



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO

**DIAGNÓSTICO DE
CISTICERCOSIS PORCINA
EMPLEANDO LA PROTEÍNA 14-3-3
DE *Taenia solium* COMO
ANTÍGENO RECOMBINANTE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA**

MBLGO. ELISA DEL ROCÍO RONCAL RÍOS

LIMA – PERÚ

2016

ASESOR (A):

PhD. Patricia Sheen Cortavarria

CO ASESOR (A):

PhD. Mónica Pajuelo Travezaño

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú, contrato 181-FINCYT-IB-2013

Agradezco a Dios, a mis ángeles Chelita y Manolo por haberme acompañado en todo momento, por cuidarme siempre, darme la fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

A mis padres Graciela y Franklin por apoyarme siempre, por los valores inculcados y por haberme permitido tener una excelente educación, siendo ellos mi ejemplo a seguir.

A Jimena, mi hermanita por ser mi compañera de travesuras, mi roommate y mi mejor crítica en cada cosa que hago.

A la Dra Patricia Sheen, Dr. Mirko Zimic y sobre todo a Mónica Pajuelo por su apoyo incondicional en cada una de las etapas de esta tesis, por su confianza y haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta tesis. Gracias por haber compartido conmigo sus conocimientos y amistad.

A mis amigos de corazón, por confiar en mí y haber hecho mi etapa de tesista un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	
2.1 Planteamiento del problema	3
2.2 Marco teórico	
2.2.1 Cisticercosis porcina	4
2.2.2 Diagnóstico de cisticercosis porcina	6
2.2.3 Proteína 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta	8
2.2.4 Expresión en procariontes y eucariontes (células de insectos: <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) - Baculovirus	11
2.3 Justificación del estudio	12
2.4 Hipótesis	13
2.5 Objetivos	14
III. METODOLOGÍA	
3.1 Componente I: Desarrollo bioinformático	16
3.2 Componente II: Clonamiento de genes	17
3.3 Componente III: Expresión de proteínas	21
3.4 Componente IV: ELISA convencional para diagnóstico	
Estandarización	24
Estimación se sensibilidad y especificidad	27
Análisis estadístico	28
Consideraciones éticas	30

IV. RESULTADOS	
4.1 Componente I: Desarrollo bioinformático	31
Diseño de cebadores	31
Identificación de sitios N y O glicosilación	32
4.2 Componente II: Clonamiento de genes	33
4.3 Componente III: Expresión de proteínas 14-3-3	34
4.4 Componente IV: Diagnóstico de cisticercosis porcina	37
4.4.1 Estandarización de los parámetros de ELISA	37
4.4.2 Evaluación de sensibilidad y especificidad	49
V. DISCUSION	61
VI. CONCLUSIONES	68
VII. RECOMENDACIONES	68
VIII. LIMITANTES	69
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	70
X. ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Secuencia de los cebadores diseñados para los genes seleccionados
- Tabla 2.** Parámetros estandarizados en ELISA convencional para las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta, expresadas en *E.coli* y en células de insectos-Baculovirus
- Tabla 3.** Punto de corte utilizando el porcentaje de positividad e índice de Youden estimado para cada antígeno evaluado
- Tabla 4.** Puntos de corte obtenidos a partir de controles negativos
- Tabla 5.** Sensibilidad y especificidad de 14-3-3 épsilon y zeta expresadas en *E. coli* y en CIB según el porcentaje de positividad y NC-Cut off
- Tabla 6.** Comparación de las sensibilidades y especificidades según el sistema de expresión
- Tabla 7.** Comparación de las sensibilidades y especificidades según el punto de corte

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Componentes del procedimiento experimental
- Figura 2.** Flujograma de obtención de báculo recombinante y expresión de proteínas en el sistema Baculovirus
- Figura 3.** Esquema de Transfección en placa de seis pozos
- Figura 4.** Esquema para estandarización de ELISA convencional en placa de 96 pozos
- Figura 5.** Esquema de distribución de sueros individuales en placas
- Figura 6.** Sitios de N-glicosilación y O-glicosilación en 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta
- Figura 7.** Evaluación de la clonación del gen 14-3-3 épsilon y zeta en pFastBac HTA mediante PCR colonia
- Figura 8.** Evaluación de la clonación del gen 14-3-3 épsilon y zeta en pFastBac HTA mediante digestión
- Figura 9.** Proteínas 14-3-3 épsilon y zeta en *E. coli* en 15% de SDS-PAGE
- Figura 10.** Verificación de la presencia de 14-3-3 épsilon y zeta mediante Western Blot
- Figura 11.** Primera etapa de evaluación de 14-3-3 épsilon expresado en *E. coli*
- Figura 12.** Segunda etapa de evaluación de 14-3-3 épsilon expresado en *E. coli*
- Figura 13.** Primera etapa de evaluación de 14-3-3 zeta expresado en *E. coli*
- Figura 14.** Segunda etapa de evaluación de 14-3-3 zeta expresado en *E. coli*
- Figura 15.** Evaluación de 14-3-3 épsilon expresada en CIB
- Figura 16.** Evaluación de 14-3-3 zeta expresada en CIB

- Figura 17.** Evaluación de las diluciones de conjugado usando 14-3-3 épsilon expresada en *E. coli* en las mejores condiciones obtenidas en etapa I y II
- Figura 18.** Evaluación de las diluciones de conjugado usando 14-3-3 zeta expresada en *E. coli* en las mejores condiciones obtenidas en etapa I y II
- Figura 19.** Evaluación de las diluciones de conjugado en estandarización de 14-3-3 épsilon expresada en CIB, empleando 2.5 ng/μl de Ag, 1/100 de suero
- Figura 20.** Evaluación de las diluciones de conjugado en estandarización de 14-3-3 zeta expresada en CIB, empleando 5 ng/μl de Ag, 1/100 de suero
- Figura 21.** Dispersión del porcentaje de positividad de la prueba de ELISA usando la proteína 14-3-3 épsilon
- Figura 22.** Dispersión del porcentaje de positividad de la prueba de ELISA usando la proteína 14-3-3 zeta
- Figura 23.** Curvas ROC de las proteínas 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta expresadas en *E. coli* y en CIB

RESUMEN

El inmunodiagnóstico desarrollado para cisticercosis porcina producida por *Taenia solium* es el Western Blot de glicoproteínas. El Western Blot presenta limitaciones ya que depende del suministro de cerdos infectados y obtención del antígeno glicoproteico, una posible solución es la producción de proteínas recombinantes que puedan ser usados como antígenos. Las proteínas 14-3-3 que están involucradas en una amplia gama de actividades biológicas, tienen actividad antigénica y han sido caracterizadas como posibles candidatas a vacunas para *Schistosoma* spp. y *Echinococcus* spp. En este estudio se evaluaron a las proteínas 14-3-3 zeta (ζ) y épsilon (ϵ) de *T. solium* expresadas en *E. coli* y en células de insecto-Baculovirus (CIB) en el diagnóstico de cisticercosis porcina. El sistema CIB permite generar proteínas con modificaciones post-traduccionales. El sistema bacteriano fue construido previamente y consistió en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS conteniendo pET28a-14-3-3 ζ y ϵ . El sistema CIB fue construido usando el vector pFastBac HTA, los genes de las proteínas 14-3-3 ζ y ϵ fueron transferidas al báculo de baculovirus mediante recombinación homóloga, usados para infectar a las células Sf9 y expresar las proteínas. En el diagnóstico de cisticercosis porcina, las proteínas 14-3-3 ζ y ϵ expresadas en *E. coli* obtuvieron sensibilidades/especificidades de 85.42/65.90% y 89.58/61.36% respectivamente, mientras que las proteínas 14-3-3 ζ y ϵ expresadas en CIB obtuvieron sensibilidades/especificidades de 91.67/97.93% y 91.67/93.18%, respectivamente. En este estudio se mostró que la proteína 14-3-3 ζ expresada en CIB constituye un buen candidato para el diagnóstico de cisticercosis porcina.

Palabras clave: cisticercosis porcina, proteína 14-3-3, inmunodiagnóstico cisticercosis, ELISA.

ABSTRACT

The immunodiagnostic developed for swine cysticercosis caused by the pork tapeworm is the Glycoprotein Western Blot. Western blotting has limitations since it depends on the supply of infected pigs and on obtaining glycoprotein antigen. The production of recombinant proteins that can be used as antigens appears as a possible solution. The 14-3-3 proteins, which are involved in a wide range of biological activities, have antigenic activity and have been characterized as potential vaccine candidates for *Schistosoma spp.* and *Echinococcus spp.* In this study the proteins 14-3-3 zeta (z) and epsilon (ε) of *T. solium* expressed in *E. coli* and baculovirus insect cells (BIC) in the diagnosis of neurocysticercosis swine were evaluated. The BIC system allows to generate proteins with post-translational modifications. The bacterial system was previously constructed and consisted of *E. coli cells* BL21 (DE3) pLys containing pET28a-14-3-3 z and ε. The eukaryotic system was constructed using the vector pFastBac HTA, genes of proteins 14-3-3 z y ε were transferred to the baculovirus bacmid by homologous recombination and they were used to infect Sf9 cells and to express proteins. In the diagnosis of swine cysticercosis, 14-3-3 proteins z and ε expressed in *E. coli* reached sensitivities / specificities of 85.42/61.36% y 89.58/61.36% respectively, meanwhile 14-3-3 proteins z y ε expressed in BIC obtained sensitivities / specificities of 91.67/97.93% y 91.67/93.18%, respectively. This study showed that the 14-3-3 z protein expressed in BIC is a good candidate for the diagnosis of porcine cysticercosis.

Keywords: porcine cysticercosis, 14-3-3, immunodiagnostic cysticercosis, ELISA.

I. INTRODUCCION

La cisticercosis porcina es una parasitosis causada por la forma larvaria (cisticerco) de *Taenia solium* (1). Esta parasitosis constituye un importante problema de salud pública en lugares donde la crianza de cerdos se realiza en malas condiciones sanitarias e higiénicas. Se presenta en algunos países de Asia, África y América Latina; entre ellos: México, Brasil y Perú (2, 3).

La cisticercosis se produce cuando el cerdo se alimenta de heces humanas con huevos viables del parásito adulto de *T. solium*. Las oncósferas liberadas de su envoltura por acción de los jugos digestivos, se adhieren y penetran a la mucosa intestinal, alcanzan la circulación y se dispersan por todo el organismo (4, 5). Las oncósferas se desarrollan en sus tejidos hasta formar un cisticerco (4). La infección en el cerdo perjudica a los criadores, ya que afecta la carne y la venta de la misma. Los programas de control basados en el tratamiento de cisticercosis humana no son efectivos por lo que el humano se infecta comiendo la carne del animal infectado, cerrando el ciclo de vida (6, 7).

La cisticercosis porcina es generalmente asintomática por lo que es diagnosticada en estados avanzados mediante la búsqueda de cisticercos: examen de lengua y el examen post mortem. Técnicas más sensibles como el Western Blot permiten detectar anticuerpos anti-cisticercosis en etapas tempranas; sin embargo no es accesible debido a su costo y complejidad. Western Blot en cisticercosis porcina es usado con fines epidemiológicos y no para tratar a los cerdos, ya que los propietarios prefieren descartar la carne con sospecha de quistes dando lugar a cuantiosas pérdidas económicas (8, 9).

Técnicas sensibles y accesibles permitirían conocer el estado epidemiológico de la cisticercosis porcina y diseñar estrategias para su control evitando que se complete el ciclo de vida de *T. solium* y sus consecuencias, teniasis y cisticercosis humana (4). La tecnología del ADN recombinante ha permitido producir proteínas usadas como antígenos para el diagnóstico de diversas enfermedades (10,11).

En el presente estudio se evaluó a las proteínas 14-3-3 zeta y épsilon recombinantes de *T. solium* en su capacidad de diagnosticar cisticercosis porcina en el inmunoensayo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta son posibles buenos candidatos a ser usados como antígenos debido a que son proteínas de secreción, participan en la respuesta inmune (10, 11 y 12) y muestran epítopes antigénicos (estudios preliminares).

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

Actualmente el diagnóstico de cisticercosis porcina se realiza mediante la inspección de la carne en búsqueda de quistes; éstos son visibles claramente a las 6 semanas. El diagnóstico basado en pruebas de detección de anticuerpos en el suero es usado únicamente con fines epidemiológicos (13,14).

Al igual que en la cisticercosis humana, el diagnóstico serológico de cisticercosis porcina se basa en las pruebas de Western Blot de glicoproteínas, sin embargo ésta técnica supone contar con un número elevado de cerdos infectados para la obtención del antígeno a partir del fluido vesicular crudo de las larvas, así como también contar con instrumentos y experiencia para la purificación de antígenos para obtener las glicoproteínas (8); del mismo modo requiere un entrenamiento en la identificación de bandas con sus respectivos pesos moleculares para evitar falsos positivos (15).

Debido a la complejidad del Western Blot y a la dificultad de obtener el antígeno, esta prueba no es usada en forma masiva para detectar a los cerdos infectados (14), por lo tanto es necesario una prueba efectiva y accesible. Las proteínas recombinantes como antígenos de diagnóstico han mostrado alta eficiencia y son cada vez más usadas (10). En la elección del sistema de expresión de las proteínas se debe tener en cuenta las modificaciones post-traduccionales que afectarían el plegamiento de las mismas (10,8).

Dada la prevalencia del parásito en zonas rurales nacionales y a las limitaciones del inmunodiagnóstico en zonas endémicas, es necesario implementar un sistema de

diagnóstico sensible y específico (11). Por ello, es preciso evaluar el diagnóstico de cisticercosis porcina empleando las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta expresadas en *E. coli* y en células de insectos – Baculovirus como antígenos recombinantes.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Cisticercosis porcina

T. solium tiene un ciclo de vida que involucra dos hospederos; los humanos y el cerdo. Los cerdos son los hospederos intermediarios del parásito alojando el estadio larvario (cisticercos). Los cerdos se infectan debido a sus hábitos coprofágicos, adquieren la infección ingiriendo heces humanas infectadas con huevos de *T. solium* (6).

El ciclo biológico del parásito ocurre principalmente en comunidades rurales dedicadas a la crianza de cerdos, donde además existen deficiencias en infraestructura sanitaria como la falta de letrinas y baños; las personas defecan en el campo y los cerdos son criados al pastoreo, alimentándose libremente en la comunidad. En el Perú, la cisticercosis representa la principal zoonosis parasitaria con seroprevalencias que alcanzan el 17% en humanos y 75% en porcinos, considerándose al país como área endémica (16, 17).

A mayor edad del cerdo, mayor tasa de cisticercosis, con un pico máximo a los 11 meses, aunque se ha demostrado que a partir de los dos meses ya se encuentran metacístodos en hígado, y de los cuatro a seis meses de edad, en músculo (18, 19). La

cisticercosis porcina significa una pérdida económica para los criadores de cerdo y también una fuente de infección para las personas, puesto que ellas se infectan consumiendo carne de cerdo infectada con cisticercosis (20, 21).

En el Perú, de acuerdo a la legislación, los campesinos están sujetos a la confiscación del animal infectado sin ningún tipo de retribución. La falta de personal capacitado para realizar las inspecciones sanitarias, la falta de seguimiento de los focos de infección, el deficiente sistema de saneamiento básico y la limitada cantidad de cortes que se pueden hacer a la carne para no estropearla; son factores predisponentes para la propagación de esta zoonosis (22,23).

El impacto económico de la cisticercosis porcina ha sido calculado en un número reducido de países, debido a la falta de información sobre la prevalencia real de la infección (24). En la sierra y selva del Perú, la crianza de cerdos es importante en la economía ya que el cerdo puede ser rápido y fácilmente convertido en efectivo. Un cerdo puede ser alimentado a costo muy bajo en comunidades pequeñas y sectores rurales, al permitirle andar suelto y buscarse la comida, de esta forma obtiene una variedad de alimentos que suplementan su dieta, incluyendo heces humanas y de otros animales (25). Al infectarse los cerdos, su precio disminuye a la mitad o la tercera parte y en ocasiones la carne es decomisada. Por lo tanto los productores buscan la comercialización informal de la carne, contribuyendo de este modo al mantenimiento de la enfermedad (23,26).

2.2.2 Diagnóstico de cisticercosis porcina

En áreas rurales donde la cisticercosis es endémica, la distribución de la carga parasitaria en los cerdos es ampliamente dispersa. Un pequeño número de cerdos está altamente infectado, mientras que una gran cantidad de cerdos, en ese mismo grupo alberga sólo un pequeño número de quistes (27). En animales fuertemente infectados, la detección de anticuerpos se da desde los 29 días post infección, mientras que en los animales ligeramente infectados estos anticuerpos son detectados entre 61 y 97 días post infección (28).

El diagnóstico de cisticercosis porcina se puede realizar *antemortem* (en pie) o *posmortem* (en el camal). El diagnóstico *antemortem* se lleva a cabo con un examen visual y con la palpación de la lengua en búsqueda de cisticercos. Con este método sólo puede ser detectado un pequeño número de animales afectados ya que muchas veces es necesaria la infección masiva para poder detectar los cisticercos en la lengua. El diagnóstico *posmortem* es luego del sacrificio del animal, se realizan cortes en los músculos y vísceras en búsqueda de cisticercos; aun cuando se realiza la inspección en forma esmerada, algunas infecciones leves llegan a pasar desapercibidas, generalmente cuando hay menos de 10 cisticercos (4).

En Sudamérica se han llevado a cabo diferentes estudios que permitieron determinar la prevalencia de la cisticercosis porcina. En Perú, un análisis serológico de cerdos del área rural realizado con el método de Western blot, mostró una seropositividad del 43%-52%. En Bolivia se halló un 38,9% de animales seropositivos con el mismo

método. En Ecuador se determinó una seroprevalencia de cisticercosis porcina del 9,01% con el método inmunoenzimático ELISA (8).

El Western Blot implica la separación de 7 glicoproteínas (50, 42-39, 24, 21, 18, 14, y 13 kDa) por SDS-PAGE. Desde 1995, este ha sido el único ensayo reconocido por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud para el diagnóstico serológico de cisticercosis (29).

En la actualidad al igual que en cisticercosis humana, se planteó el uso de esta técnica para detectar cisticercosis porcina, ya que tiene mayor especificidad (100%) y sensibilidad (98%) que otros inmunoensayos. En el Perú se reportó una sensibilidad de 91% y una especificidad de 100%, la cual es usada como ayuda diagnóstica y para estudios epidemiológicos (15); encontrándose la siguiente prevalencia: en la sierra, 13% en Haparquilla, 24% en Saylla (Cuzco), 6% en Canchayllo y 18% en Quilcas (Huancayo); en la costa: 16% en Monterredondo (Piura); en la selva 8% en Maceda y 7% en Churuzapa (Tarapoto) (15,26).

Sin embargo, a pesar del desarrollo de la técnica y los esfuerzos por lograr un inmunodiagnóstico exitoso, el ensayo tiene algunos inconvenientes, ya que depende de un suministro de cerdos infectados, preparación del antígeno sumado al tratamiento del mismo para obtener los antígenos glicoproteicos, etc.; además un ensayo de transferencia Western no es adecuado para estudios de campo, ni tampoco es un ensayo accesible para el diagnóstico en países donde la cisticercosis es endémica (29,30).

