figura 18).

Al realizar este mismo análisis en el grupo de ratones inoculados con 50 larvas, se concluyó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tres antígenos, el día 49pi. (Tablas 9,10,11 y Figura 12). Sin embargo, al observar el gráfico de la RP% vs días para los tres antígenos en el grupo de ratones inoculados con menor carga larvaria, se podría inferir que los antígenos purificados aumentan inicialmente juntos en la misma semana y de manera posterior al antígeno E/S (Figuras 7-11). Si se aplicara el mismo análisis estadístico realizado pero el día 42 pi (una semana antes) que es cuando empiezan a aumentar los valores de RP%, se concluye que hay diferencias significativas entre los antígenos purificados y el ES total, pero no entre los correspondientes a las dos bandas purificadas (45 kDa y 53 kDa). Llegando de esta manera, a la misma conclusión que en el caso de la inoculación con altas cargas (Figuras 10,11 y Tablas 12, 13).

Se debe destacar que los antígenos correspondientes a las bandas purificadas demostraron capacidad de unión a anticuerpos en sueros de ratones infectados y una cinética comparable al E/S, como se observa en los gráficos de mediana de RP % vs días pi, de los diferentes antígenos durante toda la experiencia (Figuras 10,11,16,17). Las diferencias exhibidas son esperables por la mayor cantidad de determinantes antigénicos que ofrece el conjunto de proteínas y glicoproteínas del producto E/S. Lo que explicaría el menor tiempo en la detección de anticuerpos y los valores máximos de mediana de RP% obtenidos, que son mayores utilizando el producto de E/S total en el enzimoimmunoensayo. Hay que tener en cuenta que el ELISA utilizando este antígeno se emplea como técnica de screening, debiéndose confirmar los resultados por el método de Western blot, para descartar falsos positivos. Por lo tanto, hay que considerar que esta mayor respuesta medida como mediana de RP % podría deberse además a uniones inespecíficas, que se detectan por el método de ELISA pudiendo no tratarse de anticuerpos específicos.

Por resultados observados anteriormente, si bien las bandas purificadas presentan diferencias esperables con el uso de E/S total, los componentes de las mismas podrían utilizarse en el inmunodiagnóstico de trichinellosis.

En este estudio experimental, al analizar los resultados obtenidos utilizando como antígenos los productos de las bandas purificadas (45 y 53kDa), se puede concluir que no hay diferencias en lo que respecta al día post inoculación que se detectan positivos, así como en los niveles de anticuerpos detectados ese día pi (mediana RP%) entre ambos antígenos independientemente del inóculo (50 y 500 larvas) (Tablas 11,12,13,18). Por lo tanto, no habría una ventaja en el uso de uno u otro producto purificado, en inmunodiagnóstico.

En los gráficos donde se representan niveles de anticuerpos alcanzados durante toda la experiencia, podría inferirse que los productos purificados de la banda de 45 kDa alcanzan un mayor valor que las de 53 kDa (Figuras 7,8,10,13,14,16). Esto principalmente se observa con el suero de ratones inoculados con 50 larvas y al finalizar la experiencia cuando comienza a decaer el título de anticuerpos, ya que continúan siendo positivos al ELISA utilizando el antígeno ES y 45 kDa, pero no el antígeno correspondiente a 53 kDa.

Por los resultados obtenidos en este estudio experimental, se puede concluir que los antígenos purificados demostraron ser de utilidad para el desarrollo de un sistema de diagnóstico inmunológico que contemple el uso de componentes antigénicos de la banda de 45 kDa en forma conjunta con la correspondiente a 53 kDa, como candidatos para la producción de antígenos recombinantes que reemplacen el uso del producto de E/S total.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico considerando cada uno de los antígenos (45 kDa, 53 kDa y E/S) en los grupos de ratones según grupo de inóculo (50 y 500 larvas infectivas).

3.3.3.1 Grupo: ratones inoculados con 50 larvas:

Tabla 8: Se muestra la cantidad de resultados analizados del ELISA con el suero de ratones inoculados con 50 larvas, desde el día 0 al 316 frente a cada antígeno (E/S, 45 kDa y 53 kDa).

Antígeno	Válido		Perdidos	
	N	%	N	%
45 kDa	119	99,2	1	0,8
53 kDa	119	99,2	1	0,8
ES	116	96,7	4	3,3

Nota: -Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

3.3.3.1.a) Resultados al ELISA desde el día 0 a 316 pi para cada antígeno

- Banda de 45 kDa: En la figura 6 se muestran los resultados del enzimoimmunoensayo utilizando como antígeno el eluato correspondiente a la banda de 45kDa y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. En el análisis de la mediana resultaron positivos (RP% \geq 20) desde el día 49 hasta el día 316 pi inclusive.

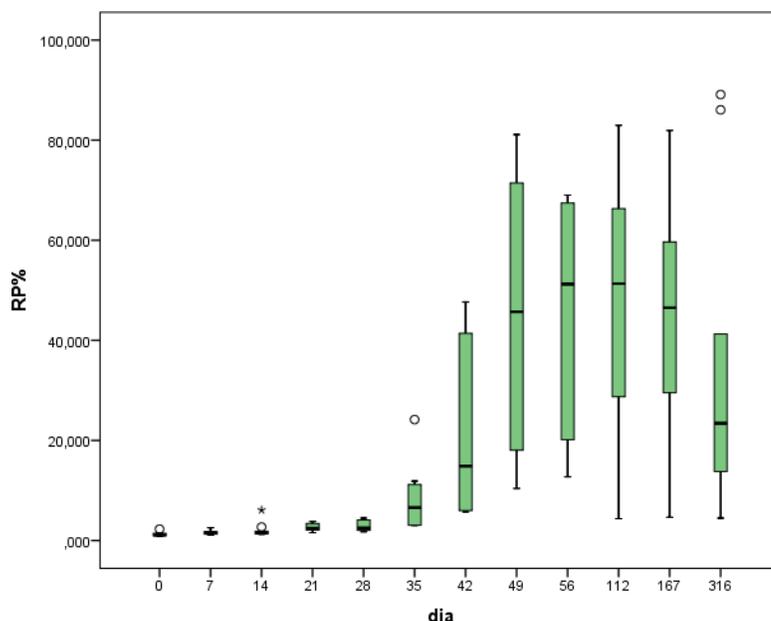


Figura 7: Blox plot de RP% del Elisa por día pi. con eluato correspondiente a la banda de 45 kDa, frente al suero de ratones inoculados con 50 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

-Banda de 53 kDa: En la figura 7 se observan los resultados del enzimoimmunoensayo utilizando como antígeno el eluato correspondiente a la banda de 53 kDa y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. En el análisis de la mediana resultaron positivos (RP%>20) desde el día 49 hasta el día 167 pi inclusive.

