



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**Evaluación de la capacidad antigénica de
proteínas expuestas/inmunogénicas de
cisticerco de *Taenia solium*, para su
potencial uso en el inmunodiagnóstico de
cisticercosis**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

Liendo Picoaga, Ruddy Jamphiel

LIMA – PERÚ
2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis padres Lidia y Alberto porque están guiándome y apoyándome constantemente en cada uno de los pasos que doy en la vida, los amo mucho.

A mi asesor de Tesis el Dr. Mirko Zimic y mis profesores Dra. Patricia Sheen y Dra. Mónica Pajuelo por sus consejos para el desarrollo del presente trabajo de Tesis, por su apoyo constante en el trabajo de laboratorio.

A Nancy León por aconsejarme y guiarme en los diferentes ensayos, por sus ideas y aportes en los protocolos realizados en el presente trabajo, agradezco a Yesenia Castillo por su apoyo en el envío de muestras de sueros para el análisis en el Instituto de Ciencias Neurológicas.

Al Grupo de Cisticercosis del Perú por las muestras de suero brindadas para realizar el presente trabajo de Tesis, también a mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular por sus consejos y apoyo en los ensayos de laboratorio.

A mi hermano Bill por sus consejos y apoyo en todo. A mi familia por acompañarme a cada instante.

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

RESUMEN

Se evaluó la capacidad antigénica de cinco proteínas recombinantes (Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina, Tetraspanina 7) expresadas en el sistema procariótico *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys; estos antígenos pertenecen al sistema excreción y secreción (E/S) de las oncosferas de *Taenia solium* a excepción de Multiepitópica 1 que es una proteína diseñada *in silico* a partir de proteínas de alta exposición cuya secuencia fue sintetizada posteriormente. Se evaluó su potencial uso en el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina y humana mediante un ensayo de ELISA indirecto. Para el inmunodiagnóstico con sueros de cerdo, se estandarizó correctamente el ensayo de ELISA convencional mediante el tablero de titulación, utilizando cada uno de los antígenos con sueros de cerdos controles e infectados. El ensayo de ELISA con sueros individuales mostró alta sensibilidad y especificidad para el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina, siendo Tetraspanina 7 el antígeno con mayor sensibilidad (93.62%) y especificidad (97.73%). Para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis humana, se estandarizó la unión de cada proteína por su cola de seis histidinas, se realizó un ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺², mostrando buenos resultados en la estandarización con dos antígenos (Multiepitópica 1 y Tripsina).

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Taenia solium*, Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina, Tetraspanina 7, nanopartículas.

ABSTRACT

The antigenic capacity of five recombinant proteins (Cathepsin-L, Enolase, Multiepitopic 1, Trypsin, Tetraspanin 7) expressed in the prokaryotic system *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLys was evaluated; these antigens belong to the Excretion and Secretion system (E/S) of *Taenia solium* oncosphere, except for Multiepitopic 1 which is a protein designed *in silico* from high exposure proteins and the synthesized later. Their potential use in the immunodiagnosis of human and porcine Cysticercosis was evaluated by an indirect ELISA. For the immunodiagnosis with pig sera, the standard ELISA was correctly standardized by the titration board, using each of the antigens with sera from control and infected pigs. The ELISA test with individual sera showed high sensitivity and specificity for the immunodiagnosis of porcine cysticercosis, Tetraspanin 7 being the antigen with highest sensitivity (93.62%) and specificity (97.73%). For the immunodiagnosis of human Neurocysticercosis, the binding of each protein by its six histidine tail was standardized, an ELISA test was performed with cobalt⁺² functionalized magnetic nanoparticles, showing good results in the standardization with two antigens (Multiepitopic 1 and Trypsin).

Keywords: *Escherichia coli*, *Taenia solium*, Cathepsin-L, Enolase, Multiepitopic 1, Trypsin, Tetraspanin 7, nanoparticles.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1. Planteamiento del problema.....	3
2.2. Marco Teórico.....	5
2.2.1. <i>Taenia solium</i>	5
2.2.2. Teniasis	7
2.2.3. Cisticercosis	8
2.2.3.1. Cisticercosis porcina	8
2.2.3.2. Cisticercosis humana.....	8
2.2.4. Antígenos candidatos alternativos para inmunodiagnóstico de cisticercosis	9
2.2.4.1. Catepsina-L	9
2.2.4.2. Tetraspaninas.....	10
2.2.4.3. Enolasa	10
2.2.4.4. TsAg5.....	11
2.2.5. Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto ⁺² (Dynabeads) para la inmovilización de antígenos e inmunodiagnóstico	12
2.3. Estudios Preliminares.....	13
2.4. Justificación del Estudio	13
2.5. Hipótesis.....	14
2.6. Objetivos de la Investigación	15
2.6.1. Cisticercosis Porcina	15
2.6.2. Neurocisticercosis Humana.....	15
III. METODOLOGÍA	17
3.1. Muestras de suero.....	17
3.1.1. Muestras de sueros de cerdo	17