2.2.3 Proteína 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta

Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas ácidas, pequeñas (aproximadamente 30kDa), que se expresan en todas las células eucariotas. Tienen la capacidad de unirse a diversas proteínas de señalización, incluyendo quinasas, fosfatasas, y receptores de transmembrana. Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan porque tienen 9 o 10 alfa hélices, y por lo general forman homo y/o interacciones heterodímeras a lo largo de sus hélices amino terminales. Son multifuncionales y están involucrados en una amplia gama de actividades biológicas (31,32).

Las funciones generales de las proteínas 14-3-3 están asociadas principalmente a la regulación del ciclo celular, transducción de señales, control del ciclo celular, entre otros; tienen además un papel crucial en los eventos de la señalización celular las cuales se han demostrado en muchos organismos eucariotas, incluyendo parásitos. El interés en las proteínas 14-3-3 en parásitos se ve estimulada por la posibilidad de utilizar este tipo de moléculas como herramientas de vacunas contra la infección y la respectiva enfermedad; además de estar relacionadas con la proliferación, la migración y cambios en la morfología que se producen durante el ciclo de vida del parásito (12).

Se han identificado varias isoformas (ortólogas) como por ejemplo 14-3-3 épsilon, 14-3-3 zeta, 14-3-3 sigma, 14-3-3 gamma, etc. en diferentes organismos; cada una de ellas participa en procesos celulares específicos. En *Schistosoma mansoni*, la proteína 14-3-3 épsilon (Acceso database AF195529), fue evaluada como vacuna utilizando suero de

ratón en donde se demostró ser capaz de transferir pasivamente resistencia a la infección. Esta proteína fue reconocida por sueros de ratones vacunados pero no por suero de ratones infectados crónicamente (31,12,33).

Asimismo se ha identificado la isoforma 14-3-3 zeta en dos especies de *Echinococcus*: en el tejido metacéstode (capa germinativa), protoescóleces y oncósfera de *E. multilocularis* y en protoescóleces de *E. granulosus* (34).

Siles y colaboradores, proporcionan algunos indicios de que la proteína 14-3-3 del gusano adulto de *E. granulosus* puede representar un candidato de vacuna en el huésped definitivo (34,35).

El alto potencial de estas proteínas para ser usada como vacuna contra *E. multilocularis*, específicamente la isoforma 14-3-3z, también podría ser evaluado para usarse contra otros parásitos relacionados (34,36).

Las proteínas 14-3-3 en *Schistosoma* spp. y *Echinococcus* spp. son también propuestas como candidatos a vacuna contra respectivas infecciones o enfermedades por el rol que ejerce en el ciclo celular (12)

Matsumoto y col., evaluaron los niveles de expresión de la proteína 14-3-3 para correlacionar con la viabilidad y actividad de crecimiento de metacéstodos de *E. multilocularis*, indicando que la proteína 14-3-3 exhibe un buen potencial como un marcador molecular para evaluar la viabilidad y el crecimiento del parásito, ya que correlacionó positivamente con el crecimiento metacéstodo en los animales infectados.

Asimismo se realizó inmunotransferencia para la detección de la proteína 14-3-3 en la fracción soluble de larvas de *E. multilocularis* (37).

En el laboratorio de Bioinformática de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se buscaron genes que codifican proteínas de alta exposición al sistema inmune en organismos homólogos a *T. solium*: *S. mansoni*, *E. granulosus*, etc., usando el programa BLAST. Se identificaron genes homólogos en genomas secuenciados de *T. solium* provenientes de Huancayo y Puno (disponibles en GenBank ID PRJNA183343). Se identificaron un grupo de proteínas, entre ellas la catepsina, enolasa y las 2 isoformas de la proteína 14-3-3, épsilon y zeta. Asimismo, se evaluó la inmunogenicidad de las proteínas identificadas mediante la predicción de epítopes MHC de clase I y MHC de clase II empleando los servidores NetMHCcons y NetMHCIIpan, teniendo en cuenta los alelos MHC más frecuentes de la población peruana y mundial, así como también el grado de exposición de los mismos. Las proteínas con secuencias expuestas y con alta tasa de inmunogenicidad fueron seleccionadas para ser evaluadas, entre ellas catepsina, enolasa, tetrapanina y las isoformas de la proteína 14-3-3. En las proteínas 14-3-3 se determinó cinco epítopes inmunogénicos y alta afinidad para los alelos MHC más frecuentes de la población peruana (Datos no publicados).

2.2.4 Expresión en procariontes y eucariontes (células de insectos *Spodoptera frugiperda* (Sf9) - Baculovirus)

Las células procariotas expresan proteínas eficaces en el serodiagnóstico; sin embargo a veces no es posible detectar anticuerpos específicos, por lo que se asume que la falta de glicosilación de la proteína recombinante podría contribuir a una baja sensibilidad (38,39, 11). Diferentes sistemas de expresión de proteínas han tratado de superar el problema de requerir una fuente natural de antígenos y las dificultades de la purificación de antígenos de cisticerco, pero las proteínas producidas carecen del patrón natural de glicosilación (11). Por tal razón el sistema de expresión en Baculovirus, proporciona un método rápido y eficiente para generar proteínas recombinantes con las modificaciones complejas posteriores a la síntesis de dichas proteínas (40).

El sistema de expresión en Baculovirus (Anexo 1) se basa en la transposición de un cassette de expresión desde un vector plasmídico donador a un vector baculoviral (bácmido) que se propaga en *E. coli* DH10BAC como un megaplásmido. Este bácmido contiene un segmento de DNA que codifica para el péptido LacZ α , en cuyo extremo N-terminal está el sitio de inserción para el transposón bacteriano Tn7 (mini-attTn7) que no interrumpe el marco de lectura del péptido lacZ α (40).

Los bácmidos recombinantes se generan mediante transposición del elemento mini-Tn7, desde el plásmido donador pFastBac HTA (4856pb), al sitio de inserción miniattTn7 en el bácmido. La transposición interrumpe el marco de lectura del péptido

LacZ α permitiendo identificar aquellas bacterias que llevan bácmidos recombinantes mediante el desarrollo de colonias blancas. Luego este DNA recombinante es utilizado para transfectar células de insecto (*Sf9*). El stock viral cosechado (>10⁷ pfu/ml) de las células transfectadas es utilizado para infectar nuevas células de insecto para la posterior expresión, purificación y análisis de proteínas (40).

2.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La infección por la larva de *T. solium* está determinada principalmente por la crianza no tecnificada de cerdos, permitiendo que estos animales sueltos y sin una alimentación adecuada se alimenten de excretas humanas. Esta práctica se encuentra asociada con la falta de letrinas y otros servicios sanitarios (41,7).

Al igual que para la cisticercosis humana, la prueba de western blot es usado para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. El western blot es desarrollado en centros con alta capacidad de tecnología con antígenos proveniente de quistes por lo que es impráctico en zonas endémicas (42). Sin embargo, las pruebas inmunodiagnósticas contribuirían en la detección y tratamiento de focos de transmisión usadas como herramientas en programas de prevención y control (43, 44, 19) e incrementarían la capacidad de detección de la cisticercosis porcina, cortando el ciclo de vida de *T. solium* y evitando la morbilidad humana y porcina (8, 13).

En este estudio deseamos evaluar a las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta recombinantes como antígenos en un formato sencillo de inmunodiagnóstico: ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de cisticercosis porcina. Las proteínas 14-3-3 son candidatas a detectar esta enfermedad con alta sensibilidad y especificidad debido a que son proteínas de secreción con función de regulación del crecimiento y desarrollo de los parásitos. Las proteínas de secreción están en el torrente sanguíneo, expuestas al sistema inmune aumentado su probabilidad de generar anticuerpos (11).

Las proteínas 14-3-3 serán expresadas en un sistema procarionte: *E. coli* y eucarionte: células de insectos – Baculovirus, CIB. El sistema procarionte permite la obtención de proteínas recombinantes de manera sencilla y rápida; sin embargo es incapaz de realizar modificaciones post traduccionales (glicosilaciones) a diferencia del sistema eucarionte.

2.4 HIPÓTESIS

- El diagnóstico de cisticercosis porcina mediante ELISA indirecto es posible empleando las proteínas 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta de *T. solium* expresadas en *E. coli* y células de insectos – Baculovirus como antígenos recombinantes.

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 Objetivo General

Diagnosticar cisticercosis porcina mediante ELISA indirecto, empleando las proteínas 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta como antígenos recombinantes.

2.5.2 Objetivos Específicos

- Comparar la expresión de las proteínas 14-3-3 tanto en el sistema procarionte (*E. coli*) como en células de insectos.
- Estandarizar las concentraciones de antígeno y títulos de anticuerpos en ELISA convencional para la evaluación de las proteínas recombinantes.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de las proteínas 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta expresadas en el sistema Baculovirus y expresadas en *E. coli* en ELISA convencional, empleando suero de cerdo.

III. METODOLOGIA

- **Descripción breve de la metodología.**

Los genes 14-3-3 épsilon y zeta de *T. solium* fueron clonados en pFastBac HTA y transferidos al báculo de baculovirus. Las proteínas 14-3-3 fueron expresadas en células de insectos-Baculovirus y en *E. coli* y evaluadas como antígenos en la prueba de ELISA para el diagnóstico de cisticercosis porcina usando sueros de cerdos.

El procedimiento experimental fue dividido en cuatro componentes:

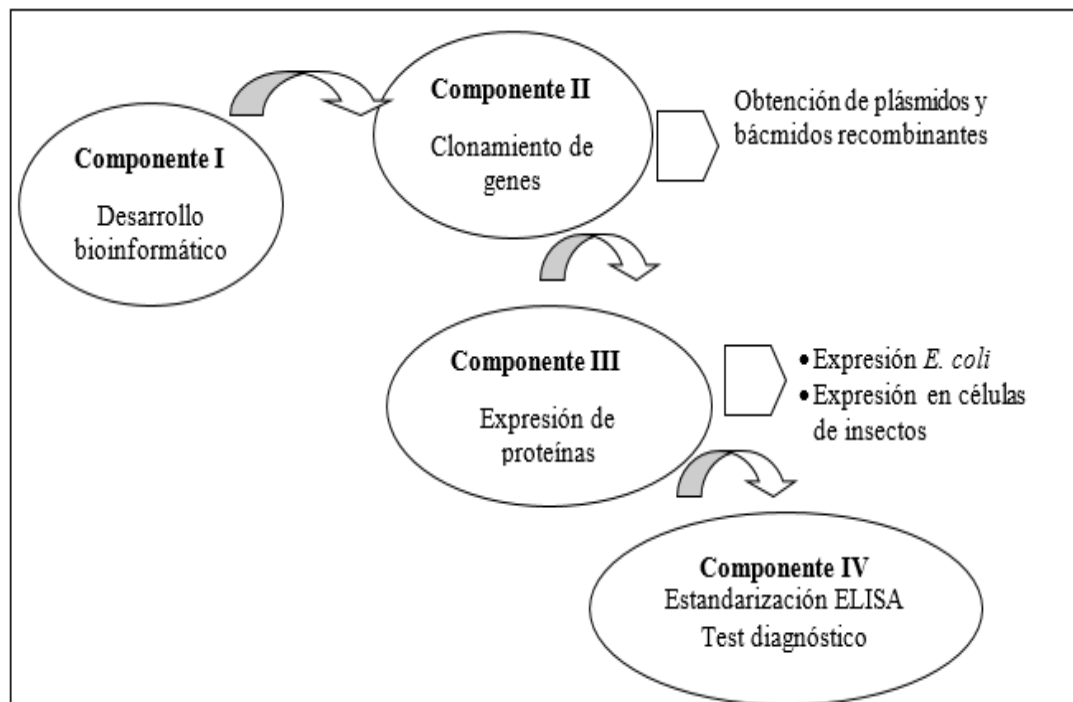


Figura 1. Componentes del procedimiento experimental

3.1. Componente I: Desarrollo bioinformático

Diseño de cebadores para la amplificación de los genes 14-3-3 y clonamiento en pFastBac HTA

Los cebadores fueron diseñados empleando el programa Primer Blast disponible en línea y se verificó la formación de estructuras secundarias mediante el software online.

OligoAnalyzer 3.1 determinando la presencia de *hairpins*, heterodímeros, regiones palindrómicas y repeticiones.

Los cebadores incluyeron en cada extremo las secuencias correspondientes a las enzimas de restricción para el clonamiento en pFastBac HTA. Para el caso de 14-3-3 épsilon se emplearon las enzimas BamHI y XhoI; para 14-3-3 zeta se emplearon las enzimas NcoI y XhoI.

Identificación de los sitios N- y O-glicosilación de 14-3-3 épsilon y zeta

La identificación de los sitios N-glicosilación se realizó con la herramienta en línea NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), ingresando la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. Asimismo se identificaron los posibles sitios O-glicosilación mediante la herramienta en línea GlycoEP (Prediction of glycosites in eukaryotic glycoproteins), disponible en <http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>

3.2. Componente II: Clonamiento de genes 14-3-3 en pFastBac HTA, transferencia de genes 14-3-3 al b crido de baculovirus y transfección de células de insecto *Sf9*

Se realizó el clonamiento de los genes 14-3-3 épsilon y zeta en pFastBac HTA, obteniendo los plásmidos recombinantes, los cuales fueron transformados en *E. coli* DH10Bac, dónde ocurre la transposición del cassette de expresión al b crido. Los b cridos recombinantes fueron extraídos y transfectados a células de insectos *Sf9*, obteniendo así las proteínas de interés (Figura 2).

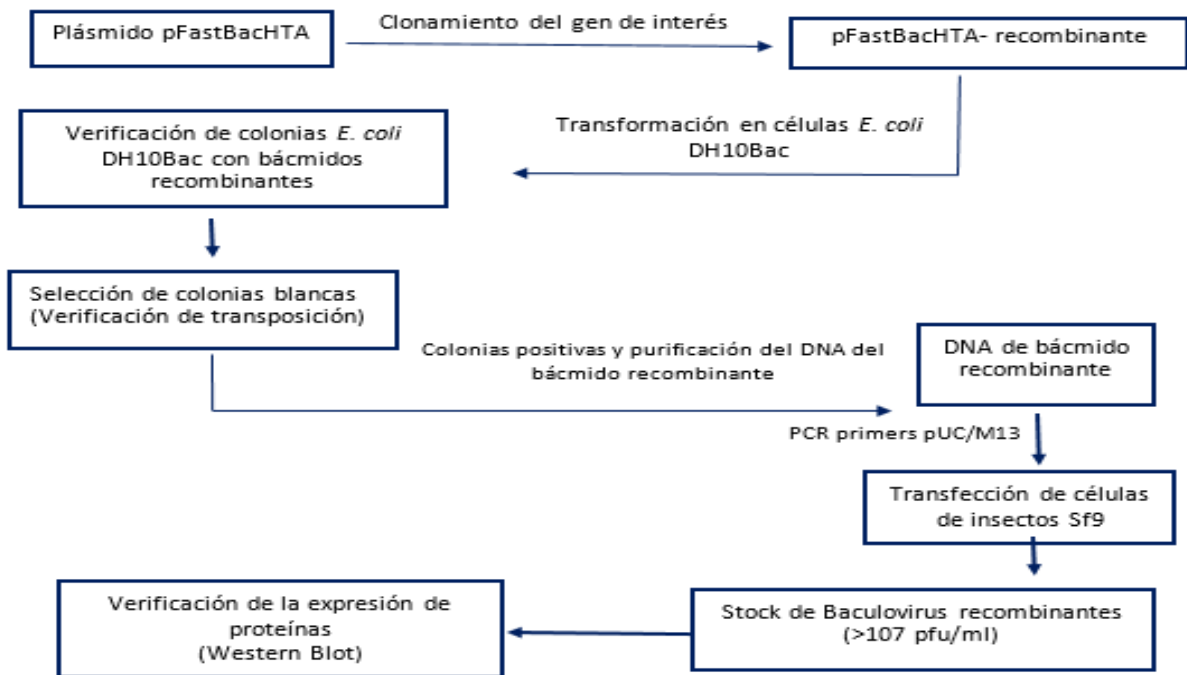


Figura 2. Flujograma de obtención de b crido recombinante y expresión de proteínas en el sistema Baculovirus

- **Amplificación de los genes 14-3-3 épsilon y zeta a partir de ARN de cisticercos de *T. solium***

El ARN fue extraído de 200 mg de cisticercos de *T. solium*. Los cisticercos fueron triturados usando un homogenizador: 2 veces por 45 segundos. La extracción se realizó mediante el método de Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN fue usado en la retrotranscripción utilizando Oligo dT_(t) con un kit de amplificación de RT-PCR (TaqMan Universal PCR[®], Applied Biosystems), siguiendo el ciclamiento: 25°C x 10 min; 48°C x 30 seg; 95°C por 5 min y 5°C por 5 min. El cDNA obtenido fue usado para amplificar el gen 14-3-3 épsilon y zeta empleando un master mix con un volumen final de 25µl que contenía, 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM dNTPs; 1 µM de primers forward y reverse y 0.025 U/µL de Taq polimerasa. Las condiciones para la amplificación fueron: Un ciclo a 95° por 5 min, y 35 ciclos de 95° por 45 seg, 60° por 45 seg y 72° por 45 seg . Finalmente se realizó un ciclo de extensión final a 72° por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados con el kit PCR quick spin (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

- **Construcción del plásmido recombinante pFastBac HTA -gen 14-3-3**

Los plásmidos pFastBac HTA recombinantes fueron digeridos con las enzimas BamHI y XhoI (14-3-3 épsilon) y con NcoI y XhoI (14-3-3 zeta) e insertados en el vector pFastBac HTA respectivamente, utilizando la ligasa DNA T4 durante 16 horas a 16°. Las células *E. coli* Novablue (Novagen), fueron transformadas con la reacción de

ligación de acuerdo al protocolo de choque térmico, tal como se describe en el Anexo 2.

- **Selección de clonas recombinantes post transformación.** La verificación de la clonación se realizó mediante PCR colonia, digestión enzimática y secuenciamiento de los plásmidos recombinantes.
 - **PCR colonia de plásmidos recombinantes.** Una parte de las colonias transformadas fueron diluidas en el master mix y amplificadas como se ha descrito en el protocolo de amplificación de los genes 14-3-3.
 - **Digestión enzimática de plásmidos recombinantes.** Los plásmidos fueron extraídos de las colonias transformadas mediante lisis alcalina (Anexo 3) y sometidas a digestiones simples y dobles con las enzimas usadas en el clonamiento.
 - **Secuenciamiento del gen 14-3-3 epsilon y 14-3-3 zeta de *T. solium*.** El ADN plasmídico fue extraído con el Kit High Pure Isolation (Roche) y secuenciado en un Analizador Genético ABI PRISM 3100 en ambas direcciones (MACROGEN, USA). Estos fueron secuenciados con los cebadores 14-3-3 y cebadores pFastBac HTA, amplificando así la secuencia del vector.