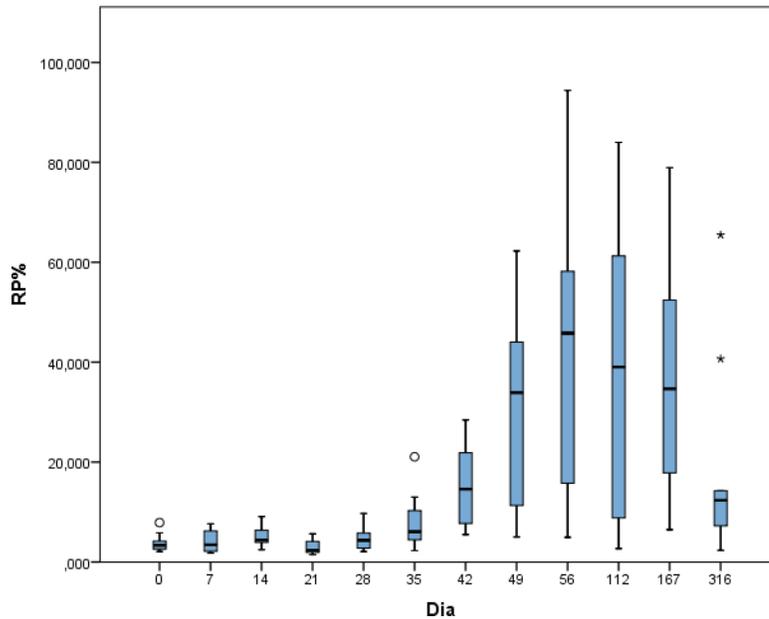


Figura 8: Blox plot de RP% del Elisa por día pi. con eluato correspondiente a la banda de 53 kDa, frente al suero de ratones inoculados con 50 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

-Producto E/S total: En la figura 8 se muestran los resultados del enzimoimmunoensayo utilizando como antígeno el producto E/S y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. A través del análisis de la mediana resultaron positivos (RP% > 20) a partir del día 35 hasta el día 316 pi. inclusive.

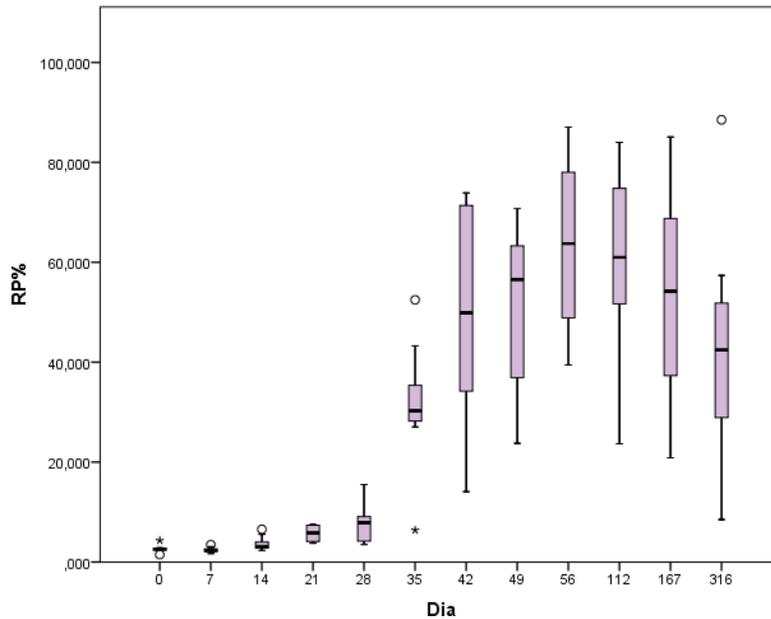


Figura 9: Box plot de RP% del Elisa por día pi. con antígeno E/S, frente al suero de ratones inoculados con 50 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

Los dos gráficos siguientes (Figuras 9 y 10) muestran los resultados del ELISA realizado con el suero de los ratones inoculados con 50 larvas frente a los tres antígenos desde el día 0 al 316 pi.

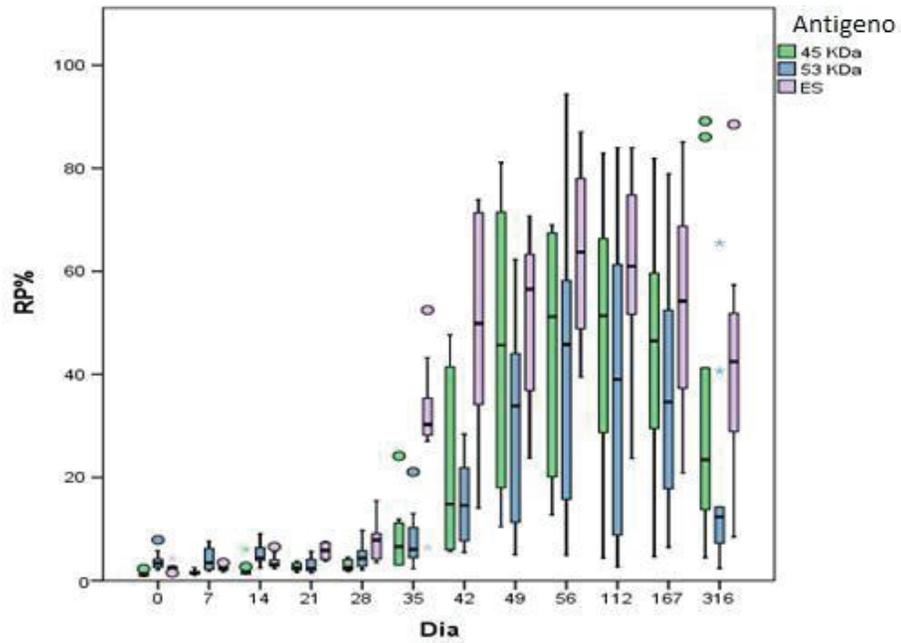


Figura 10 : Box plot de RP% del Elisa por día pi. con los antígenos de 45 kDa, 53 kDa y E/S, empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