- **Transferencia de los genes 14-3-3 de pFastBac HTA al vector de expresión (bácmido) en *E. coli* DH10 Bac**

Los plásmidos pFastBac HTA-14-3-3 fueron extraídos con un kit de extracción de DNA plasmídico (Roche) y transformados mediante choque térmico en la células *E. coli* DH10 Bac. En las células DH10 Bac ocurre la transposición del cassette de expresión del pFastBac HTA al bácmido (selección de colonias blancas lacZ -). Los bácmidos fueron extraídos por el método de lisis alcalina y la recombinación de los genes 14-3-3 en el ADN del bácmido fue confirmado mediante PCR usando los cebadores que flanquean la región mini-attT7: pUC/M13 y 14-3-3. La secuencia de los cebadores pUC/M13 es:

- pUC/M13 Forward: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'
- pUC/M13 Reverse 5' AGCGGATAACAATTTACACACAGG 3'

Las condiciones de la amplificación fueron: 94°C por 5 min, y 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 45 seg y 72°C por 1 min 30 seg. Finalmente se realizó un ciclo de extensión a 72°C por 1° min. Se consideraron clonas transformantes a aquellas que mostraron una banda de aproximadamente 3040 pb.

3.3 Componente III: Expresión de proteínas 14-3-3 épsilon y zeta en *E. coli* y en CIB

Expresión de las proteínas 14-3-3 en sistema procarionte *E. coli*

pET28a con los genes 14-3-3 épsilon y zeta fueron transformados en células *E. coli* BL21(DE3)pLysS empleando shock térmico. Se inoculó una colonia de una cepa *E. coli* BL21 (DE3) en 20 ml de medio LB + Kanamicina (40 µg/ml) y se incubó a 37°C por toda la noche (16 h. aprox.). El cultivo fue transferido a 500 ml de LB + Kanamicina (40 µg/ml), se incubó a 37°C en un shaker a 220-250rpm hasta que el cultivo llegó a un OD entre 0.35-0.45. Se retiró una alícuota antes de la inducción. Se agregó isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) a una concentración final de 1 mM). Se incubó en agitación a 220-250rpm a 37 °C por 2 horas. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación (6000g x 10 min). El pellet fue resuspendido en 10 ml de binding buffer (imidazol 20 mM, NaCl 0.5 M y buffer fosfato 20 mM pH 7.4) y lisado mediante ciclos repetidos de choque térmico, seguido de un proceso de sonicación (Sonicador S3000).

Expresión de las proteínas 14-3-3 en sistema eucarionte CIB

La expresión de las proteínas fue dada mediante la transfección de células de insectos con el báculo recombinante. Las células de insectos *Sf9* fueron cultivadas en Medio Grace con antibiótico (antibacteriano y antimicótico Gibco) (Anexo 4). Luego de incubar las células a 27 °C por 7 días se cuantificaron empleando cámara de Neubauer.

Se cuantificó 4 campos y se obtuvo el número de células considerando la siguiente fórmula:

Cél vivas: $[(a+b+c+d)/4] * 10^2 (\text{FACTOR DE DILUCION}) * 10^4 \text{ c\acute{e}l/mL}$; a,b,c,d campos generales

Dónde: 10^2 , indica dilución; 10^4 , indica el número de campos

La transfección se realizó siguiendo el protocolo de fabricante (40) (Figura 3). Se incubó por 10 días a 27 °C y se revisó el progreso de la infección de células de insectos (lisis celular) mediante observación microscópica. La evaluación de la morfología de las células *Sf9* infectadas se realizó a las 24 h (etapa temprana) y más de 72 h (etapa tardía), comparándolas con células *Sf9* sanas, las células vivas tienden a adherirse y mostrar un crecimiento en monocapa.

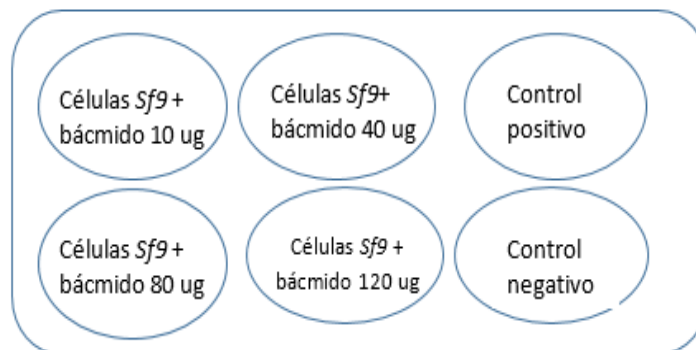


Figura 3. Esquema de transfecci\u00f3n en placa de seis pozos

Una vez observada la lisis celular se determin\u00f3 la presencia del inserto acoplado al b\u00e1cmido en la c\u00e9lula infectada. Se extrajo el ADN viral mediante el m\u00e9todo de proteinasa K y se us\u00f3 como blanco para amplificar los genes 14-3-3 usando las condiciones descritas.

Nuevas células *Sf9* en 5mL de cultivo fueron infectadas para obtener más generaciones de células y por ende mayor producción de proteína. Después de incubar a 27°C por 10 días las células infectadas fueron recuperadas mediante centrifugación (6000 g x 10 min) y el sobrenadante conteniendo las partículas virales, fue utilizado para infectar nuevas células sanas en un volumen mayor (100 y 300mL). El inóculo para infectar células sanas *Sf9* tanto para 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta fue calculado teniendo en cuenta el MOI (multiplicity of infection) 1 y 8 respectivamente, mediante la siguiente fórmula (45).

$$\text{Inóculo} = \frac{\text{MOI} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{células}} \right) \times \text{número de células}}{\text{título de stock viral} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right)}$$

Después de incubar a 27°C por 7 días las células infectadas fueron recuperadas mediante centrifugación (6000 g x 10 min). El pellet fue resuspendido en 10 ml de binding buffer (imidazol 20 mM, NaCl 0.5 M y buffer fosfato 20 mM pH 7.4) y lisado mediante ciclos repetidos de choque térmico, seguido de un proceso de sonicación (Sonicador S3000).

Purificación de proteínas 14-3-3

Las proteínas obtenidas en ambos sistemas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de afinidad a histidinas revestidas con sulfato de níquel. Las fracciones recolectadas con la proteína 14-3-3 fueron combinadas y concentradas 20 veces por filtración usando una membrana de celulosa (10 kDa) en el

sistema de ultrafiltración Amicon Ultracel a 4°C. La concentración de la proteína fue determinada mediante medición en Nanodrop.

E. coli. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 15% (SDS-PAGE), mezclando la proteína con buffer de carga 2X para proteínas con DTT (1,4-Dithiothreitol) y empleando como marcador Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Se verificó la presencia de banda con el peso molecular de la proteína 14-3-3 épsilon (28kDa) y zeta (27.7kDa)

CIB. Las fracciones obtenidas fueron verificadas mediante Western Blot. Los anticuerpos anti-14-3-3 producidos en conejos hiperinmunizados en estudios anteriores fueron utilizados en este ensayo. En ambos casos la intensidad de la banda correspondiente al peso molecular de la proteína 14-3-3 épsilon (28kDa) y zeta (27.7kDa) teóricos.

3.4 Componente IV: ELISA convencional para el diagnóstico de cisticercosis porcina

- **Estandarización**

Muestras. Un pool de 5 sueros de cerdos con Western Blot positivo a cisticercosis (control positivo). Un pool de 5 sueros de cerdos con Western Blot negativos a cisticercosis (control negativo). Los pools de sueros de cerdos fueron alícuotados en 0,1 ml y almacenadas a -20°C.

Tablero de titulación

Las concentraciones y diluciones óptimas de antígeno, anticuerpo primario y conjugado de enzima-anticuerpo fueron determinados por medio del sistema de “tablero de titulación” (Figura 4), evaluando cada reactivo frente a todos los demás.

Las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta de expresados en *E. coli* fueron evaluados en 2 etapas, la primera etapa con concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/ul y en la segunda etapa con concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 ng/ul.

Las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta expresados en CIB fueron evaluados en una etapa debido a la baja concentración de las proteínas, se evaluaron concentraciones de antígeno de 2.5, 5, 10 y 20 ng/ul. Las diluciones del suero evaluadas fueron 1/12.5, 1/25, 1/50, 1/100, y las del conjugado fueron 1/1000, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/3500, 1/4000, 1/4500 y 1/5000. Se emplearon placas Maxisorp de 96 pozos para minimizar la actividad de fondo.

Proporción entre Positivos y Negativos

El parámetro para evaluar las condiciones de la prueba de ELISA fue la proporción entre positivos y negativos (cociente entre el promedio de los ODs- densidad óptica de positivos y negativos) a la cual la denominamos *Proporción entre Positivos y Negativos (PPN)*.

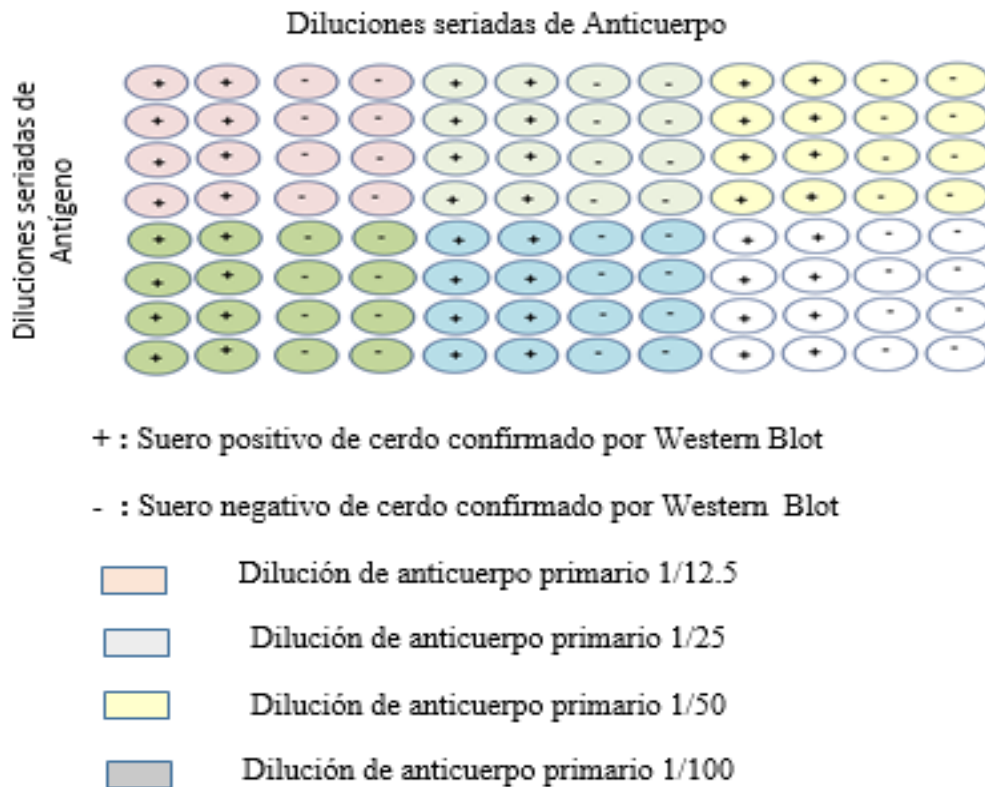


Figura 4. Esquema para estandarización de ELISA convencional en placa de 96 pozos

ELISA

El antígeno diluido en buffer carbonato fue fijado en una placa mediante incubación toda una noche a 4°C. La placa con el antígeno fijado fue lavada 5 veces con 200 µL de PBS-Tween20 al 0,05%, utilizando un lavador de placas, repitiendo ciclos de agitación de 3 min entre cada lavado. Se incubó la placa con una solución de PBS Tween 0,05% y BSA 3% (albúmina de suero bovino) durante 1 h a 37° C, para bloquear todos los espacios libre de antígenos. Posteriormente se lavó la placa como ya ha sido

descrito. Se añadió 100 µL de suero e incubó por 1 h a 37° C, para permitir la reacción antígeno anticuerpo, luego se lavó como ya ha sido descrito. Se añadió 100 µL del conjugado peroxidasa de carnero – inmunoglobulina anti-IgG de cerdo y se incubó 1 h a 37° C, para permitir la reacción del conjugado con el anticuerpo. Se lavó nuevamente la placa y se añadió 100 µL del sustrato OPD, orto-fenil-dietanolamina (una tableta de OPD disuelto en tampón citrato). La reacción fue detenida con HCl 0.5M. Se realizó la lectura del producto final coloreado a 490nm.

La repetitividad fue evaluada mediante el análisis del coeficiente de variabilidad (CV). El CV es la desviación estándar de las réplicas entre el promedio de las réplicas. Se realizó dos repeticiones por cada una de las diluciones evaluadas y se determinó el coeficiente de variabilidad, considerando un CV aceptable menor al 15%, los ensayos con muestras que presentaron CV superiores fueron descartados.

- **Estimación de sensibilidad y especificidad: Muestras individuales**

Muestras control. 2 muestras positivas por Western Blot provenientes de cerdos infectados experimentalmente y naturalmente, y 6 muestras negativas por Western Blot provenientes de cerdos de granjas tecnificadas de la ciudad de Lima (zona no endémica). Se consideró tres repeticiones por placa de cada uno de los controles.

Sueros individuales problema. Se realizó la evaluación de 92 sueros con diagnóstico positivo (48 muestras) y negativo (44 muestras) de cisticercosis confirmadas por Western Blot. La prueba de ELISA fue evaluada sin conocer estos resultados (estudio en ciego). Los 92 sueros fueron distribuidos en tres placas con dos repeticiones por suero (Figura 5), en cada placa se determinó el desviación estándar y el CV.

1	9	17	25					
2	10	18	26					
3	11	19	27					
4	28					
5	Sueros problema			29				
6	14	22	30					
7	15	23	31					
8	16	24	32					
Suero Negativos (controles)								
Positivos control								
33	41	49	57					
34	42	50	58					
35	43	51	59					
36	60					
37	Sueros problema			61				
38	46	54	62					
39	47	55	63					
40	48	56	64					
Suero Negativos (controles)								
Positivos control								
65	73	81	89					
66	74	82	90					
67	Sueros problema							
68	76	84	92					
69	77	85						
70	78	86						
71	79	87						
72	80	88						
Suero Negativos (controles)								
Positivos control								

Figura 5. Esquema de distribución de sueros individuales en placas

Análisis estadístico

Las muestras fueron categorizadas como positivo o negativo de acuerdo a dos **puntos de cortes**. Los puntos de corte se determinaron en base al porcentaje de positividad (PP) y a la media de los controles negativos y la desviación estándar (NC-cut off).

Se calculó el PP dividiendo el promedio de la densidad óptica (OD) de la muestra entre el promedio de ODs de los controles positivos. Se realizó una regresión logística simple para modelar el estado de positivo/negativo y una muestra se consideró positivo si la probabilidad es mayor que el mejor corte (Pr-corte / PP). Con los PP se realizó la curva Característica Operativa del Receptor (ROC) para las proteínas expresadas. El índice de Youden fue estimado a partir del punto de corte que maximice la diferencia entre las fracciones de verdaderos positivos y falsos positivos. Este índice fue empleado para determinar los valores de sensibilidad y especificidad de cada proteína en el test de diagnóstico.

El punto de corte basado en NC-cut off fue determinado como la suma del promedio más el triple de la desviación estándar. Las medias por encima y debajo del punto de corte, se denominaron “positivos” y “negativos”, respectivamente.

La **sensibilidad** del ensayo se calculó dividiendo el número de muestras de suero porcino ELISA-positivas por el número total de muestras positivas conocidas. La **especificidad** se calculó como el número de muestras de suero de ELISA-negativos por el número total de muestras negativas conocidas. Se calculó un intervalo de confianza al 95% (95% IC) para cada proporción. Se comparó la sensibilidad y especificidad entre ambos sistemas y puntos de corte, usando el Test McNemar Exact (67) y las curvas ROC utilizando Test de Chi². Los datos fueron introducidos en hojas de Excel XP (Microsoft) y analizados mediante el software Stata (versión 12).

Consideraciones éticas

El presente proyecto de investigación contó con la aprobación por el Comité institucional de Ética con el código 63758 bajo la categoría de revisión EXENTA.

IV. RESULTADOS

4.1 Componente I: Desarrollo bioinformático

Diseño de cebadores para la amplificación de los genes 14-3-3 y clonamiento en pFastBac HTA

Los cebadores (Tabla 1) permitieron la amplificación de los genes: 14-3-3 épsilon (744pb) y zeta (747pb). Se comprobó la especificidad de los cebadores mediante el secuenciamiento de los genes amplificados.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores diseñados para los genes seleccionados

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	ER
14-3-3 EpsF	ATCGGATCCCATGTCTTCTCTCAGTAAGCGCGAAG	60	BamHI
14-3-3 Eps R	GATCTCGAGTCATTCAGCTTTCGGCTGTTTCAGC	60	XhoI
14-3-3 Zeta F	ATCCCATGGCGATGGCAGCTATTA	60	NcoI
14-3-3 Zeta R	GATCTCGAGTTAGGAGTCAGTTTCAC	60	XhoI

ER: Enzima de restricción, **Tm:** Temperatura de melting

Identificación de los sitios N- y O-glicosilación de 14-3-3 épsilon y zeta

Se identificaron 3 sitios N-glicosilación en 14-3-3 épsilon y 2 en 14-3-3 zeta. Se identificaron la secuencia consenso conformada por N-X-S/T, donde N es asparagina, S serina y T treonina. Se identificaron 3 sitios de O-glicosilación en 14-3-3 épsilon y 7 en 14-3-3 zeta, identificando la unión a los aminoácidos serina o treonina (Figura 6).

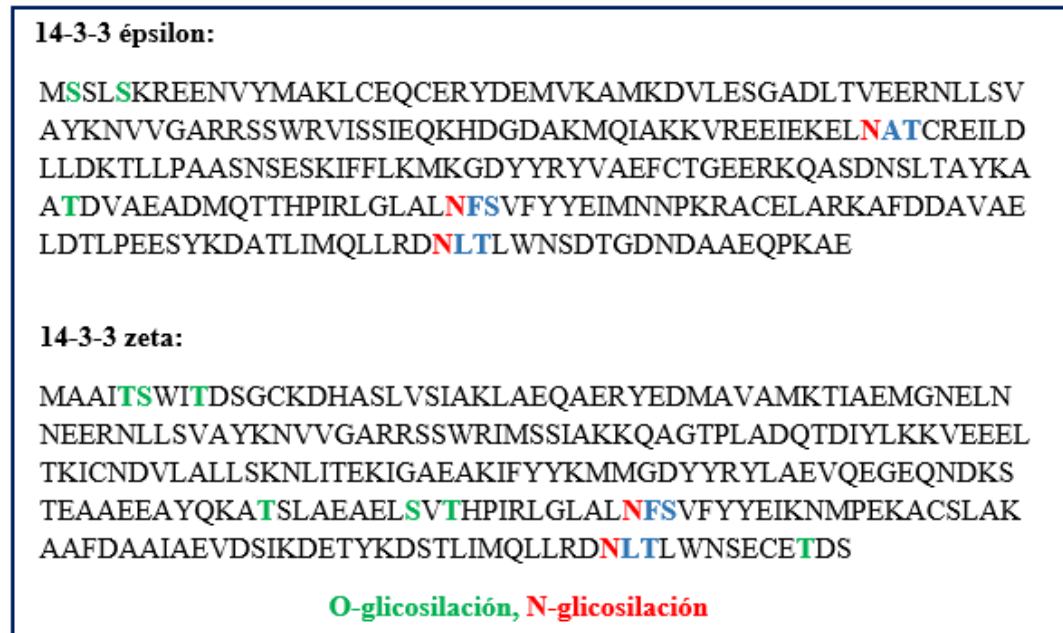
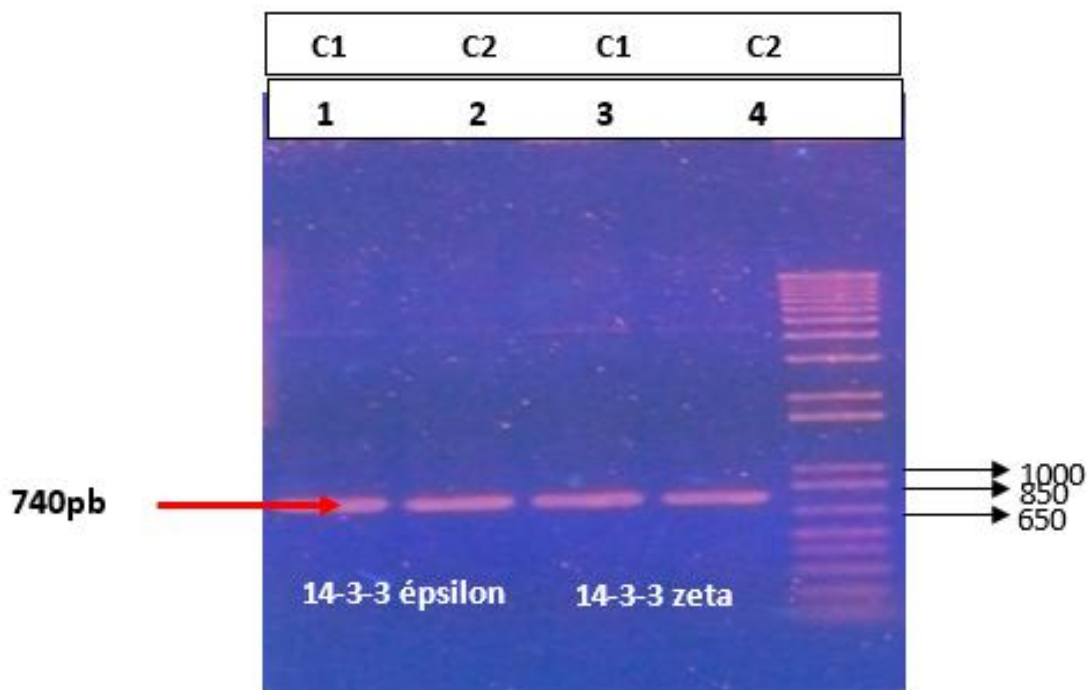


Figura 6: Sitios de N-glicosilación y O-glicosilación en 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta.

4.2 Componente II: Clonamiento de genes 14-3-3 en pFastBac HTA, transferencia de genes 14-3-3 al b́acmido y transfecci3n de c3lulas de insecto *Sf9*

La inserci3n de los genes 14-3-3 3psilon y zeta en pFastBac HTA fue verificado mediante la amplificaci3n de una banda de 744 pb (3psilon) y 747 pb (zeta) (Figura 7). Asimismo se verific3 el presencia del inserto (aprox. 740pb), luego de la digesti3n del pFastBac HTA-14-3-3 con las enzimas de restricci3n correspondientes (Figura 8).



C1: Clona 1; C2: Clona 2, C3: Clona 3 y C4: Clona 4

Figura 7. Evaluaci3n de la clonaci3n del gen 14-3-3 3psilon y zeta en pFastBac HTA mediante PCR colonia.

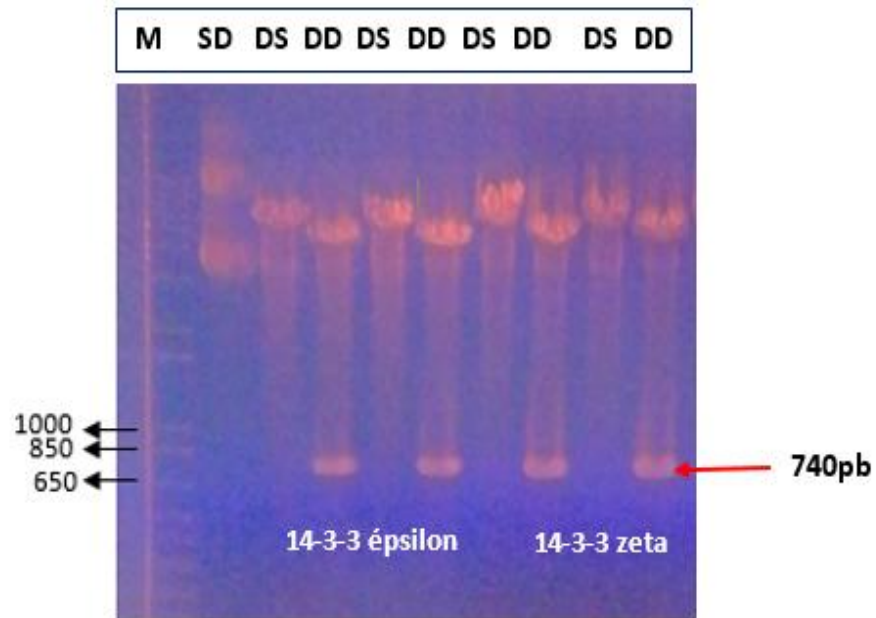


Figura 8. Evaluación de la clonación del gen 14-3-3 épsilon y zeta en pFastBac HTA mediante digestión. M: Ladder 1Kb, Plásmido sin digerir (SD), con simple (DS) y doble digestión (DD)

4.3 Componente III: Expresión de proteínas 14-3-3

4.3.1 Expresión de las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta en *E. coli*

La expresión de 14-3-3 zeta (27.7 kDa) y 14-3-3 épsilon (28 kDa) se evidenció en un gel SDS PAGE al 15% en la fracción inducida (I) (**Figura 9A**), y en las fracciones solubles eluidas con 300mM de imidazol. Las proteínas fueron concentradas, obteniéndose 3700µg/mL de épsilon y 5000 µg/mL de zeta.

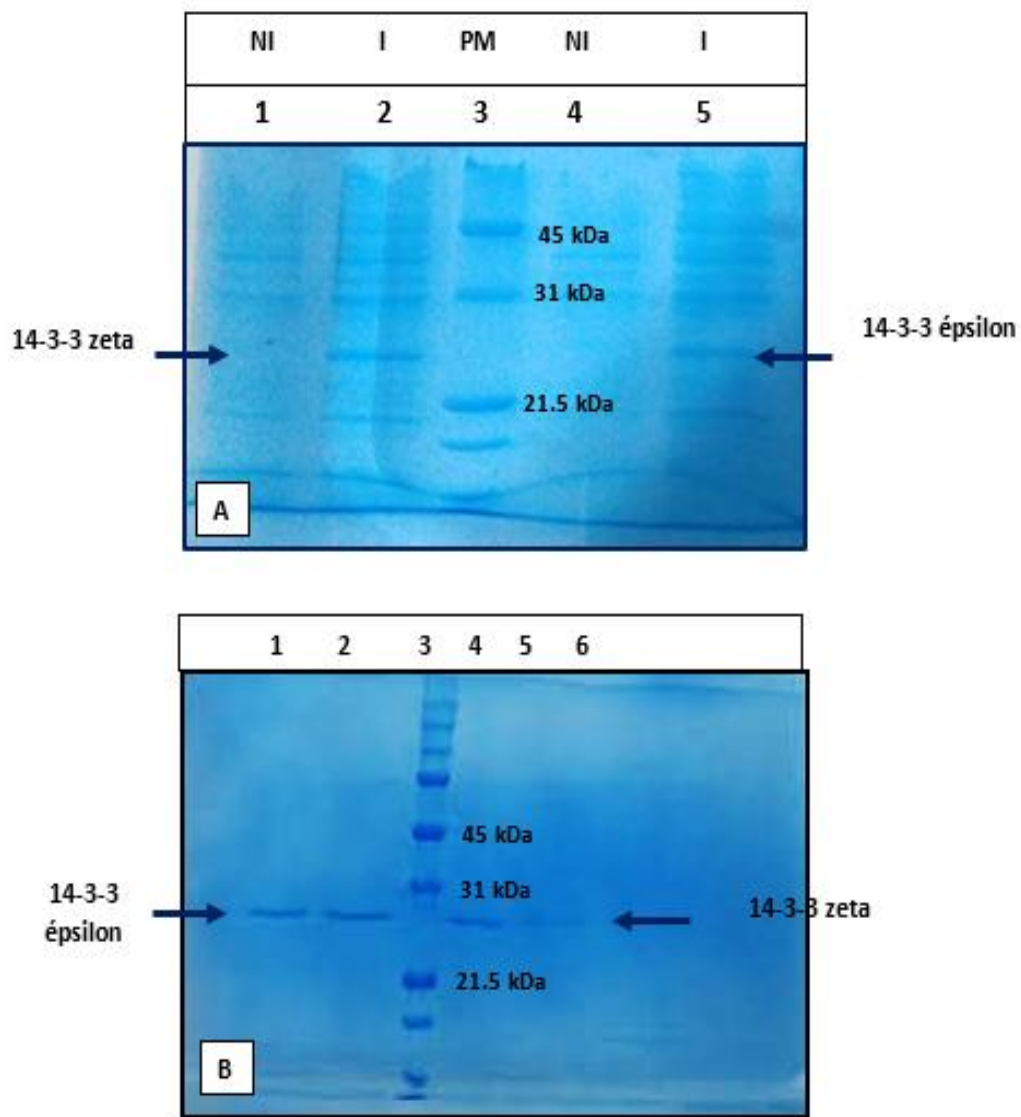


Figura 9. Proteínas 14-3-3 epsilon y zeta de *E. coli* en 15% de SDS-PAGE. **A.** Extracto crudo. Muestras no inducida (NI) e inducida (I), PM: Marcador proteínas, **B:** Fracciones purificadas en 300 mM de imidazol de 14-3-3 epsilon (líneas 1 y 2) y 14-3-3 zeta (líneas 4 y 5).

4.3.2 Expresión de las proteínas recombinantes 14-3-3 épsilon y zeta en CIB

Las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta no fueron observadas en SDS-PAGE al 15%; sin embargo, en Western Blot se evidenciaron bandas con los pesos correspondientes (28kDa) (Figura 10). Las proteínas fueron purificadas a partir de la fracción soluble la cual presentó mayor proporción de proteínas (Figura 10A). Las proteínas fueron eluidas con 300mM de imidazol (Figura 10B) y concentradas, obteniéndose 1363µg/mL de 14-3-3 épsilon y 150 µg/mL de 14-3-3 zeta.

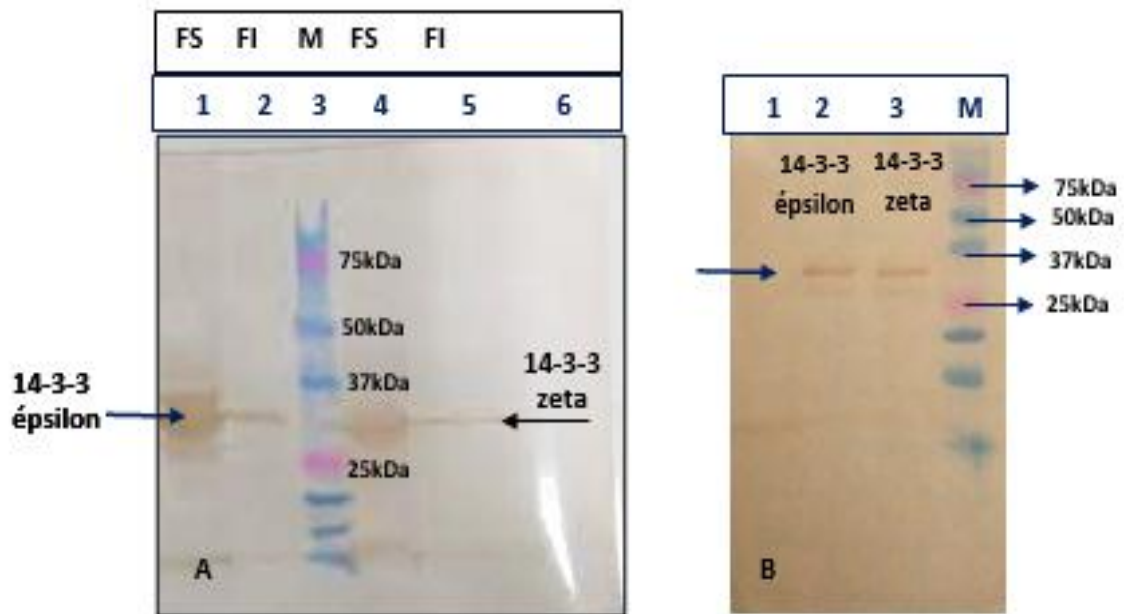


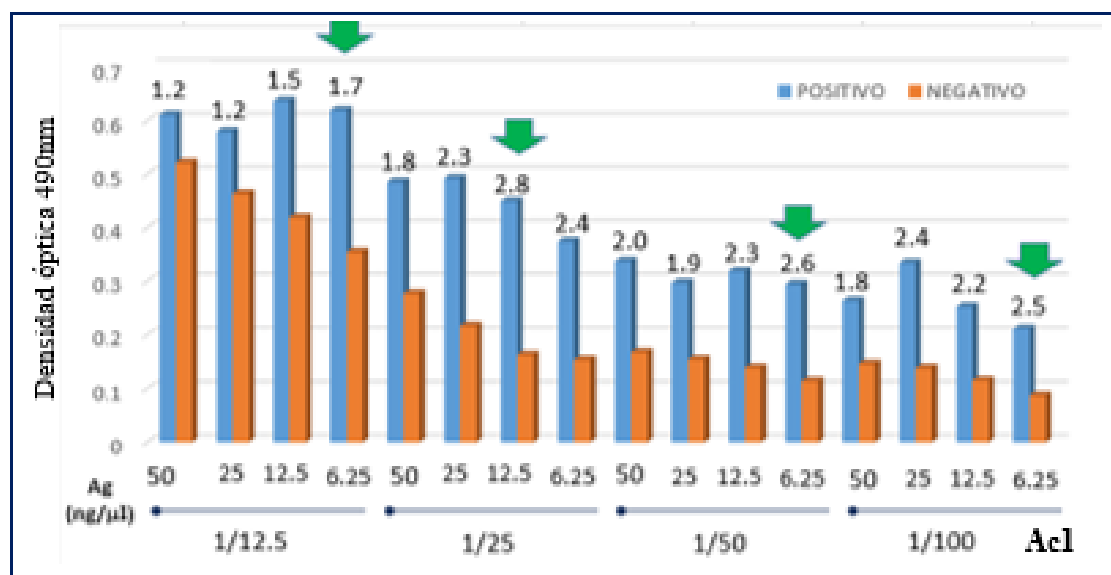
Figura 10. Verificación de la presencia de 14-3-3 épsilon y zeta mediante Western Blot. A. Fracción soluble (FS) e insoluble (FI). **B.** Fracciones purificadas en 300 mM de imidazol de 14-3-3 épsilon (línea 2) y 14-3-3 zeta (Línea3).

4.4 Componente IV: Diagnóstico de cisticercosis porcina mediante ELISA

4.4.1 Estandarización de los parámetros de ELISA

Antígeno expresado en *E. coli* y anticuerpo primario (suero)

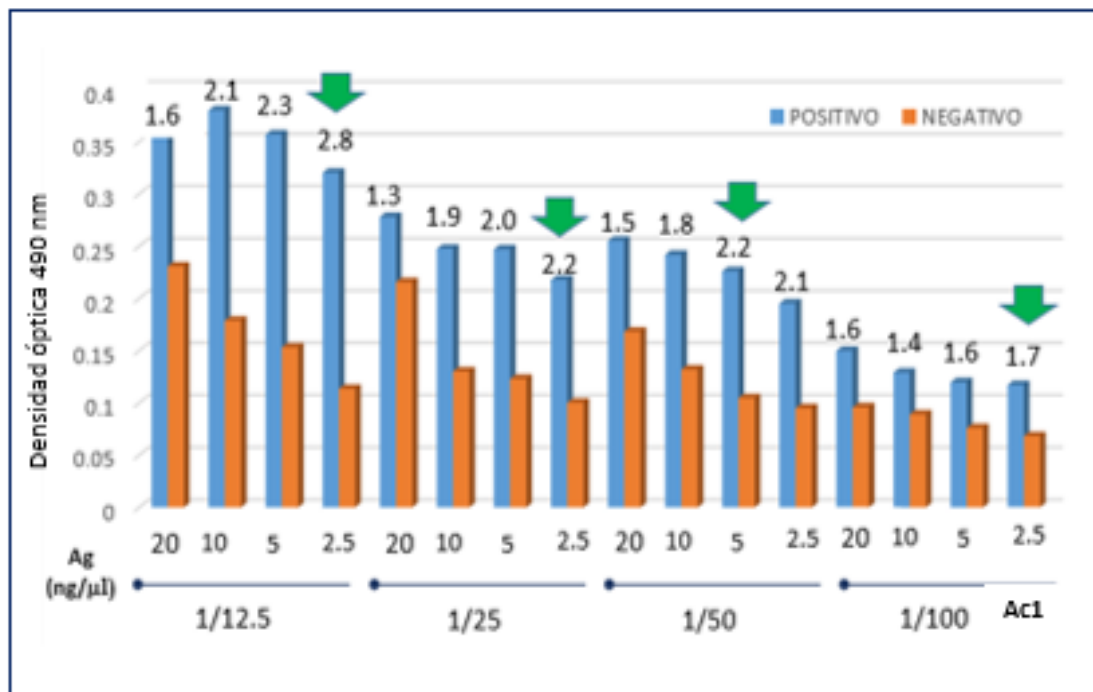
14-3-3 épsilon. En la primera etapa de estandarización, en cada grupo de dilución de suero se obtuvo altos PPN usando la más baja concentración de antígeno (6.25 ng/μl) excepto en 1:25 de suero (PPN de 1.7, 2.6 y 2.5 en diluciones de 1:12.5, 1:50 y 1:100, respectivamente). En la dilución de suero de 1:25 el valor más alto de PPN fue 2.8 usando 12.5 ng/μl de antígeno (Figura 11).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs. Las flechas indican el PPN más alto por dilución de suero.