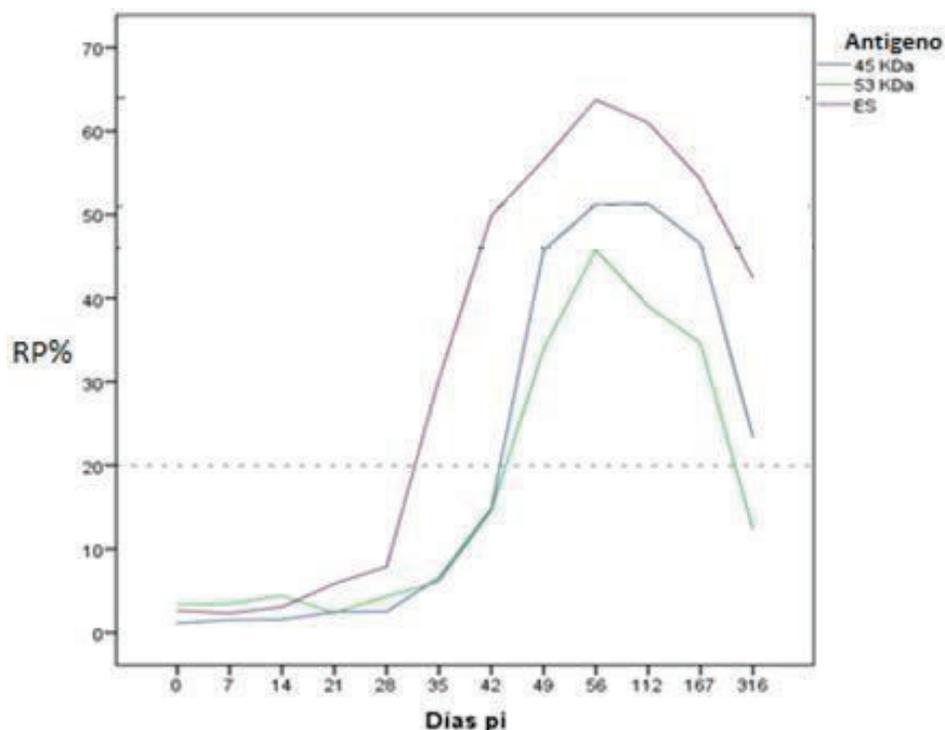


Figura 11: Resultados del Elisa, mediana de RP% de 45 kDa, 53 kDa y E/S, empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas. Se indican en líneas punteadas RP% =20.

3.3.3.1.b) Resultados del análisis estadístico de las RP% el día 49 pi.

-Antígenos 45 kDa, 53 kDa y E/S

Los resultados del análisis (Figura 12, Tablas 9,10 y 11) indicarían que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las RP% de los tres antígenos ($p > 0,05$), el día 49pi.

Tabla 9: Cantidad de casos analizados el día 49 pi, de cada antígeno (45 kDa, 53 kDa y ES) empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas.

Antígeno	Válido		Perdidos	
	N	%	N	%
45 kDa	10	100	0	0
53 kDa	10	100	0	0
ES	9	90	1	1

Nota: -Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Tabla 10: Estadísticos descriptivos obtenidos del ELISA con el suero de ratones inoculados con 50 larvas el día 49 pi., con los tres antígenos (E/S, 45 kDa y 53 kDa).

Estadísticos Descriptivos	Antígeno		
	45 kDa	53kDa	E/S
Media	44	29,7	52
Límite inferior*	24,4	16,1	39,2
Límite superior*	63,6	43,3	64,7
Mediana	45,7	33,9	56,5
Desviación estándar	27,4	19,1	16,6
Mínimo	10,4	5	23,8
Máximo	81,1	62,3	70,8
Rango	70,7	57,3	47

*95% de intervalo de confianza de la media

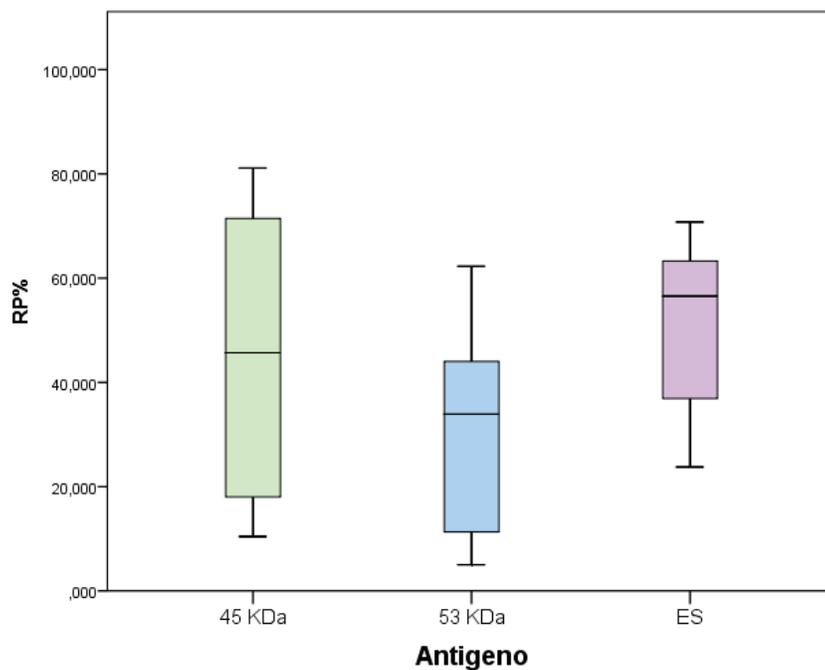


Figura 12: Blox plot de RP% resultados del Elisa el día 49 pi para cada antígeno, con suero de ratones inoculados con 50 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

Tabla 11: Se muestran los resultados del análisis estadístico mediante el Test de Kruskal-Wallis, donde se compara la RP% de los antígenos 45 kDa, 53 kDa y E/S el día 49 post inoculación, empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas.