Figura 11. Primera etapa de evaluación de 14-3-3 épsilon expresado en *E. coli*

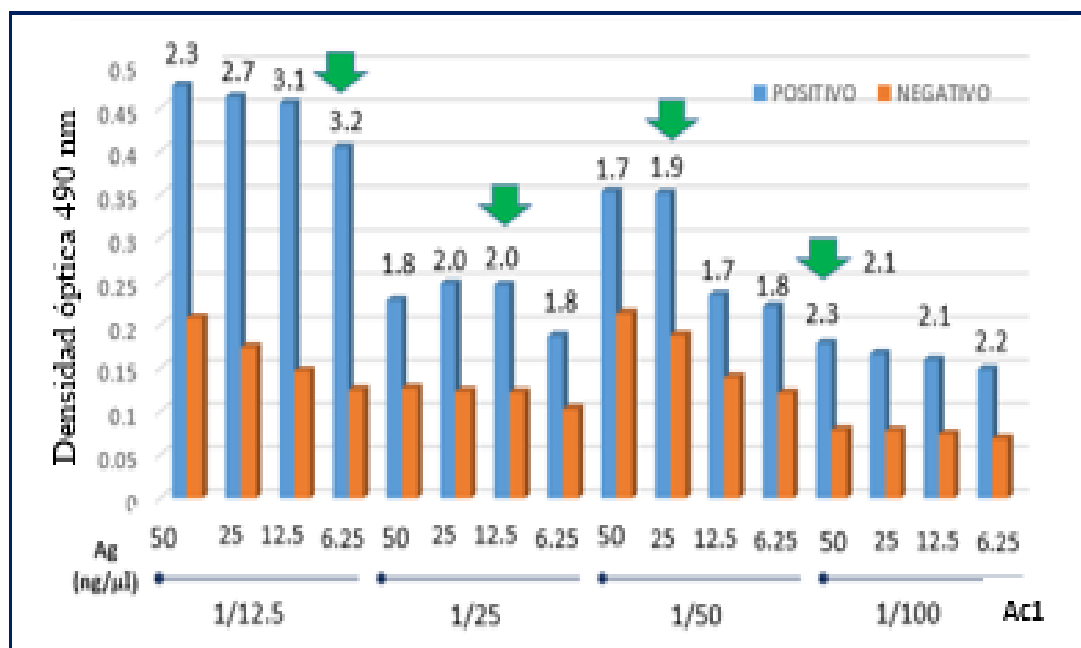
Al igual que en la primera etapa, en la segunda etapa, en cada grupo de dilución de suero se obtuvo PPN altos usando la más baja concentración de antígeno (2.5ng/μl) a excepción de 1:50 de suero. En 1:50 de suero, el PPN más alto (PPN 2.2) se obtuvo con 5ng/μl de antígeno. El mejor PPN fue observado usando 2.5 ng/μl de antígeno y 1:12.5 de suero (PPN 2.8) (Figura 12).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs. Las flechas indican el PPN más alto por dilución de suero.

Figura 12. Segunda etapa de evaluación de 14-3-3 épsilon expresado en *E. coli*

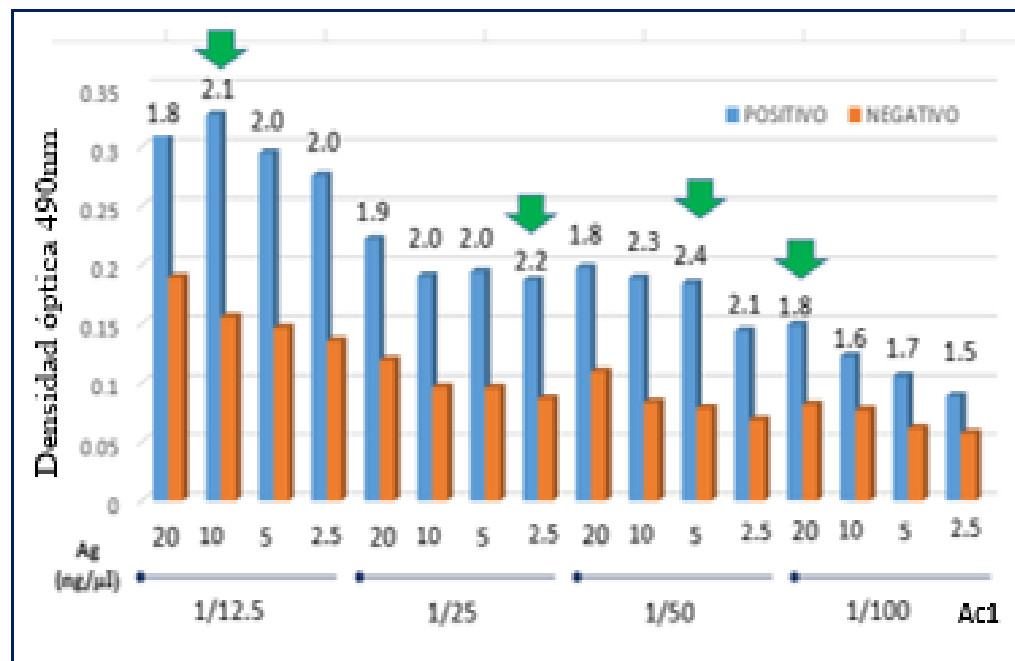
14-3-3 zeta. En la primera etapa, en cada grupo de dilución de suero se observó valores altos de PPN en distintas concentraciones de antígeno: 6.25 ng/μl (PPN 3.2), 12.5ng/μl (PPN 2.0), 25ng/μl (PPN 1.9) y 50ng/μl (PPN 2.3). El PPN más alto fue de 3.2 en la dilución de 1:12.5 de suero con la concentración más baja de antígeno (6.25ng/μl) (Figura 13).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs. Las flechas indican el PPN más alto por dilución de suero.

Figura 13. Primera etapa de evaluación de 14-3-3 zeta expresado en *E. coli*

Al igual que en la primera etapa, en cada grupo de dilución de suero se observó valores altos de PPN en distintas concentraciones de antígeno: 10 ng/μl (PPN 2.1), 2.5 ng/μl (PPN 2.2), 5 ng/μl (PPN 2.4) y 20ng/μl (PPN 1.8). El PPN más alto fue de 2.4 en la dilución de 1:50 de suero con 5 ng/μl de antígeno (Figura 14).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs. Las flechas indican el PPN más alto por dilución de suero.

Figura 14. Segunda etapa de evaluación de 14-3-3 zeta expresado en *E. coli*

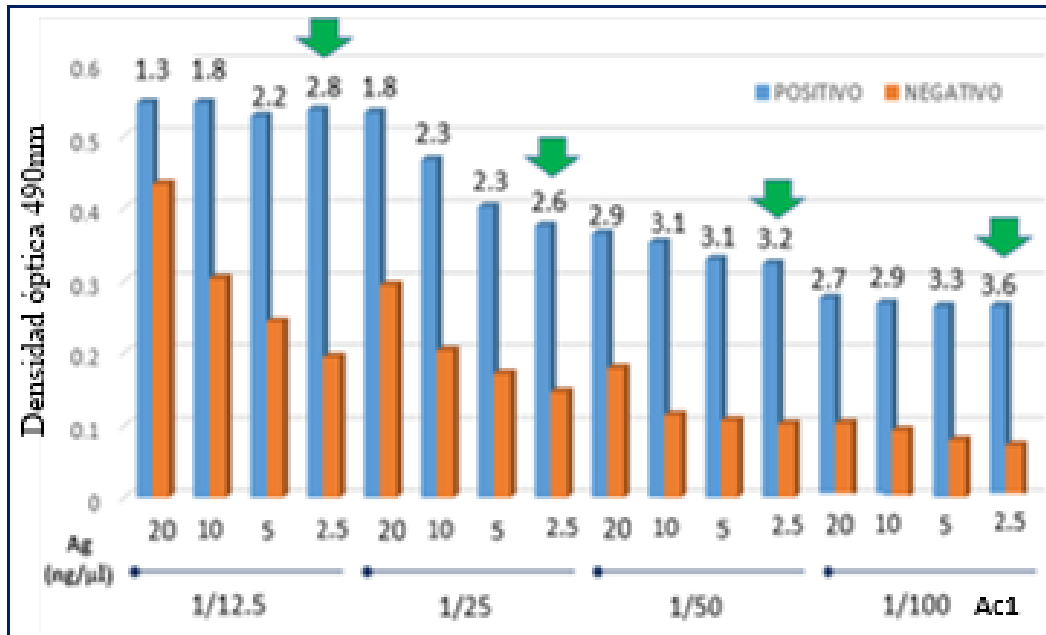
En resumen, se seleccionó las mejores combinaciones (antígeno/anticuerpo primario) de cada etapa que permitieron obtener valores altos de PPN:

En 14-3-3 epsilon, el valor más alto de PPN en la etapa I fue de 2.8 usando 12.5 ng/ul de antígeno y 1:25 de dilución del suero y en la etapa II fue de 2.8 usando 2.5ng/ul de antígeno y 1:12.5 de dilución del suero. La condición seleccionada fue el de la etapa II debido a que permite utilizar menor cantidad de antígeno.

En 14-3-3 zeta, el valor más alto de PPN en la etapa I fue de 3.2 usando 6.25 ng/ul de antígeno y 1:12.5 de dilución del suero y en la etapa II fue de 2.4 usando 5ng/ul de antígeno y 1:50 de dilución del suero. La condición seleccionada fue el de la etapa I debido a que permite obtener mejor PPN.

Antígeno expresado en CIB y anticuerpo primario (suero)

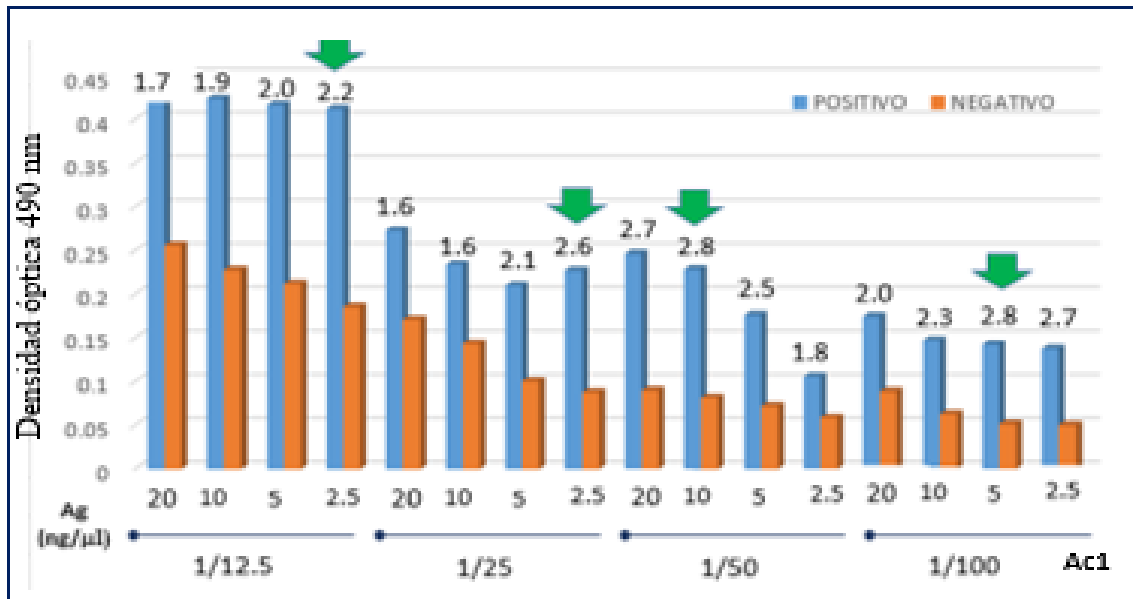
14-3-3 epsilon. En cada grupo de dilución de suero, se obtuvo valores altos de PPN empleando 2.5ng/ul de antígeno (PPN de 2.8, 2.6, 3.2, 3.6). El valor más alto de PPN fue de 3.6 usando 2.5 ng/ul de antígeno y 1:100 de dilución del suero, por lo cual ésta fue la condición seleccionada ya que permite obtener mejor PPN (Figura 15).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs.

Figura 15. Evaluación de 14-3-3 epsilon expresada en CIB

14-3-3 zeta. En los grupos de dilución de suero 1:12.5 y 1:25, se obtuvieron valores altos de PPN empleando 2.5 ng/μl de antígeno (PPN de 2.2 y 2.6), mientras que en los grupos de dilución de suero 1:50 y 1:100 se obtuvieron valores de PPN de 2.8 en ambos casos. La condición seleccionada fue usando 2.5 ng/μl de antígeno y 1:100 de suero, ya que permite utilizar menor cantidad de antígeno (Figura 16).



Ac1: Suero; Ag: Antígeno. Números sobre las barras: PPNs.

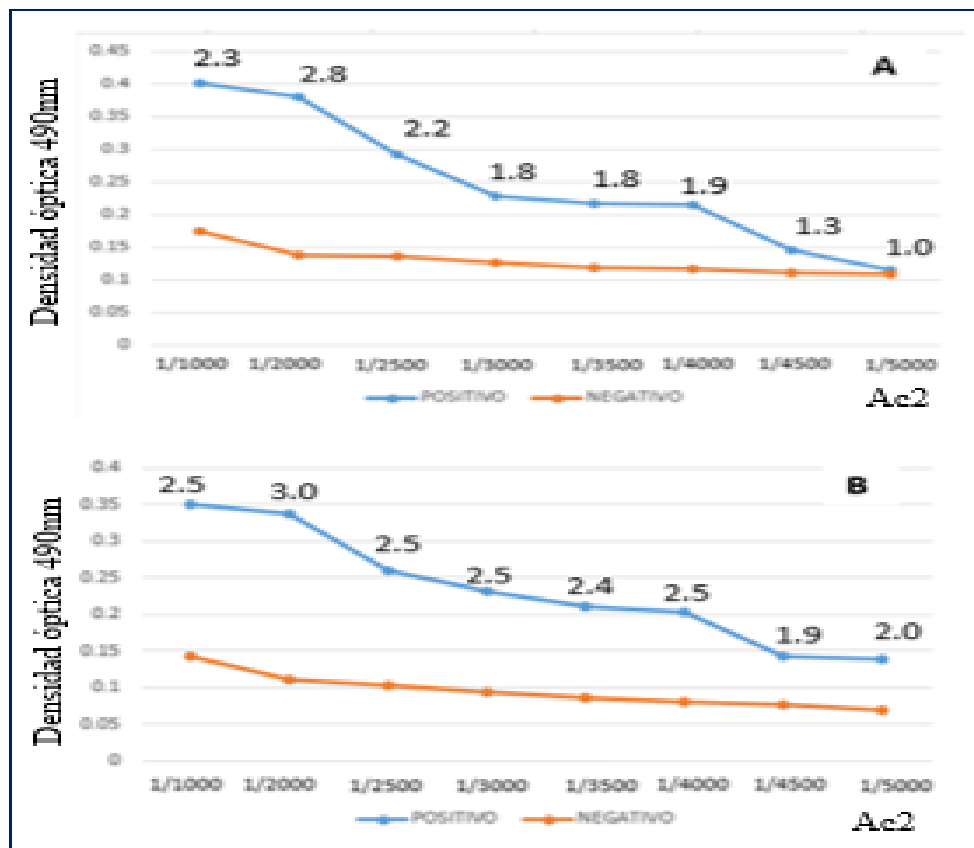
Figura 16. Evaluación de 14-3-3 zeta expresada en CIB

En resumen: En 14-3-3 épsilon se obtuvo un valor alto de PPN (3.6) empleando 2.5ng/en una dilución de 1:100. En 14-3-3 zeta se obtuvo un valor alto de PPN de 2.8 empleando 5ng/μl de antígeno con una dilución 1:100 de suero, es decir en ambos casos las mejores condiciones se obtuvieron con las diluciones mayores de suero.

Estandarización anticuerpo secundario o conjugado

- **Anticuerpo secundario (conjugado) para antígenos expresados en *E. coli***

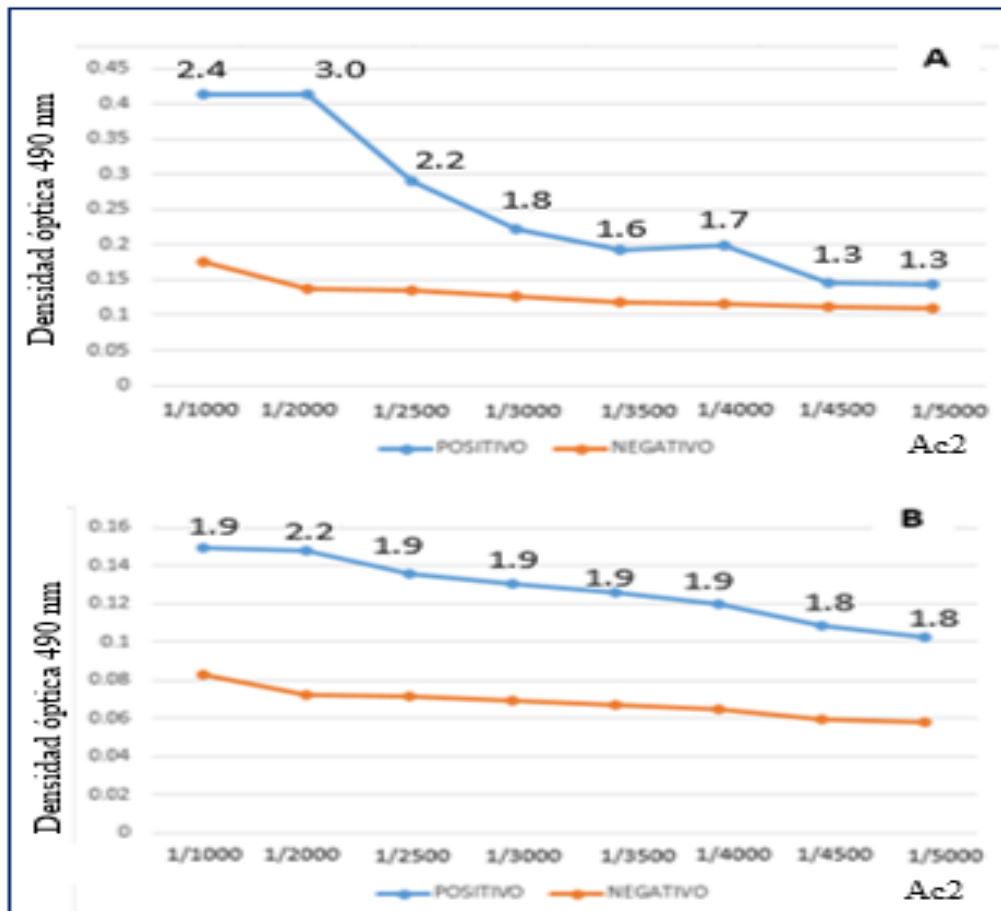
14-3-3 ϵ psilon. Usando la mejor condición de antígeno y suero obtenidos en la primera (12.5ng/ μ l de antígeno y 1:12.5 de suero) y segunda etapa (2.5ng/ μ l de antígeno y 1:12.5 de suero), el PPN con más alto valor fue en 1:2000 de conjugado (PPN de 2.8 y 3.0, respectivamente) (Figura 17).



Ac2: Anticuerpo secundario, OD: Densidad óptica. Números sobre las barras: PPNs.