Antígeno	N	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintótica
45 kDa	10			
53 kDa	10	4,596	2	0,1
ES	9			

Nota: -Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Tabla 12: Se muestran los resultados del análisis estadístico mediante el Test de Kruskal-Wallis, de donde se compara la RP% de los antígenos 45 kDa, 53 kDa y E/S el día 42 post inoculación, empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas.

Antígeno	N	Chi-cuadrado	gl	Sig. Asintótica
45 kDa	10			
53 kDa	10	10,4	2	0,006
ES	9			

Nota: -Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Tabla 13: Se muestran los resultados del análisis estadístico (test de Mann Whitney) de las comparaciones de RP% de 45 kDa vsES; 53 kDa vs ES y 45 kDa vs53kDa, empleando el suero de ratones inoculados con 50 larvas del día 42 pi.

Antígeno	N	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
45 kDa	10	19	0,019
ES	10		
53 kDa	10	5	0,001
ES	10		
45 kDa	10	46	0,762
53 kDa	10		

Los resultados del análisis indican que hay diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las RP% del antígeno de 45 kDa y 53 kDa frente al E/S ($p < 0.05$) pero no cuando se comparan las RP% del antígeno de 53 kDa y 45 kDa ($p > 0.05$), el día 42 pi.

3.3.3.2 Grupo: Ratones inoculados con 500 larvas:

Tabla 14: Resultados analizados del ELISA con el suero de ratones inoculados con 500 larvas, desde el día 0 al 316 frente a cada antígeno (E/S, 45 kDa y 53 kDa).

Antígeno	Válido		Perdidos	
	N	%	N	%
45 kDa	103	85,8	17	14,2
53 kDa	103	85,8	17	14,2
ES	99	86,7	21	13,3

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

3.3.3.2.a) Resultados al ELISA desde el día 0 a 316 pi para cada antígeno

-Banda de 45 kDa: En la figura 13 se muestran los resultados del enzimoimmunoensayo utilizando como antígeno el eluato correspondiente a la banda de 45 kDa y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. A través del análisis de la mediana resultaron positivos (RP% \geq a 20) desde el día 35 pi hasta el día 316 pi inclusive.

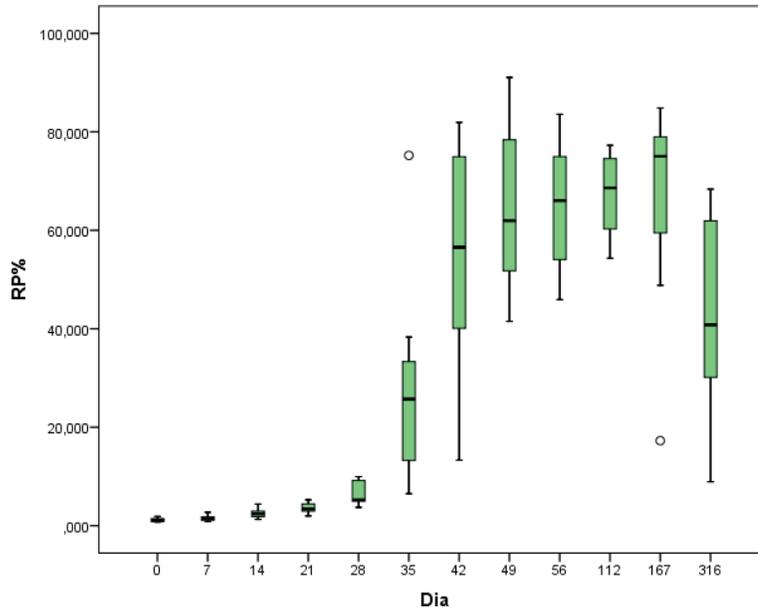


Figura 13: Blox plot de RP% del Elisa con suero de ratones inoculados con 500 larvas, por día pi., con eluato correspondiente a la banda de 45 kDa. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

-Banda de 53 kDa: La figura 14 muestra los resultados del ensayo de inmunoenzimología utilizando como antígeno el eluato correspondiente a la banda de 53 kDa y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. A través del análisis de la mediana resultaron positivos (RP% > 20) desde el día 35 pi. hasta el día 167 pi inclusive.

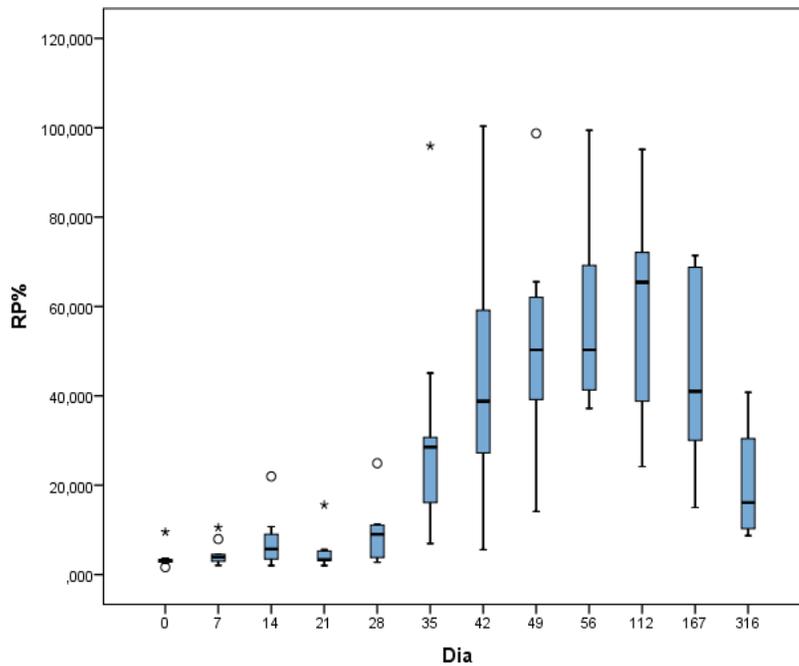


Figura 14: Blox plot de RP% del Elisa con suero de ratones inoculados con 500 larvas, por día pi., con eluato correspondiente a la banda de 53 kDa. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

-Producto E/S total: En la figura 15 se muestran los resultados del enzimoimmunoensayo utilizando como antígeno el producto de E/S y los sueros de los ratones desde el día 0 al 316 pi. A través del análisis de la mediana resultaron positivos ($R/P > 20$) desde el día 28 hasta el día 316 pi. inclusive.

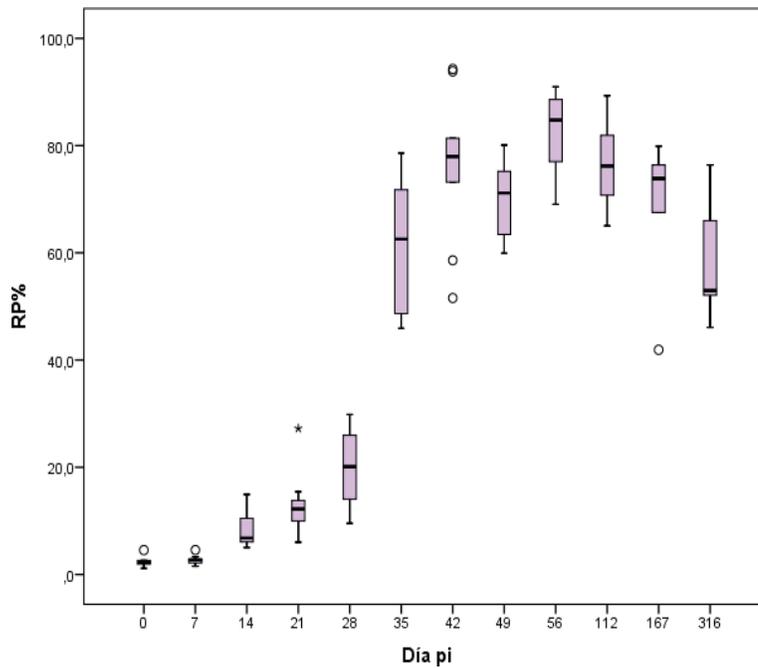


Figura 15: Blox plot de RP% del Elisa con suero de ratones inoculados con 500 larvas, por día pi., con antígeno E/S Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

Los dos gráficos siguientes (Figuras 18 y 19) muestran los resultados del ELISA realizado con el suero de los ratones inoculados con 500 larvas frente a los tres antígenos desde el día 0 al 316 pi.

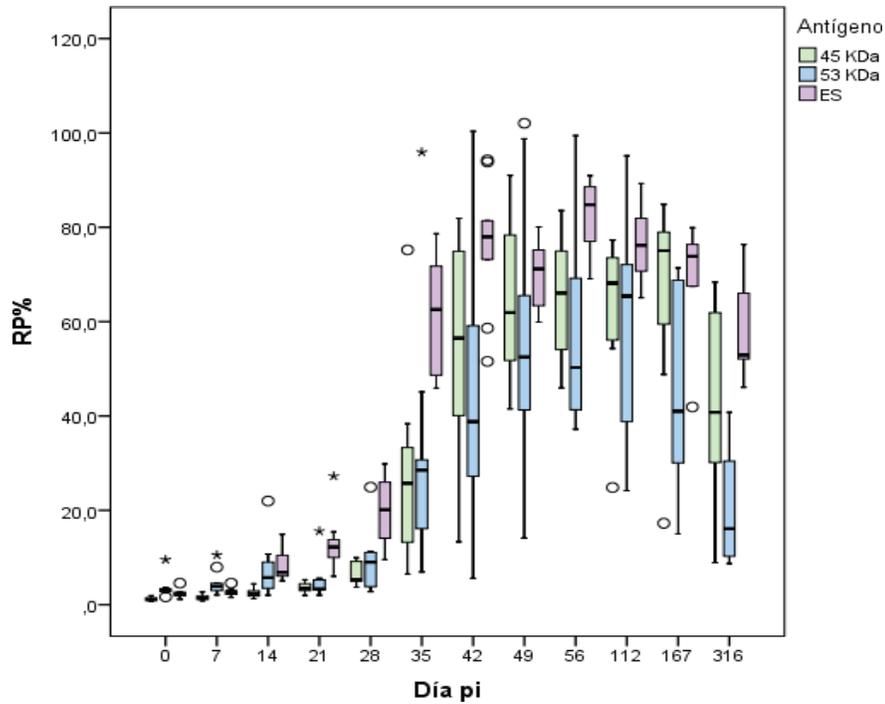


Figura 16: Box plot de RP% del Elisa, con suero de ratones inoculados con 500 larvas, desde el día 0 al 316 pi., con los tres antígenos. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

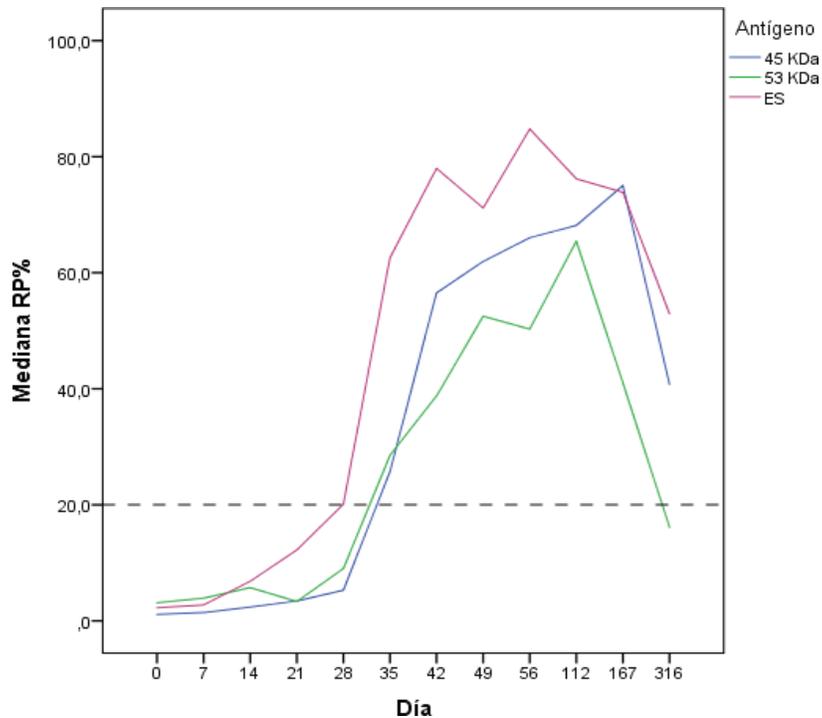


Figura 17: Resultados del Elisa, mediana de RP%, con suero de ratones inoculados con 500 larvas. Se indica con una línea punteada RP% =20.