Figura 17. Evaluación de las diluciones de conjugado usando **14-3-3 ϵ psilon** expresada en *E. coli* en las mejores condiciones obtenidas en A. Etapa I (12.5ng/ μ l Ag, 1/25 suero) y en B. Etapa II (2.5ng/ μ l Ag, 1/12.5 suero)

14-3-3 zeta. Empleando las mejores condiciones obtenidas en la etapa I (6.25ng/μl de antígeno y 1:12.5 de suero) y etapa II (5ng/μl de antígeno y 1:50 de suero), el PPN con más alto valor fue en 1:2000 para ambos casos (PPN de 3.0 y 2.2 respectivamente) (Figura 18)

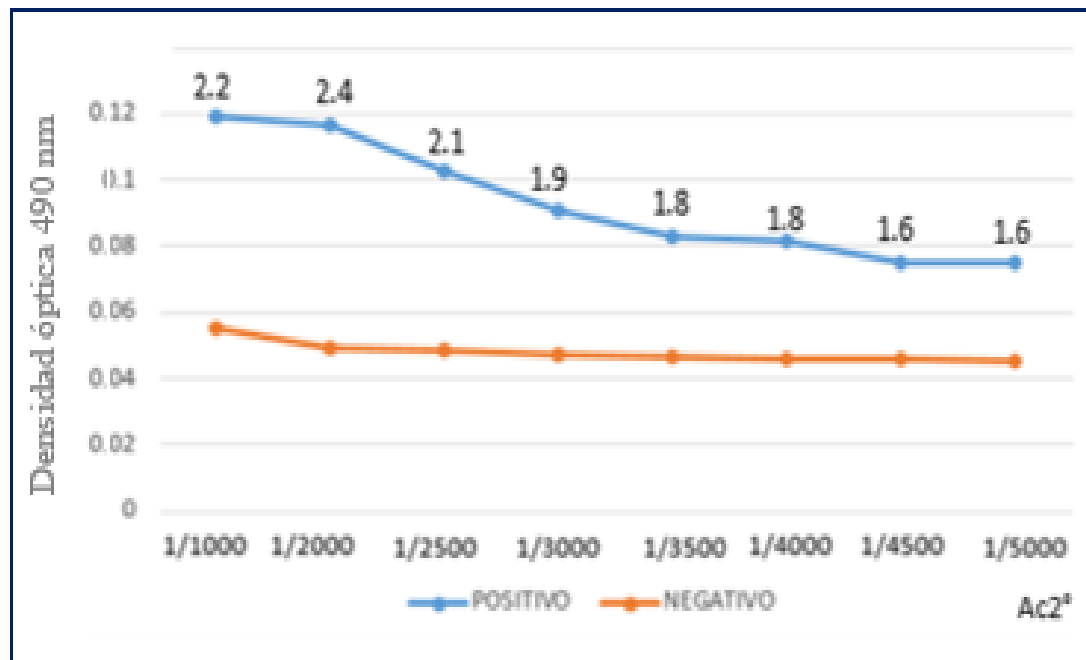


Ac2: Anticuerpo secundario. Números sobre las barras: PPNs.

Figura 18. Evaluación de las diluciones de conjugado en las dos etapas de estandarización con **14-3-3 zeta** expresada en *E.coli* y las mejores condiciones obtenidas en **A.** Etapa I (6.25ng/μl Ag, 1/12.5 suero) y en **B.** Etapa II (5ng/μl Ag, 1/50 suero).

- **Anticuerpo secundario (conjugado) para antígenos expresados en CIB**

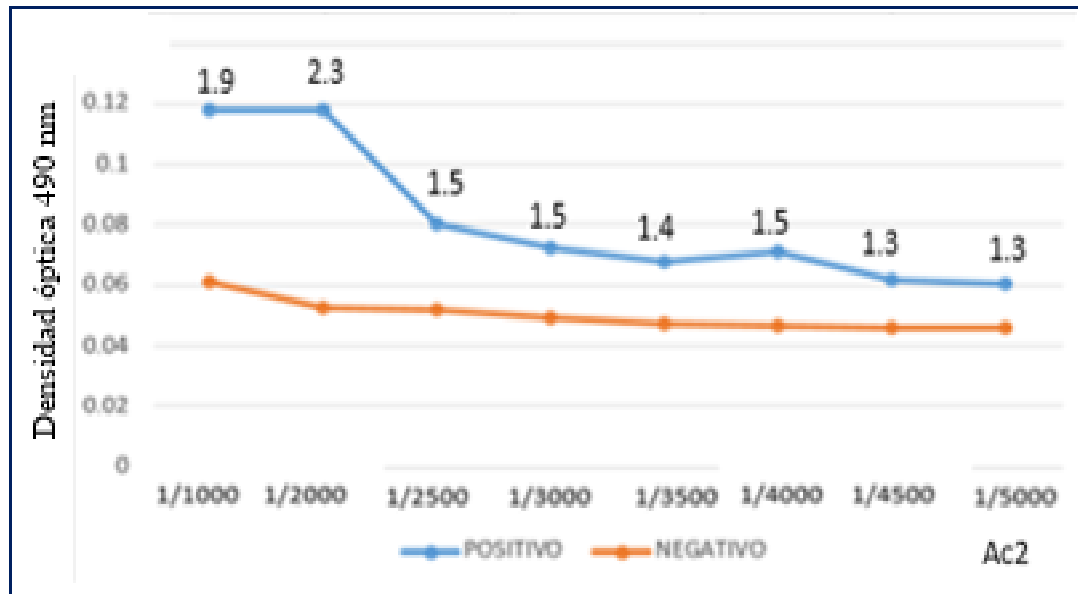
14-3-3 épsilon. Usando la mejor condición de antígeno y suero (2.5ng/μl de antígeno y 1:100 de suero), el PPN con más alto valor fue en la dilución 1:2000 de conjugado obteniendo un PPN de 2.4 (Figura 19).



AC2: Anticuerpo secundario. Números sobre las barras: PPNs.

Figura 19. Evaluación de las diluciones de conjugado en estandarización de **14-3-3 épsilon** expresada en CIB, empleando 2.5ng/μl de Ag, 1/100 de suero

14-3-3 zeta. Usando la mejor condición de antígeno y suero (5ng/μl de antígeno y 1:100 de suero), el PPN al emplear una dilución de 1:2000 de conjugado (PPN de 2.3 (Figura 20).



AC2: Anticuerpo secundario. Números sobre las barras: PPNs.

Figura 20. Evaluación de las diluciones de conjugado en estandarización de **14-3-3 zeta** expresada en CIB, empleando 5ng/μl de Ag, 1/100 de suero.

En resumen, los PPN con valores más altos se obtuvo con 1:2000 de anticuerpo secundario tanto para las proteínas expresadas en *E coli* como en CIB.

Parámetros finales

Los parámetros seleccionados se muestran en la **tabla 2**. Las concentraciones de antígeno (14-3-3 épsilon y zeta) expresadas en *E. coli* y CIB (5ng/μl) seleccionadas tuvieron valores homogéneos; sin embargo, cabe resaltar que épsilon mostró mejores resultados en baja concentración (2.5 ng/ul) a comparación de zeta (5 y 6.25 ng/ul) en ambos sistemas de expresión. En cuanto al anticuerpo primario para las proteínas expresadas en CIB se empleó una dilución mayor (1/100) en comparación de las proteínas expresadas en *E. coli*, y para el caso del anticuerpo secundario, finalmente una dilución de 1/2000 del conjugado permite obtener mejores PPN para todas las proteínas.

Tabla 2. Parámetros estandarizados en ELISA convencional para las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta, expresadas en *E. coli* y en células de insectos-Baculovirus

	<i>E. coli</i>		Baculovirus	
	14-3-3 épsilon	14-3-3 zeta	14-3-3 épsilon	14-3-3 zeta
Antígeno (ng/μl)	2.5	6.25	2.5	5
Anticuerpo primario	1/12.5	1/12.5	1/100	1/100
Anticuerpo secundario	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000

4.4.2 Evaluación de sensibilidad y especificidad de las proteínas expresadas en *E. coli* y en células de insectos (CIB), con sueros individuales de cerdos

- **Determinación de la sensibilidad y especificidad usando el punto de corte basado en el porcentaje de positividad**

El porcentaje de positividad se obtuvo teniendo en cuenta los promedios de los controles positivos y los promedios de los ODs de las muestras. El punto de corte seleccionado para cada proteína fue aquel que maximice el índice de Youden, los puntos fluctúan entre 0.55 y 0.98. El índice de Youden estimado para las proteínas expresadas en *E. coli* es de aproximadamente 0.50, mientras que las proteínas expresadas en CIB presentan un índice de 0.84 y 0.89 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Punto de corte utilizando el porcentaje de positividad e índice de Youden estimado para cada antígeno evaluado

PROTEÍNA	PUNTO DE CORTE (PP)	INDICE YODEN
14-3-3 <i>epsilon</i> <i>E. coli</i>	0.876	0.5092
14-3-3 <i>zeta</i> <i>E. coli</i>	0.984	0.5132
14-3-3 <i>epsilon</i> CIB	0.7	0.8485
14-3-3 <i>zeta</i> CIB	0.55	0.896

La dispersión de resultados expresados como porcentaje de positividad (PP) de las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta de ambos sistemas, se muestran en las figuras 21 y 22 respectivamente, evidenciando mayor presencia de verdaderos positivos y negativos (PP POS y PP NEG) en las proteínas expresadas en CIB, teniendo como punto de corte el índice de Youden.

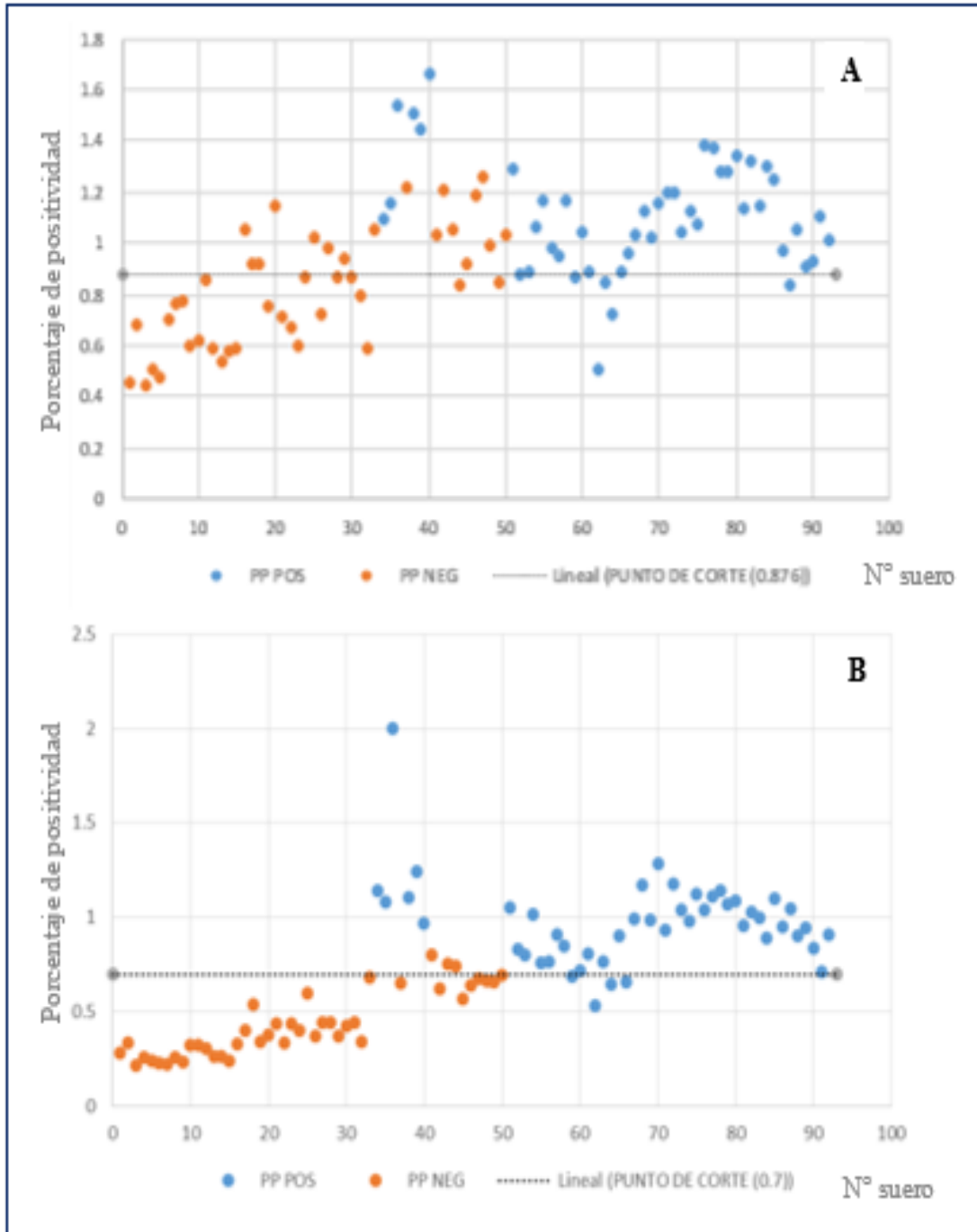


Figura 21. Dispersión del porcentaje de positividad de la prueba de ELISA usando la proteína 14-3-3 épsilon. A: Expresión en *E. coli*. B: Expresión en CIB.

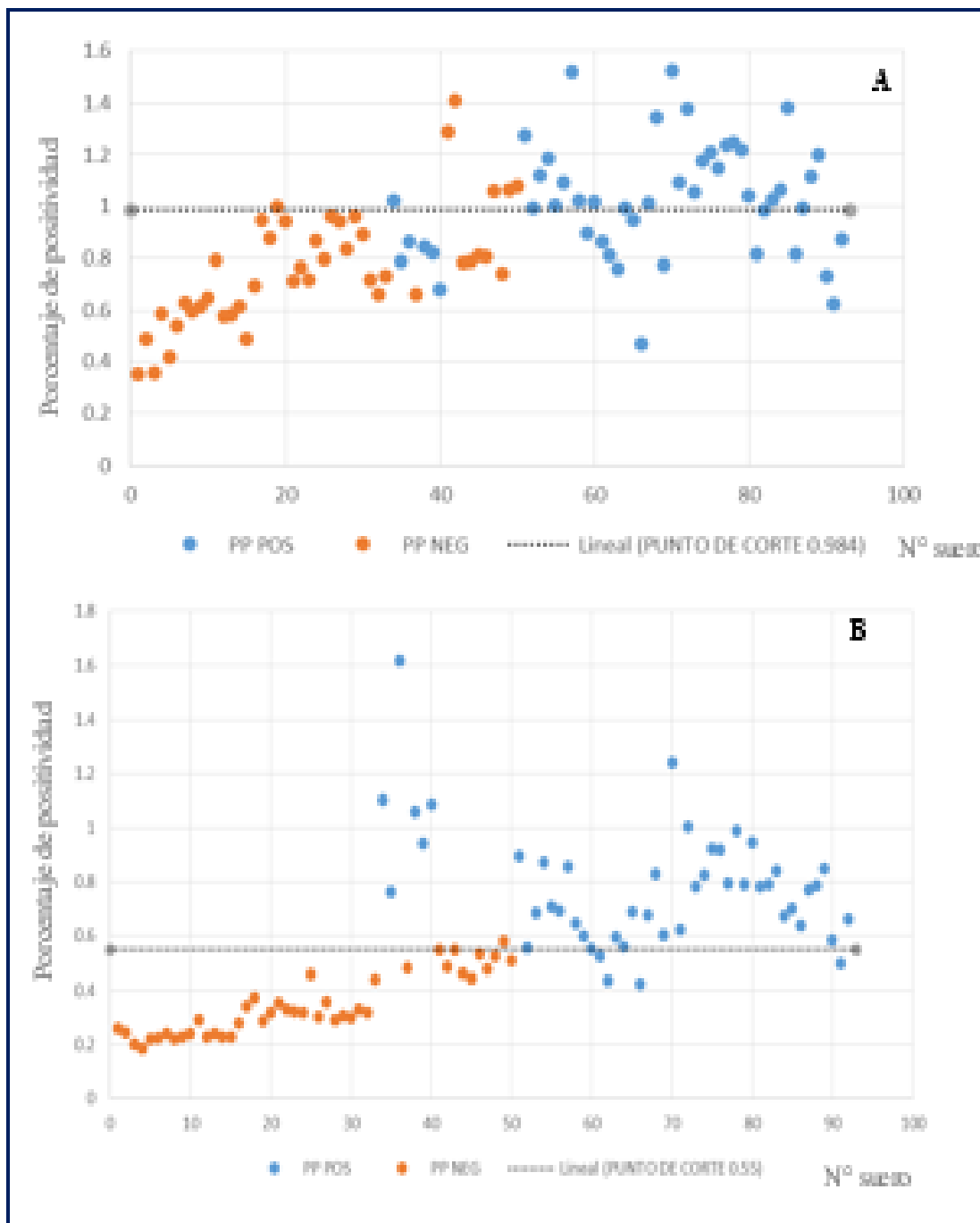


Figura 22. Dispersión del porcentaje de positividad de la prueba de ELISA usando la proteína 14-3-3 zeta. A: Expresión en *E. coli*. B: Expresión en CIB.

- **Determinación de la sensibilidad y especificidad usando el punto de corte basado en el NC-cut off**

E. coli. Para la proteína 14-3-3 épsilon, los puntos de corte obtenidos por placa estuvieron comprendidos entre 0.2099-0.3072 (Tabla 4), permitiendo obtener una sensibilidad/especificidad de 85.42% / 61.36% respectivamente (Tabla 5).

En 14-3-3 zeta, los puntos de corte obtenidos están comprendidos entre 0.262 y 0.296, dando lugar a una sensibilidad y especificidad de 95.83% y 72.73 % respectivamente.

CIB. Para la proteína 14-3-3 épsilon, se obtuvo puntos de corte comprendidos entre 0.10 y 0.15 (Tabla 4), obteniendo 81.25% de sensibilidad y 95.45% de especificidad.

En caso de 14-3-3 zeta, se obtuvo puntos de corte comprendidos entre 0.09 y 0.11, obteniendo 100% de sensibilidad y 70.45% de especificidad (Tabla 5).

Tabla 4. Puntos de corte obtenidos a partir de controles negativos

PROTEINA	N° PLACA	PROMEDIO CONTROLES NEGATIVOS	3 (DESVIACION ESTANDAR)	PUNTO DE CORTE
14-3-3 épsilon <i>E. coli</i>	1	0.2154	0.092	0.3072
	2	0.1498	0.0600	0.2099
	3	0.2059	0.0844	0.2904
14-3-3 zeta <i>E. coli</i>	1	0.1831	0.080	0.2628
	2	0.1894	0.1038	0.2932
	3	0.1828	0.1137	0.2966
14-3-3 épsilon CIB	1	0.1033	0.054	0.1572
	2	0.0814	0.048	0.1296
	3	0.0718	0.0318	0.1037
14-3-3 zeta CIB	1	0.0810	0.032	0.1132
	2	0.0727	0.02585	0.0985
	3	0.0799	0.02561	0.1055

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad de 14-3-3 épsilon y zeta expresadas en *E.coli* y en CIB según el porcentaje de positividad y NC-Cut off

		<i>E. coli</i>		Baculovirus	
PUNTO DE CORTE	ESTIMADO	14-3-3 épsilon	14-3-3 zeta	14-3-3 épsilon	14-3-3 zeta
PORCENTAJE DE POSITIVIDAD	Sensibilidad	89.58	85.42	91.67	91.67
	(%)	(95% IC: 80.94 -98.22)	(95% IC: 49.96 -77.84)	(95% IC: 83.85 -99.49)	(95% IC: 83.85 -99.49)
	Especificidad	61.36	65.90	93.18	97.93
	(%)	(95% IC: 46.97 -75.75)	(95% IC: 72.64 -94.83)	(95% IC: 85.73 -100)	(95% IC: 93.14 -100)
NC – CUT OFF	Sensibilidad	85.42	95.83	81.25	100.00
	(%)	(95% IC: 75.44 -95.4)	(95% IC: 90.17 -100)	(95% IC: 70.21- 92.29)	(95% IC: 97.79- 100)
	Especificidad	61.36	72.73	95.45	70.45
	(%)	(95% IC: 46.97- 75.75)	(95% IC: 59.57 - 85.89)	(95% IC: 89.29 -100)	(95% IC: 56.97 -83.93)

IC: Intervalo de confianza

Los estimados más altos de sensibilidad se obtuvieron con las proteínas expresadas en CIB, sin embargo estos no fueron estadísticamente diferentes de los estimados de sensibilidad con las proteínas expresadas en *E. coli* ($p>0.05$, McNemar Exacto Test) (Tabla 6). Igualmente, los estimados de especificidad fueron mejores en las proteínas expresadas en CIB, sin embargo dichos estimados sí fueron estadísticamente diferentes de las especificidades obtenidas con las proteínas expresadas en *E. coli* ($p\leq 0.01$, McNemar Exacto Test) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de las sensibilidades y especificidades según el sistema de expresión.