3.3.3.2.b) Resultados del análisis estadístico de las RP% el día 35pi.

Antígenos 45 kDa 53 kDa y E/S

Tabla 15: Cantidad de casos analizados el día 35 pi de cada antígeno (45 kDa, 53 kDa y ES).

Antígeno	Valido		Perdidos	
	N	%	N	%
45 kDa	8	80	2	20
53 kDa	9	90	1	10
ES	8	80	2	20

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.
 -Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Tabla 16: Estadísticos descriptivos (RP%) obtenidos del ELISA con el suero de ratones inoculados con 500 larvas el día 35 pi., con los tres antígenos (E/S, 45 kDa y 53 kDa).

Estadísticos Descriptivos	Antígeno		
	45 kDa	53kDa	E/S
Media	28,28	31,35	61,31
Límite inferior*	10,27	10,66	50,63
Límite superior*	46,3	52,03	71,99
Mediana	25,72	28,53	62,57
Varianza	464,42	723,93	163,2
Desviación estándar	21,55	26,91	12,77
Mínimo	6,5	6,96	45,9
Máximo	75,22	95,92	78,62
Rango	68,72	88,96	32,71

95% de intervalo de confianza de la media

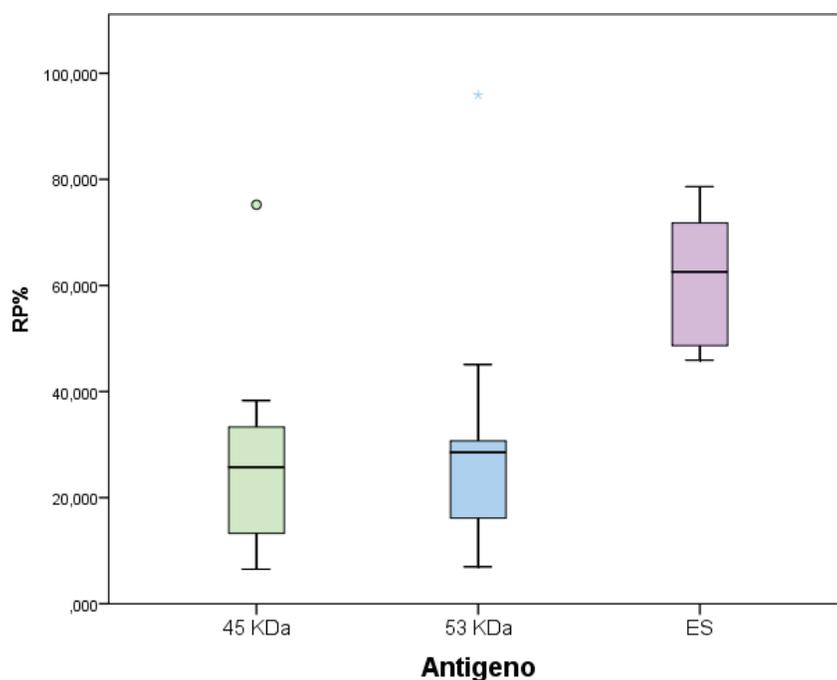


Figura 18: Blox plot de RP% resultados del Elisa el día 35 pi para cada antígeno, con suero de ratones inoculados con 500 larvas. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

Tabla 17: En la siguiente tabla se muestran los resultados del análisis estadístico, utilizando el test de Kruskal-Wallis, donde se comparan la RP% de los antígenos 45 kDa, 53 kDa y E/S en el día 35 post inoculación.

Antígeno	N	Chi-cuadrado	Gl	Sig. Asintótica
45 kDa	8			
53 kDa	9	10,032	2	0,007
ES	8			

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los resultados del análisis indicarían que hay diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las medianas de RP% de los tres antígenos el día 35 pi ($p < 0.05$) en los ratones inoculados con 500 larvas.

Tabla 18. Se muestran los resultados del análisis estadístico (test de Mann Whitney) de las comparaciones de RP% de 45 kDa vs ES; 53 kDa vs ES y 45 kDa vs 53kDa, empleando el suero de ratones inoculados con 500 larvas.

Antígeno	N	U de Mann-Whitney	Sig. asintótica (bilateral)
45 kDa	8		
ES	8	6	0,006
53 kDa	9		
ES	8	8	0,007
45 kDa	8		
53 kDa	9	31	0,63

Nota: -Un ratón macho inoculado con 500 larvas murió el día 21 de la experiencia.

-Los datos de RP% que no contaban con duplicado no se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los resultados del análisis indican que hay diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las RP% del antígeno de 45 kDa y 53 kDa frente al E/S ($p < 0.05$) pero no cuando se comparan las RP% del antígeno de 53 kDa y 45 kDa ($p > 0.05$), el día 35 pi.

3.3.3.3 Grupo control:

Los sueros de este grupo de ratones resultaron no reactivos ($RP\% < a 20$) al enzimoimmunoensayo desde el día 0 al 316 post inoculación frente a los antígenos de E/S; 45 kDa y 53 kDa (Figuras 21 y 22).

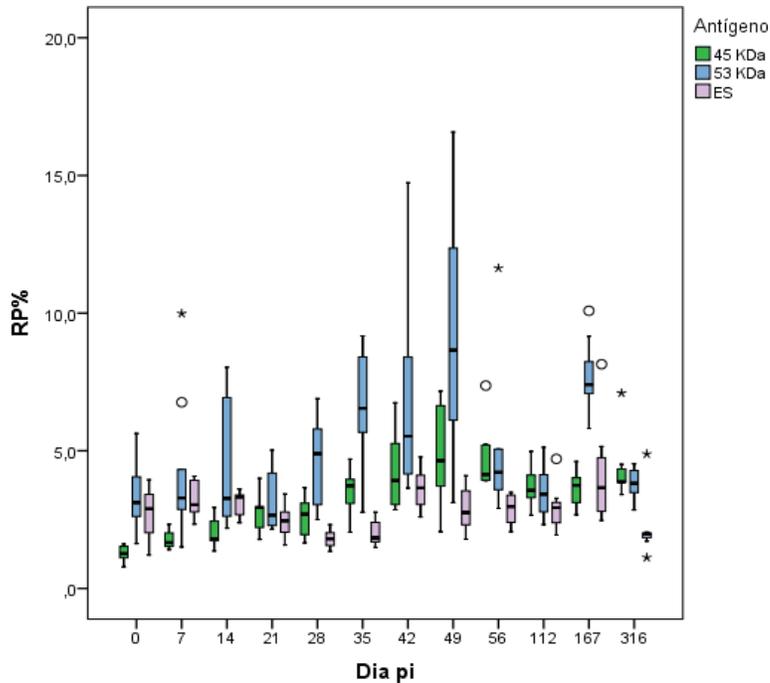


Figura 19: Blox plot de RP%. del ELISA, con el suero de los ratones sin inocular frente a los tres antígenos (45 kDa, 53 kDa y E/S) desde el día 0 al 316 pi. Dentro de cada caja se señala con una línea en color negro la mediana de la relación de positividad porcentual.

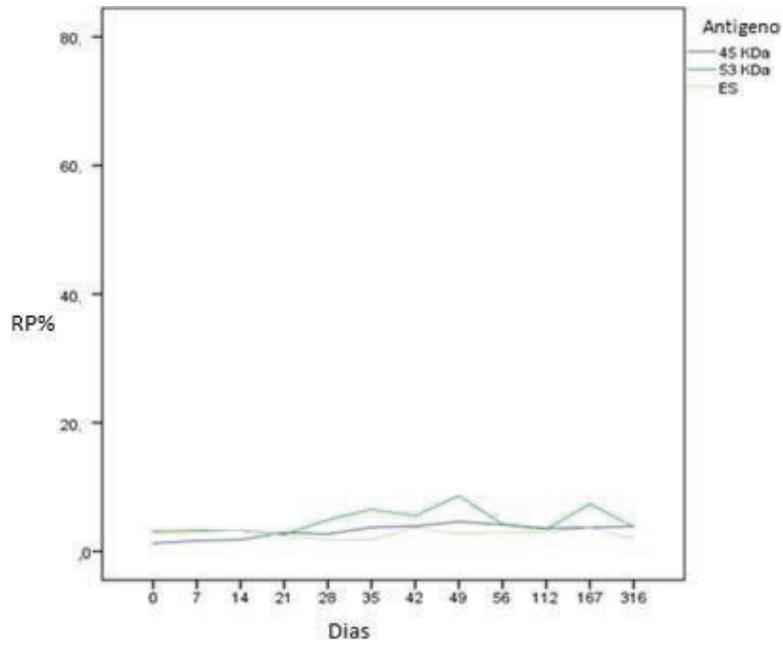


Figura 20: Resultados del ELISA, con el suero de los ratones sin inocular. Mediana de RP% desde el día 0 al 316 pi.

Conclusiones

En nuestro país los brotes de trichinellosis se producen generalmente por el consumo de carne y/o productos de cerdos. Frecuentemente, durante la investigación de los brotes es difícil identificar el alimento implicado. En estos casos, es relevante la utilización de métodos inmunológicos para la confirmación etiológica de los casos sospechosos. Las técnicas serológicas empleadas en la actualidad implican la utilización de sistemas de producción antigénica que contemplan el uso de animales para su elaboración. Además, la variabilidad del producto de E/S obtenido del cultivo de larvas musculares en los diferentes lotes antigénicos fueron los principales motivadores del presente estudio.

Los métodos utilizados en este trabajo permitieron la purificación de las bandas antigénicas específicas de 45 kDa y 53 kDa y su evaluación de la respuesta inmunológica mediante la técnica de ELISA en ratones experimentalmente infectados con *T. spiralis*. Los resultados derivados del presente estudio permiten arribar a las siguientes conclusiones sobre el desempeño de los antígenos estudiados en la detección de la infección con *T. spiralis* en ratones:

- El antígeno E/S total y los antígenos purificados no presentan diferencias en la detección de infección entre los hospederos de ambos sexos.
- Los antígenos purificados de 45 kDa y 53 kDa permiten la detección serológica de la infección, demostrando ser de utilidad para el serodiagnóstico, en el modelo experimental utilizado.
- Los tres antígenos estudiados permiten una detección más temprana en hospederos infectados con una alta carga larvaria que los infectados con una carga larvaria diez veces inferior.
- El antígeno del E/S total posee mejor desempeño en la detección serológica que los antígenos purificados.
- No se observa diferencia entre los antígenos purificados de 45kDa y 53kDa en la detección serológica, tanto en infecciones de alta como baja carga larvaria.
- Los antígenos purificados pueden proponerse para un futuro desarrollo de métodos de diagnóstico inmunológico mediante la detección de antígenos recombinantes basados en las proteínas de los productos de 45kDa y 53 kDa.

Si bien hay diversos trabajos sobre el estudio y desarrollo de antígenos recombinantes, no existe en la actualidad una técnica serológica para el diagnóstico de la trichinellosis que incluya el uso de este tipo de antígenos.

Por lo expuesto, los resultados obtenidos podrían ser un punto de partida para estudiar los componentes antigénicos de dichas bandas y a través de la utilización de la tecnología de ADN recombinante desarrollar antígenos recombinantes específicos.