	Punto de corte	14-3-3 épsilon			14-3-3 zeta		
		<i>E. coli</i>	CIB	p^*	<i>E. coli</i>	CIB	p^*
SENSIBILIDAD	PP	89.58	91.67	1.000	85.42	91.67	0.4531
	NC-CUTOFF	85.42	81.25	0.7539	95.83	100.00	0.500
ESPECIFICIDAD	PP	61.36	93.18	0.001	65.90	97.93	<0.001
	NC-CUTOFF	61.36	95.45	<0.001	72.73	70.45	1.000

*Test McNemar ($p\leq 0.05$ diferencia estadísticamente significativa)

($p>0.05$ no hay diferencia estadísticamente significativa)

Al comparar los dos criterios utilizados para designar una muestra como positiva o negativa: el porcentaje de positividad (PP) o el punto de corte utilizando los controles negativos (NC-cut-off), el estimado más alto de sensibilidad se obtuvo con la proteína 14-3-3 zeta expresada en CIB (100%) teniendo en cuenta el NC-cut off, sin embargo este no fue estadísticamente diferente a la sensibilidad obtenida por la misma proteína con porcentaje de positividad ($p > 0.05$, McNemar Exacto Test), estos valores tampoco fueron estadísticamente diferentes de los otros estimados.

Por otro lado, los estimados de especificidad fueron mejores en las proteínas expresadas en CIB teniendo en cuenta ambos criterios de punto de corte, dichos estimados no fueron estadísticamente diferentes de las especificidades obtenidas con proteínas expresadas en *E. coli* a excepción de la proteína 14-3-3 zeta expresada en CIB, ya que la especificidad obtenida con NC-cut off es mucho menor que la obtenida con porcentaje de positividad ($p \leq 0.01$, McNemar Exacto Test) (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de las sensibilidades y especificidades según el punto de corte

PROTEÍNA		<i>E. coli</i>			CIB		
		PP	NC	<i>p</i> *	PP	NC	<i>p</i> *
14-3-3 épsilon	Sensibilidad	89.58	85.42	0.625	91.67	81.25	0.0625
	Especificidad	61.36	61.36	1.000	93.18	95.45	1.000
14-3-3 zeta	Sensibilidad	85.42	95.83	0.0625	91.67	100	0.125
	Especificidad	65.90	72.73	0.629	97.93	70.45	0.001

PP: Porcentaje de positividad **NC:** NC-Cut off

Test Mcnemar ($p \leq 0.05$ diferencia estadísticamente significativa)

($p > 0.05$ no hay diferencia estadísticamente significativa)

Repetitividad

Los coeficientes de variabilidad (CV) fueron menores al 15% en cada una de las proteínas, tanto en el sistema de *E. coli* como en CIB.

CURVAS ROC

Las curvas ROC (Figura 23) obtenidas para las proteínas expresadas en *E. coli* indicando una baja capacidad discriminativa del test ya que presenta un área bajo la curva alrededor de 80%, valor cercano a la línea de referencia en comparación a las curvas ROC obtenidas para las proteínas expresadas en CIB muestran un área bajo la curva alrededor del 98%, es decir un valor lejano a la línea de referencia, indicando que la capacidad discriminativa del test que emplea estas proteínas como antígenos, es alta y la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.001$, Chi² Test, en ambos casos)

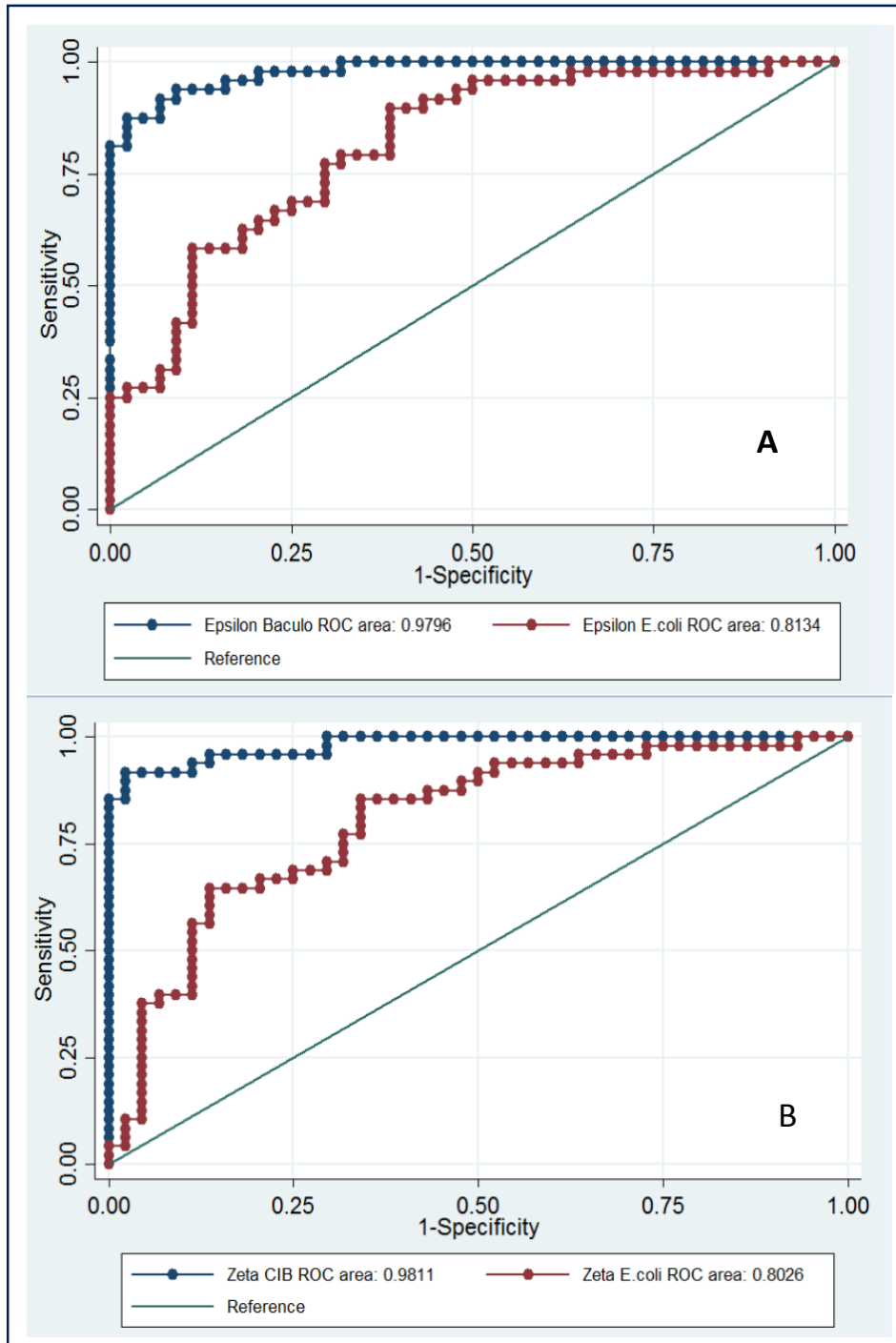


Figura 23. Curvas ROC de las proteínas 14-3-3 épsilon y 14-3-3 zeta expresadas en *E. coli* y en CIB. **A:** Proteína 14-3-3 épsilon **B:** Proteína 14-3-3 zeta

V. DISCUSION

Esta investigación tuvo como propósito evaluar las proteínas recombinantes 14-3-3 épsilon y zeta de *T. solium* como posibles antígenos de diagnóstico utilizando la técnica ELISA. Los resultados muestran que las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta expresadas en CIB presentan mayor sensibilidad/especificidad (91.67/93.18 y 91.67/97.93 respectivamente) en comparación con las proteínas expresadas en *E. coli*. Estos resultados corroboran los hallazgos de otros trabajos en distintos países que muestran la utilidad de la técnica de ELISA como método de diagnóstico de cisticercosis (46,47,48). Así tenemos que el estudio de Pinto y col., obtiene sensibilidad de 80% y especificidad de 100 % (46), mientras que Sreedevic, obtiene sensibilidad de 96% y especificidad de 96% (48), otros estudios fluctúan entre estas cifras, siendo también de utilidad (46).

La prueba de ELISA, como método de diagnóstico, fue evaluado debido a que es más accesible en cuanto a la tecnología comparado a los métodos usados actualmente para diagnosticar cisticercosis: Western Blot y resonancia magnética. El Western Blot de las glicoproteínas posee alta sensibilidad (91%) y especificidad (100%) (49).

Las proteínas recombinantes, usadas como antígenos, fueron obtenidos en un sistema de expresión procariote (*E. coli*) y eucariote (CIB). En el sistema eucariote las proteínas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales (53). Sin embargo, en este sistema, se obtienen proteínas en baja concentración, Miranda y col. obtuvieron sus proteínas recombinantes a 400µg/mL (70), mientras que Palomares obtuvo 1000µg/mL (71). Las

proteínas recombinantes pueden constituir desde menos del 5% hasta un 70% de la proteína celular y se puede obtener hasta 1000µg/mL (69). En este estudio se obtuvieron concentraciones de 1363µg/mL de 14-3-3 épsilon y 150µg/mL de zeta, concentraciones comparables a las obtenidas en estudios previos pero más bajas en comparación con las obtenidas en *E. coli* (3700µg/mL y 5000µg/mL respectivamente). La baja concentración de las proteínas expresadas en este sistema fue una limitante en la realización de las repeticiones en los ensayos de ELISA.

El obtener las partículas virales también constituye un factor crítico en el sistema baculovirus, en esta investigación se empleó inicialmente un MOI 1, sin obtener expresión de la proteína por lo cual se optó por emplear un MOI 8 para la proteína 14-3-3 épsilon obteniendo resultados positivos en la expresión; esto contrasta con lo recomendado según el manual Bac to Bac, donde se recomienda emplear un MOI de 0.05 a 0.1 para evitar la formación de partículas virales defectivas (40), otros protocolos recomiendan MOI menor de 3 tal como el empleado para 14-3-3 zeta (MOI 2.7) (45). El emplear un MOI muy bajo o alto puede reducir la calidad de los baculovirus, por lo que es necesario optimizar la expresión realizando la determinación del MOI óptimo para cada caso (45).

Por otro lado, la expresión en *E. coli* es simple, rápido, barato, además es de alta utilidad por la facilidad de obtención de grandes cantidades de proteínas (56); esto se ve beneficiado porque las proteínas recombinantes son producidas a nivel citoplasmático permitiendo obtener rendimientos de hasta 80% de la proteína total (57,58), tal como

se evidencia en las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta (3700µg/mL y 5000µg/mL respectivamente). Sin embargo la expresión en *E. coli* presenta algunas desventajas, por ejemplo la rapidez de la expresión a menudo resulta en proteínas mal plegadas (59,60), carece de la maquinaria requerida para realizar ciertas modificaciones post-traduccionales eucariontes tales como las glicosilaciones, importantes para la formación de proteínas activas y plegadas (55, 61).

Las proteínas expresadas en ambos sistemas fueron obtenidas en la fracción soluble en baja concentración por lo que fueron evidenciadas mediante Western Blot, 14-3-3 épsilon (28kDa) y 14-3-3 zeta (27.7 kDa), similar al peso de las proteínas 14-3-3 zeta de *Echicococcus granulosus* y *E. multilocularis* (27 kDa) y para 14-3-3 épsilon de *Schistosoma mansoni* (28kDa) (12, 37, 36).

En la estandarización del inmunoensayo ELISA desarrollado en esta investigación, se muestran que los promedios de sueros positivos son aproximadamente tres veces más que los sueros negativos, estas proporciones fueron obtenidas en base a los valores de densidad óptica obtenidos en cada uno de los ensayos.

A pesar de obtener elevada sensibilidad y especificidad (mayores al 90%), las densidades ópticas reflejan valores bajos que posiblemente limiten el empleo de estos antígenos recombinantes en una población mayor para discriminar sueros positivos de negativos. Estos resultados se deben posiblemente a la estandarización realizada, ya que se realizó la estandarización de antígeno, anticuerpo primario y secundario pero no se estandarizó las condiciones de los demás parámetros como son: placas de

microtitulación, diferentes bloqueantes (BSA 3%, leche 5%, etc), concentración de sustrato (65). Esto no fue posible debido a la poca disponibilidad de sueros y la baja concentración de proteína que limitaron la repetición de los ensayos. La estandarización completa posiblemente aumente la densidad óptica de los sueros positivos contribuyendo a una mejora en la proporción obtenida en cada ensayo.

Asimismo la falta de optimización de la expresión de las proteínas expresadas en CIB, la procedencia y tiempo de almacenamiento de la seroteca (2 años aproximadamente), así como el número de quistes presentes en cada cerdo del cual fue obtenido el suero, podrían ser factores que contribuyen a los valores bajos de las densidades ópticas, por lo que ensayos de ELISA empleando quimioluminiscencia son una alternativa que permitiría incrementar la sensibilidad del ensayo cien veces más cuando se compara con un ensayo colorimétrico (62). Los inmunoensayos fluorescentes resultan ser otra alternativa, los cuales son ligeramente más sensibles que ELISA colorimétrico, permitiendo obtener mejores resultados (63).

Los valores para el coeficiente de variación, según lo reportado por la literatura deben ser menores del 10% (64); sin embargo existen referencias donde se reporta un valor aceptable entre 15-20 %, por lo tanto los resultados concuerdan con este planteamiento (65,66).

Según el porcentaje de positividad (PP), los resultados muestran que las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta expresadas en CIB presentan mayor sensibilidad/especificidad (91.67/93.18 y 91.67/97.93, respectivamente), comparadas con las proteínas

expresadas en *E. coli* (89.58/61.36 para 14-3-3 épsilon y 85.42/65.90 para 14-3-3 zeta), éstos resultados podrían deberse a las glicosilaciones presentes en las proteínas expresadas en CIB, ya que estudios atribuyen a la glicosilación como un nivel adicional de especificidad en diversas interacciones proteicas (51,52).

A pesar de la diferencia de al menos 3% en los valores de sensibilidad no se encontró diferencia estadísticamente significativa; sin embargo las especificidades muestran $p < 0.001$, indicando que las proteínas expresadas en CIB permiten identificar mejor como casos negativos a los casos realmente sanos (65).

Con respecto al NC-Cut off, la proteína 14-3-3 zeta de ambos sistemas presenta mayores porcentajes de sensibilidad (100% y 95.83%) siendo la proteína expresada en CIB la de mejores resultados; sin embargo la especificidad disminuye hasta un 70.45%, discordando con su homóloga según el PP, probablemente debido a que la sensibilidad y especificidad se encuentran generalmente inversamente relacionados, mientras que el PP permite seleccionar un punto de corte que maximice tanto la sensibilidad y especificidad a la vez (46, 65).

La proteína 14-3-3 épsilon expresada en *E. coli* presenta mayor porcentaje de sensibilidad (85.42%) pero su especificidad fue 61.36%, sin embargo la especificidad de la proteína expresada en CIB presenta mejor porcentaje (95.45%) en comparación con las demás proteínas. Las sensibilidades en ambos sistemas no muestran diferencia estadísticamente significativa, pero la especificidad de la proteína 14-3-3 épsilon

muestra $p < 0.001$ indicando que la proteína expresada en CIB identifica mejor los realmente sanos.

El hecho que diferencias en los estimados de sensibilidad de hasta 5% no fueron significativas puede deberse al número limitado de muestras con la que se contó. Al comparar las sensibilidades y especificidades obtenidas según el punto de corte, se determinó que no se muestra diferencia estadísticamente significativa en las sensibilidades, indicando que empleando cualquiera de los dos puntos de corte permite obtener resultados adecuados.

La especificidad de un antígeno también se ve determinada por el enfrentamiento del antígeno con sueros infectados con otros parásitos presentes en el mismo hospedero. En este estudio no se realizaron ensayos de reacción cruzada por la limitante de no disponer con sueros de cerdo con otros parásitos; sin embargo Masmela y col. (32) reportaron que la proteína 14-3-3 de *T. solium* no genera reacción cruzada con sueros de cerdos infectados con quiste hidatídico (causada por *Echinococcus granulosus*), sugiriendo que podría ser un antígeno candidato para diferenciar entre estas dos enfermedades zoonóticas (32).

La importancia en un test de diagnóstico es determinar la capacidad que tiene para discriminar un verdadero positivo y negativo, por lo que se obtuvo las curvas ROC, mostrando la relación entre verdaderos positivos (sensibilidad) y falsos positivos (1-especificidad) (Figura 23), determinando en cada caso el índice de Youden, indicando que las proteínas expresadas en CIB presentan un área bajo la curva (0.84 y 0.89

respectivamente) mayor que las proteínas expresadas en *E. coli* (0.50 y 0.51) permitiendo así una adecuada clasificación entre verdaderos positivos y ningún falso positivo (68). Los puntos por encima de la diagonal muestran que las proteínas expresadas en CIB permiten clasificar mejor los verdaderos positivos de los falsos positivos (50).

Los análisis estadísticos realizados permitieron concluir que la sensibilidad y la especificidad del sistema desarrollado son superiores al 90 %, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para este tipo de ensayo; aunque en esta investigación emplea un valor menor de concentración de antígeno (2,5 – 5ng/μl) con respecto al sistema de referencia utilizado actualmente (Western Blot 25 – 50 ng/μl) (15).

VI. CONCLUSIONES

- La proteína 14-3-3 zeta expresada en baculovirus genera valores altos de sensibilidad y especificidad (91.67% y 97.93% respectivamente) al evaluar con sueros individuales de cerdos; por lo cual esta proteína recombinante es candidato potencial para su uso como antígenos en pruebas de inmunodiagnóstico de la cisticercosis porcina.
- El sistema de expresión eucarionte CIB, es complejo, de elevado costo y capacitación pero contrarresta la limitante de otros sistemas de expresión en cuanto a la generación de modificaciones post-traduccionales.
- Las densidades ópticas bajas obtenidas en la estandarización podrían deberse a diversos factores como la estandarización realizada, tiempo de almacenamiento de sueros, entre otros.