Referencias Bibliográficas

- (1) Zarlenga, D., Thompson, P., & Pozio, E. (2020). *Trichinella* species and genotypes. *Research in veterinary science*, 133, 289–296.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.012F>
- (2) Krivokapich, S.J (2014) Identificación, distribución geográfica y transmisión de *Trichinella*. Temas de Zoonosis VI. Capítulo48. Asociación Argentina de Zoonosis
- (3) Sharma, R., Thompson, P. C., Hoberg, E. P., Brad Scandrett, W., Konecsni, K., Harms, N. J., Kukka, P. M., Jung, T. S., Elkin, B., Mulders, R., Larter, N. C., Branigan, M., Pongracz, J., Wagner, B., Kafle, P., Lobanov, V. A., Rosenthal, B. M., & Jenkins, E. J. (2020). Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *International journal for parasitology*, 50(4), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.01.003>
- (4) Ministerio de Salud de la Nación (2021). Guía para la Prevención y el Control de la Triquinosis/Trichinellosis en Argentina [internet] Buenos Aires. Disponible en www.msal.gov.ar Último acceso 28 de marzo de 2023.
- (5) Krivokapich, S. J., Prous, C. L., Gatti, G. M., & Saldía, L. (2015). First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical region. *Veterinary parasitology*, 208(3-4), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.001>
- (6) Krivokapich, S. J., Gatti, G. M., Gonzalez Prous, C. L., Degese, M. F., Arbusti, P. A., Ayesa, G. E., Bello, G. V., & Salomón, M. C. (2019). Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. *Parasitology international*, 71, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.010>
- (7) Krivokapich S.J, Pozio E, Gatti GM, Prous CL, Ribicich M, Marucci G, La Rosa G, Confalonieri V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int J Parasitol*. Sep;42(10):903-10. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.07.009. Epub 2012 Aug 17. PMID: 22921601.
- (8) Campbell WC. (1983). *Trichinella and trichinellosis*. Historical Introduction. pp. 1-30 Merck Institute for Therapeutic Research, Rahway, USA

- (9) Murrell, K. D., & Pozio, E. (2011). Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerging infectious diseases*, 17(12), 2194–2202. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110896>
- (10) Ribicich, M., Gamble, H. R., Rosa, A., Bolpe, J., & Franco, A. (2005). Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Veterinary parasitology*, 132(1-2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.042>
- (11) Capó, V., & Despommier, D. D. (1996). Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clinical microbiology reviews*, 9(1), 47–54. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.1.47>
- (12) Gottstein B., Pozio E., Nockler K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:127-145.
- (13) Ambrosioni, J., Cecchini, D., Castellaro, P., Biscione, F., Lloveras, S., & Orduna, T. (2006). Triquinosis: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Estudio retrospectivo a 10 años (1994-2003) [Trichinellosis: epidemiological, clinical and laboratory aspects. A retrospective study (1994-2003)]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 24(7), 440–444. <https://doi.org/10.1157/13091782>
- (14) Dupouy-Camet, J., Kociecka, W., Bruschi, F., Bolas-Fernandez, F., & Pozio, E. (2002). Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 3(8), 1117–1130. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.8.1117>
- (15) Bruschi, F., Gómez-Morales, M. A., & Hill, D. E. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *Food and waterborne parasitology*, 14, e00032. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.e00032>
- (16) Boireau P, Bruschi F, Dupouy-Camet J, Gamble H.R., Nöckler K, Kapel C.M.O. ,Murrell K.D, Pozio E (2007) FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis .Published by: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) World Health Organization (WHO) World Organisation for Animal Health (OIE) http://www.trichinellosis.org/uploads/FAO-WHO-OIE_Guidelines.pdf

- (17) Yang, Y., Cai, Y. N., Tong, M. W., Sun, N., Xuan, Y. H., Kang, Y. J., Vallée, I., Boireau, P., Cheng, S. P., & Liu, M. Y. (2016). Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 2, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.11.005>
- (18). Kagan I. G. & Norman L. G. (1970). The serology of trichinosis. In: *Trichinosis in Man and Animals* (Edited by Gould S. E.) pp. 222-268. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- (19) Morakote, N., Khamboonruang, C., Siriprasert, V., Suphawitayanukul, S., Marcanantachoti, S., & Thamasonthi, W. (1991). The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human trichinosis. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 42(3), 172–174.
- (20) Jackson G. J. (1959). Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. *The Journal of infectious diseases*, 105, 97–117. <https://doi.org/10.1093/infdis/105.2.97>.
- (21) Y. Takahashi (1997) Antigens of trichinell spiralis. *Prasitology today*.vol 13 no 3
- (22) Nagano, I., Wu, Z., & Takahashi, Y. (2009). Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitology research*, 104(2), 197–207. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1248-1>
- (23) Ortega-Pierres, M. G., Yopez-Mulia, L., Homan, W., Gamble, H. R., Lim, P. L., Takahashi, Y., Wassom, D. I., & Appleton, J. A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite immunology*, 18(6), 273–284. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-103.x>
- (24) Zarlenga, D. S., & Gamble, H. R. (1990). Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Molecular and biochemical parasitology*, 42(2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90159-j](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90159-j)
- (25) Jung, D., Teifke, J. P., Karger, A., Michael, K., Venz, S., Wittmann, W., Kindermann, K., Nöckler, K., & Mundt, E. (2007). Evaluation of baculovirus-derived recombinant 53-kDa

- protein of *Trichinella spiralis* for detection of *Trichinella*-specific antibodies in domestic pigs by ELISA. *Parasitology research*, *100*(3), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0296-7>
- (26) Su, X. Z., Prestwood, A. K., & McGraw, R. A. (1991). Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. *Molecular and biochemical parasitology*, *45*(2), 331–336. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90101-b](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90101-b)
- (27) Goyal, P. K., Wheatcroft, J., & Wakelin, D. (2002). Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitology international*, *51*(1), 91–98. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(02\)00002-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(02)00002-8)
- (28) Bolás-Fernandez, F., & Corral Bezara, L. D. (2006). TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in veterinary science*, *81*(3), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.01.002>
- (29) Despommier, D. D., Gold, A. M., Buck, S. W., Capo, V., & Silberstein, D. (1990). *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Experimental parasitology*, *71*(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90005-w](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90005-w)
- (30) Despommier D. D. (1998). How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitology today (Personal ed.)*, *14*(8), 318–323. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(98\)01287-3](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(98)01287-3)
- (31) Tang, B., Liu, M., Wang, L., Yu, S., Shi, H., Boireau, P., ... & Liu, X. (2015). Characterisation of a high-frequency gene encoding a strongly antigenic cystatin-like protein from *Trichinella spiralis* at its early invasion stage. *Parasites & vectors*, *8*, 1-12.
- (32) Liu, Y., Xu, N., Li, Y., Tang, B., Yang, H., Gao, W., ... & Zhou, Y. (2021). Recombinant cystatin-like protein-based competition ELISA for *Trichinella spiralis* antibody test in multihost sera. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(8), e0009723.
- (33) Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626-638.

(34) Ribicich, M., Miguez, M., Franco,A., Basso, N., Gamble, R.H., Santillan, S., Molina,V. and Guanera, E. (2000) Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis. The Pig Journal, 46, 24-3