VII. RECOMENDACIONES

- Emplear un conjugado ligado a un fluoróforo con el fin de aumentar la proporción de sueros positivos sobre negativos
- Realizar ensayos de reacción cruzada para verificar especificidad de las proteínas 14-3-3 épsilon y zeta de *T. solium* empleando sueros de cerdos con otros parásitos (*Ascaris spp.*, *Cysticercus tenuicollis*, cisticerco hidatídico de *Echinococcus spp.*)

- Emplear un mayor número de muestras de suero positivo y negativo, para poder tener una mejor idea de la eficacia de ELISA como método de diagnóstico.
- Estandarizar todos los parámetros en los ensayos de ELISA a fin de obtener una mejora en las proporciones entre positivos y negativos.

VIII. LIMITANTES

- La falta de optimización en la expresión en CIB posiblemente dio lugar a la obtención de proteína en baja concentración.
- Los sueros problemas fueron obtenidos de una seroteca obtenidas de investigaciones anteriores, considerando un número reducido de los mismos.
- La falta de sueros de cerdo con otros parásitos no permitieron los ensayos de reacción cruzada para cada una de las proteínas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology*. 2005;116(3):271-278.
2. Correa-Beltrán D, Morales-López Z, Medina-Flores Y, García Domínguez C, Medina-Escutia E, Mandujano-Martínez A et al. Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*: Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos. *Publicación Técnica del INDRE No. 4*; 1991.
3. Barriga O. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Santiago de Chile: Germinal; 2002. p. 260.
4. García H, González A, Gilman R. Diagnóstico, tratamiento y control de la cisticercosis por *Taenia solium*, *Journal Current Opinion in Infectious Diseases*; 2003;16:411-19
5. Carhuallanqui P. M, López U. T, González Z. A, Angulo J. C. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en cuatro caseríos del distrito de omia, amazonas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2010;21(1).
6. Ayvar P. Seroprevalencia de cisticercosis porcina en las villas de Nueva Esperanza, Matapuquio y Turpo en la provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac. *Universidad Mayor de San Marcos*; 2002.
7. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de Salud (OMs). *Epidemiología y control de la teniasis-cisticercosis en América Latina*. Versión 3.0. REF: PNSP/91-28; 1994.

8. Agudelo FP, Palacio LG. Dot blot para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2009;28(3):1077-1084.
9. Mahajan R, Chitkara N, Chopra J. Evaluation of cysticerous and adult worm antigens in serodiagnosis of cisticercosis. *The Indian journal of medical research.* 1974;62(9):1310-3.
10. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cisticercosis. *Acta Tropica.* 2003;87(1):79-86.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Morales-Montor J, Hernández-Bello R, Larralde C. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to Focus on the Challenge. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011;2011:1-11.
12. Siles-Lucas M. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends in Parasitology.* 2003;19(12):575-581.
13. Gonzáles G. Dinámica de la transmisión de la cisticercosis porcina. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (SIRIVS). Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
14. Manual de animales terrestres (OIE). 7ª edición; 2012
15. Escalante H, Pereda F, Sánchez M, Schulz H, Torres P, Davelois K. Pacientes neurológicos del noroeste del Perú con serología positiva por Western Blot a la larva de *Taenia solium*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2004;21(2).

16. González A, Gavidia C, Gilman R, García H, Falcón N, Bernal T. Tratamiento de la cisticercosis porcina. En: Teniasis/Cisticercosis por *T. solium*. Sección I, editado por García, H.H y S.M. Martínes. Editorial universo S.A. Lima Perú;1996.
17. Gil A, Samartino L. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discussion Paper N°2; 2001;34-36
18. Flisser A, Plancarte A, Avila G. Aplicación de métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniasis a estudios epidemiológicos. En: Taeniasis-cisticercosis por *Taenia solium*. García HH, Martínez SM. Lima: Ed. Universo.1996;17-31.
19. Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud pública México, Cuernavaca. 1997;39(3).
20. Flisser A. Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. Gaceta Médica de México.1987;123:7-8.
21. García H, González A. Teniasis por *Taenia solium*. Diagnóstico. 2000;29:176-178.
22. Daza J. Informe sobre caracterización y determinación de la exposición a leptospirosis – cisticercosis en los distritos de Omía, Chirimoyo y Huambo – provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas, Perú: Ministerio de Salud; 2004.
23. García H, Gonzalez A, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang C, Gilman R. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.2010;27(4):592-597.

24. González A. Evaluación del diagnóstico de la cisticercosis porcina por los métodos de Electroinmunotransferencia (EITB), ELISA y examen de lengua. Tesis post Grado. Escuela de Post-grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 1993;64.
25. Gilman R, García H, González A et al. Métodos para controlar la transmisión de la cisticercosis. En Teniasis-Cisticercosis por *Taenia solium*. Sección III. 1° Edición. Editado por HH García/ S.M. Martínez. Editorial Universo. Lima Perú;1996.
26. Tsang V y García H. Immunoblot diagnostic test (EITB) for *Taenia solium* cysticercosis and its contribution to the definition of this under-recognized but serious public health problem. In Taeniasis-Cisticercosis by *Taenia solium*. Section III. 2da edition. Edited by HH García/ SM Martínez. Editorial Universo. Lima;1999.
27. Santamaria E, Plancarte A, de Aluja A. The Experimental Infection of Pigs with Different Numbers of *Taenia solium* Eggs: Immune Response and Efficiency of Establishment. *The Journal of Parasitology*. 2002;88(1):69.
28. Sciutto E, Martínez J, Villalobos N, Hernández M, José M, Beltrán C et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Veterinary Parasitology*. 1998;79(4):299-313.
29. Bueno E, Scheel C, Vaz A, Machado L, Livramento J, Takayanagu O et al. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(3):278-83.

30. Wilson M, Bryan R, Fried J, Ware D, Schantz P, Pilcher J et al. Clinical Evaluation of the Cysticercosis Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot in Patients with Neurocysticercosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;164(5):1007-1009.
31. Zhang Y, Bickle Q, Taylor M. Cloning of *Schistosoma japonicum* 14-3-3 epsilon (Sj14-3-3ε), a new member of the 14-3-3 family of proteins from schistosomes. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(9):991-994.
32. Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio J, Mendoza G, Rosas G d, Estrada K, Carrero J, Sciutto E y col. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: Identification of candidate antigens through immunoproteomics. *The Veterinary Journal*; 2013(198):656–660
33. McGonigle S, Loschiavo M, Pearce E. 14-3-3 Proteins in *Schistosoma mansoni*; identification of a second epsilon isoform. *International Journal for Parasitology*. 2002;32(6):685-693.
34. Li Z, Wang Y, Wang Q, Zhao W. *Echinococcus granulosus* 14-3-3 protein: a potential vaccine candidate against challenge with *Echinococcus granulosus* in mice. *Biomed Environ Sci*. 2012;25(3):352-8.
35. Moghadam Z, Ghaffarifar F, Khalilpour A, Abdul Aziz F, Saadatnia G, Noordin R. IgG4 Detection of *Echinococcus granulosus* Paramyosin Is a Useful Diagnostic Test for Human Hydatidosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013;20(4):501-505.
36. Yang X, Lee W, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson C, Grossmann J et al. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(46):17237-17242.

37. Matsumoto J, Müller N, Hemphill A, Oku Y, Kamiya M, Gottstein B. 14-3-3- and II/3-10-gene expression as molecular markers to address viability and growth activity of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology*. 2005;132(01):83.
38. Chung J, Bahk Y, Huh S, Kang S, Kong Y, Cho S. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *Journal of Infectious Diseases*.1999;180:1307-1315.
39. Lee E, Lee M, Chung J, Je E, Bae Y, Na B et al. Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(12):919-926.
40. Invitrogen. Manual Bac-to-Bac® Baculovirus Expression;2010. En línea https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
41. Náquira J. *Taenia solium*: Biological cycle and Characteristics. *Teniasis-Cysticercosis by Taenia solium*. HH García and SM MArtínez. Lima, Ed. Universo;1999:7-14.
42. Tsang V, Brand J, Boyer A. An Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay and Glycoprotein Antigens for Diagnosing Human Cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases*. 1989;159(1):50-59.
43. García H, Gilman R, González A, Pacheco R, Verástegui M, Tsang V. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). Human and porcine *Taenia solium* infection in a villaje in the highlands of Cusco, Perú. *Acta Tropical*.1999b;73: 31-36.

44. García H, Gilman R, González A, Verástegui M. The Cysticercosis working Group in Peru (CWG). Epidemiology of *Taenia solium* infection in Peru. En: Taeniasis-Cisticercosis by *Taenia solium*. Section III. 2a ed. HH. García & SM Martínez. Ed. Universo;1999a.
45. Litts J. Manual for baculovirus techniques;2000. Disponible en URL: http://www.baculovirus.com/protocols/hi_moi_infections.htm
46. Pinto P, Vaz A, Germano P, Nakamura P. ELISA test for the diagnosis of cisticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cisticercosis. Revista Inst. Medicina Tropical. 2000;42(2):71-9
47. Singh A, Singh S, Prasad K, Baipai A, Rahman M, Rai R, Gupta R, Tripathi M, Husain N. Evaluation of ELISA, neck muscle, tongue and eyelid examinations for the diagnosis of swine cysticercosis in a highly endemic área of north India. Experimental parasitology. 2013;134(3):313-7.
48. Sreedevi C, Hafeez M, Subramanyam K, Anand K, Chengalua R. Development and evaluation of flow through assay for detection of antibodies against porcine cysticercosis. Tropical Biomedecine. 2011;28(1):160-70.
49. Huapaya P, Espinoza Y, Huiza A, Sevilla C. Estandarización de la técnica de ELISA para diagnóstico de estrongiloidiosis. ISSN 1025-5583. 2002;63(3):179-184.
50. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Revista chilena infectología [Internet]. 2012 Abr [citado 2016 Jun 06]; 29(2): 138-141. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200003&lng=es.

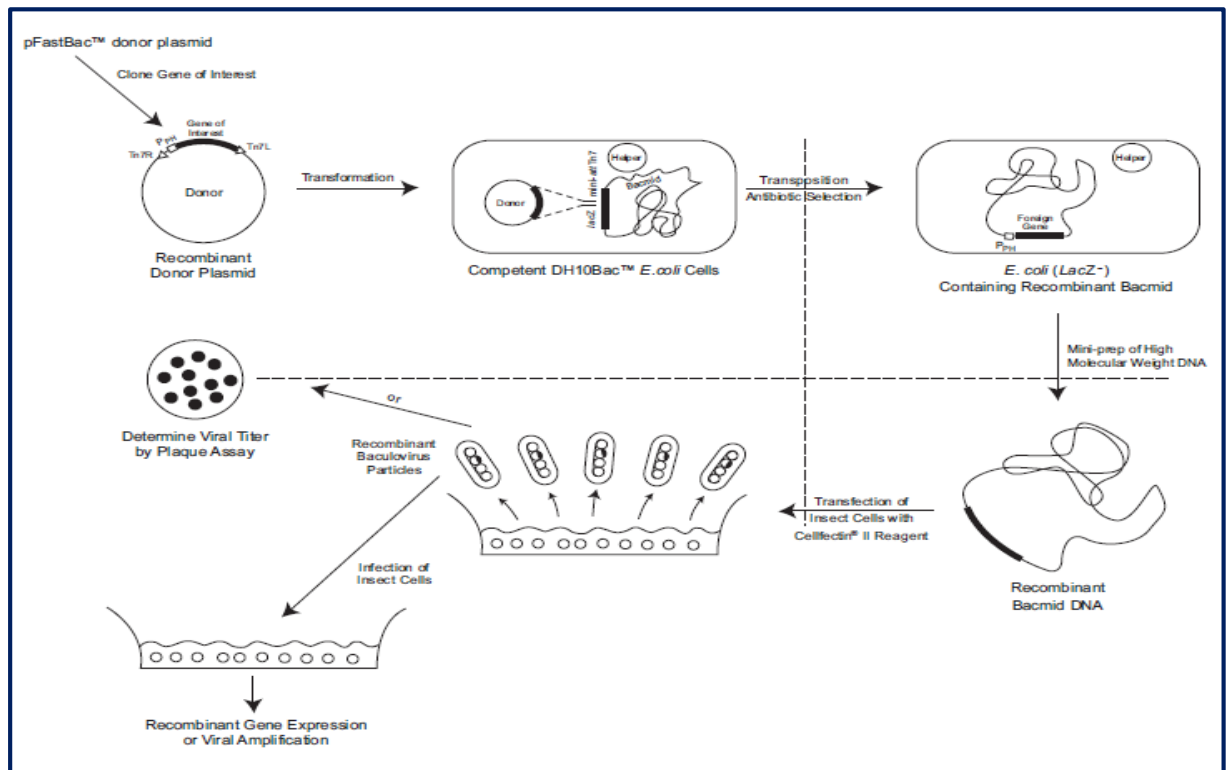
51. BiotechSpain. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes (II). Organismos productores. PDF obtenido de BiotechSpain. Disponible en URL: https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=expresion_proteinas_recombinantes_ii; 2016.
52. Rinas U, Hoffmann F, Betiku E, Estapé D, Marten S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*;2007;127(2):244-257.
53. Osz-Papai J, Radu L, Abdulrahman W, Kolb- Cheynel I, Troffer-Charlier N et al. Insect Cells–Baculovirus System for the Production of Difficult to Express Proteins.2015;1258:181-194.
54. Rosano G, Ceccarelli E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*;2014.
55. Brondyk W. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in Enzymology*;2009(463).
56. Lisowska E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. *CMLS cellular and molecular life sciences journal*;2002(59):445–455.
57. Ramón A, Señorale-Pose M y Marin M. Inclusion bodies: not that bad. *Frontiers in Microbiology, Uruguay*;2014.

58. Rudolph R, y Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. The FASEB Journal. 1996;10.
59. Francis D, Page R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. Brown University, Providence, Rhode Island. Current Protocols in Protein Science;2010.
60. Voet D, Voet J, Pratt C. Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry. Editorial Médica Panamericana; 2007:101-104.
61. Walsh C. Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory. Englewood, Colo: Roberts and Co. Publishers;2006(21):490.
62. Tuan Vo-Dinh. Biomedical Photonics Handbook. Editor-in-Chief. 2003.
63. Corning J. Selecting the Detection System - Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods. ELISA Technical Bulletin - No. 5
64. Taddie P, Butman B, Jones G. Quantitation of Lp(a) particles containing various isoforms using a monoclonal anti-apo(a) capture and a polyclonal anti-apo B detection antibody sandwich ELISA. Clin Chem 1993;39(7):1359-66.
65. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Principios de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosa. 2006(1).
66. Murillo C, Díaz C. Lorenzana P. Nicholls S, Corredor A. Detección de antígenos de la larva de *Taenia solium* mediante la técnica de ELISA. Revista colombiana de Química, Bogotá-Colombia. 1993;22(1)
67. Trajman A, Luiz R. McNemar chi² test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.2008;68(1):77-80.

68. Powers D. "Evaluation: From Precision, Recall and F-Score to ROC, Informedness, Markedness & Correlation". *Journal of Machine Learning Technologies*. 2011(1):37–63
69. Palomares L, Estrada S, Ramirez O. Principles and applications of the insect cell-Baculovirus expresion vector system. *Cell culture technology for pharmaceutical and celular therapies*, Nueva York. 2002
70. Miranda E, Murillo M, Cossío R. Uso del sistema de expresión de genes heterólogos basado en Baculovirus en la generación de un antígeno híbrido recombinante útil en el inmunodiagnóstico de la hemoncosis de rumiante. *Revista Bioquímica* 2007:32(3).
71. Palomares L. Aplicaciones de la bioingeniería en la producción de proteínas recombinantes por células de insecto. *Biotecnología*. 2001. 9(2).

ANEXOS

Anexo 1: Esquema del sistema de expresión en Baculovirus



Anexo 2: Transformación con reacción de ligación en *Escherichia coli* (Novablue)
empleando choque térmico

Las células competentes *E. coli* (Novablue) fueron incubadas en hielo por 10 min.

- Añadir al tubo 5 ul de la reacción de ligación plásmido pET28a-pncA
- Dejar en hielo por 30 min, luego colocar los tubos en un baño María a 42°C por 1 min. Retirarlo y dejarlo en hielo picado por 2 min.
- Agregar 1000 µL de medio SOC estéril e incubar a 37°C por 1 hora.
- Incubar los tubos a 37°C por 1 hora en agitación a 225 rpm.
- Centrifugar los tubos a 6,000 rpm por 5 min
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 uL de caldo SOC.
- Sembrar 80 µL en placas con agar LB + kanamicina (40 µg/ml) con un asa de Driglasky (usar etanol para desinfectar el sembrador).
- Incubar al menos 24 horas a 37°C.

Anexo 3: Extracción de plásmidos mediante lisis alcalina

- Colonias transformantes fueron sembradas en 5 mL de medio LB con ampicilina (40 ug/mL) e incubados a 37 °C overnight en agitación constante (2500 rpm).
- 1.5 mL de cultivo fue centrifugado a 13000 por 5 min, el pellet fue resuspendido en 150 µL de solución I frío con la ayuda del vortex. Luego se agregó 300 µL de la solución II mezclando las soluciones por inversión y se incubó a T° ambiente por 5 min.
- Se agregaron 225 µL de la solución III (enfriada previamente en hielo). Y se incubó por 5 min luego se centrifugó a 13000 rpm por 5 min.
- Al sobrenadante obtenido se le agregó un volumen igual de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamil (25:24:1), mezclando por inversión y luego centrifugando a 13000 rpm por 5 min. La fase acuosa obtenida fue transferida a un tubo de microcentrífuga nuevo al cual se le agregó un volumen igual de Cloroformo:Alcohol Isoamil (24:1).
- Los tubos fueron centrifugados a 13000 por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregó 2 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos a -20 °C. Se centrifugados a 12000 rpm por 5 min descartándose el sobrenadante. Los pellets de ADN plasmídico fueron lavados con 1 mL de etanol al 70%, hasta dejar secar el pellet. El ADN plasmídico fue resuspendido en 40 µL de buffer EB.

Reactivos de Lisis Alcalina

Solución I	Solución II	Solución III
<ul style="list-style-type: none">• 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	0.2 N NaOH	5 M Acetato de Potasio
<ul style="list-style-type: none">• 10 mM EDTA (pH 8.0)	1 % SDS	Ácido Acético glacial
		H2O

Anexo 4: Preparación de Medio Grace para trasfección en células de insectos Sf9

En una cabina de flujo laminar, disolver el contenido Grace's Insect Cell Culture (Gibco) liofilizado en un frasco conteniendo 800mL de agua destilada autoclavada

Agregar 0.35 gr Bicarbonato de Sodio, 20mL Suero fetal bovino (Hyclone), 20mL de lactoalbúmina (Lactalbumin Hydrolysate 50x-Sigma), 20mL de Yeastolate (Yeastolate Ultrafiltrate 50x-Gibco) y 10mL de Antibiotico-Antimicótico 100x (Gibco)

Ajustar el pH 6 con NaOH 10M y enrasar a 1 litro de volumen con agua destilada autoclavada. Filtrar el medio empleando membrana de filtración 0.45 μm y luego con una membrana de 0.22 μm .

Alicuotar el medio para evitar contaminación posterior. Sellar herméticamente el envase y almacenar a 4°C hasta su uso.

NOTA: Mantener condiciones de esterilidad durante todo el proceso de preparación del medio