3.1.2.	Muestras de suero humano.....	17
3.2.	Procedimientos y Técnicas.....	18
3.2.1.	Extracción de plásmidos y transformación	18
3.2.2.	Expresión de las proteínas recombinantes Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7 en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys.....	18
3.2.3.	Purificación de proteínas recombinantes	19
3.2.4.	Inmunización de animales.....	20
3.2.5.	Producción de anticuerpos policlonales anti-Catepsina-L, anti-Enolasa, anti-Multiepitópica 1, anti-Tripsina y anti-Tetraspanina 7	21
3.2.6.	Unión de los antígenos recombinantes con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto ⁺²	21
3.2.7.	Estandarización del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	23
3.2.7.1.	Estandarización y selección de la placa de microtitulación, agente bloqueante y tiempo de incubación del anticuerpo primario.	23
3.2.8.	Estandarización de ensayo de ELISA indirecto en el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina.....	24
3.2.8.1.	Estandarización de ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo.....	24
3.2.8.2.	Preparación de placas de ELISA indirecto para evaluar 92 sueros individuales de cerdo.....	25
3.2.8.3.	Plan de análisis de resultados del ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo	27
3.2.9.	Estandarización del ensayo de Fast ELISA beads para la evaluación, con carácter exploratorio, del inmunodiagnóstico de neurocisticercosis	28
3.2.9.1.	Ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto ⁺² (fast ELISA beads) con anticuerpo policlonal de conejo	28

3.2.9.2.	Estandarización del ensayo de Fast ELISA beads con sueros humanos	29
3.2.9.3.	Ensayo control con anticuerpo monoclonal anti-Histidina, para confirmar que no hay remanentes colas de Histidina expuestas	31
3.2.9.4.	Evaluación del ensayo “fast ELISA beads” utilizando los sueros humanos de pacientes con neurocisticercosis	31
3.2.9.5.	Preparación de placa de ELISA con nanopartículas para evaluar 24 sueros humanos	32
3.2.9.6.	Plan de análisis de resultados del ensayo de “fast ELISA beads” con sueros humanos	33
3.3.	Consideraciones éticas	34
IV.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Expresión de proteínas recombinantes en el sistema procariótico <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	35
4.2.	Ensayos de ELISA indirecto para inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina.....	36
4.2.1.	Estandarización del ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo	36
4.2.2.	Inmunodiagnóstico de cerdos infectados con cisticercosis por <i>T. solium</i>	41
4.2.3.	Comparación de Sensibilidades y Especificidades entre los distintos antígenos para el inmunodiagnóstico con sueros de cerdo	48
4.3.	Ensayo de Fast ELISA beads para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis	49
4.3.1.	Estandarización del ensayo de fast ELISA beads con sueros humanos	49
4.3.2.	Inmunodiagnóstico mediante ensayo de fast ELISA beads con sueros individuales de humanos.....	51
	DISCUSIÓN	52
	CONCLUSIONES	61
	RECOMENDACIONES.....	63

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> (20).....	7
Figura 2. Esquema representativo de nanopartícula magnética funcionalizada con Cobalto ⁺² unido a la cola de Histidina de una proteína (44).	13
Figura 3. Unión de nanopartículas a proteína recombinante. Protocolo estandarizado de unión de proteína recombinante con nanopartículas magnéticas.....	22
Figura 4. Esquema de Tablero de Titulación. Estandarización del Antígeno (4 diluciones) y Anticuerpo primario (6 diluciones) en una placa de microtitulación de 96 pocillos.	25
Figura 5. Esquema de distribución en la placa de microtitulación. Muestras (círculos en blanco) por duplicado, los controles negativos (círculos celestes) y controles positivos (círculos amarillos) por triplicado.....	26
Figura 6. Esquema de ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas (fast ELISA beads)	29
Figura 7. Esquema de dilución seriada. Estandarización de anticuerpo primario para el ensayo de fast ELISA beads para dos antígenos diferentes a una concentración fija de anticuerpo secundario.	31
Figura 8. Esquema de la placa para el ensayo de fast ELISA beads. Distribución de 24 sueros individuales de humanos (círculos verdes) por duplicado y sus respectivos controles negativos (círculos celestes), y controles positivos.....	33
Figura 9. Expresión de proteínas recombinantes de <i>T. solium</i>. Una alícuota de los cultivos expresando dos proteínas recombinantes, Tetraspanina 7 y Tripsina en gel de poliacrilamida al 15%.....	35
Figura 10. Expresión de proteína recombinante de <i>T. solium</i>. Una alícuota de los cultivos expresando la proteína recombinante Multiepitópica 1 en gel de poliacrilamida al 15%.	36
Figura 11. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Catepsina-L) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y	

negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.	38
Figura 12. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Enolasa) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo).	39
Figura 13. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Multiepitópica 1) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo).....	39
Figura 14. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Tripsina) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo)	40
Figura 15. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Tetraspanina 7) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo).....	40
Figura 16. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Catepsina-L.	43
Figura 17. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Enolasa.	43
Figura 18. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Multiepitópica 1.	44
Figura 19. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Tripsina.....	44
Figura 20. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Tetraspanina 7.	45
Figura 21. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Catepsina-L para cada suero de cerdo evaluado.	45
Figura 22. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Enolasa para cada suero de cerdo evaluado.	46
Figura 23. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Multiepitópica 1 para cada suero de cerdo evaluado.	46
Figura 24. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Tripsina para cada suero de cerdo evaluado.....	47

Figura 25. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Tetraspanina 7 para cada suero de cerdo evaluado.47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas de restricción utilizadas para el clonamiento de cada gen en el vector pET28a+	18
Tabla 2. Concentración final obtenida (ug/mL) de cada proteína recombinante	36
Tabla 3. Parámetros estandarizados de ELISA indirecto para cada uno de los antígenos con sueros de cerdo.....	37
Tabla 4. Protocolo estandarizado del ensayo de ELISA indirecto para la evaluación de los antígenos con pool de sueros de cerdo	38
Tabla 5. Indicadores Sensibilidad, Especificidad e índice de Youden del ensayo de ELISA con cada uno de los antígenos utilizando sueros de cerdos	42
Tabla 6. Diferencia significativa (<i>p</i>) entre sensibilidades, y la diferencia entre especificidades de los ensayos con cada antígeno trabajado en el inmunoensayo con sueros de cerdo.....	49
Tabla 7. Parámetros estandarizados de fast ELISA beads para cada uno de los antígenos con sueros humanos	50
Tabla 8. Protocolo estandarizado para el ensayo de Elisa con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto ⁺² con sueros humanos	51
Tabla 9. Indicadores de Sensibilidad y Especificidad del ensayo de ELISA con nanopartículas utilizando los antígenos Tripsina y Multiepitópica 1 en sueros humanos	51

SIGLAS Y ABREVIACIONES

°C	Grados centígrados
2-PGA	2-fosfoglicerato
6-HIS	6 Histidinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EITB	Enzime-linked immunoelectrotransfer blot
ELISA	Enzime-linked ImmunoSorbent assay
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -tio-D-galactopiranosico
LLGP	Lentil lectin Glicoproteínas
M	Molar
M1	Multiepitópica 1
MHCII	Major Histocompatibility complex class II
mL	mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NC	Control negativo

NCC	Neurocisticercosis
NC-cutoff	Punto de corte a partir de la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar
nm	nanómetro
nM	nanoMolar
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartículas magnéticas
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
PBS	Phosphate buffered saline
PEP	Fosfoenolpiruvato
PP	Porcentaje de Positividad
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real
TSP7	Tetraspanina 7
ug/mL	microgramos por mililitro
uL	microlitro

I. INTRODUCCIÓN

La Cisticercosis/Teniasis, es una enfermedad zoonótica parasitaria que se produce por la infección con larva y tenia adulta respectivamente, descuidada con impacto significativo en la salud pública y económica. Se ha clasificado como la primera en la escala mundial de parásitos transmitidos por los alimentos por parte de la Organización para la Agricultura y Alimentación de la Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1).

La Cisticercosis porcina es una enfermedad zoonótica parasitaria común en países en desarrollo y constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial. Esta enfermedad es endémica en comunidades rurales del Perú debido a factores que favorecen su presencia, transmisión y mantenimiento (2).

La Cisticercosis es ocasionada por el céstodo *Taenia solium* que tiene como hospedero intermedio al cerdo, para la forma quística del parásito y como hospedero definitivo al ser humano, para la forma adulta o tenia. Sin embargo, las personas infectadas por huevos de *T. solium* pueden ser hospederos para la forma quística, que ataca con frecuencia el sistema nervioso central. (3).

En el Perú, la especie porcina constituye una de las bases de la producción agraria. El censo agropecuario de 2012 indica una población de 2 224 300, mayor en 1.7% a la registrada en el censo agropecuario de 1994, siendo un 67.2% cerdos criollos, distribuidos en la costa, sierra y selva (4). Para los criadores de cerdos en el Perú una de las limitantes de la productividad es la salud, aspecto al que se le brinda poca atención. Uno de los principales problemas que afectan la salud de los cerdos es la cisticercosis (5).

En humanos, la neurocisticercosis es la infección parasitaria del sistema nervioso central más común a nivel mundial (6). El diagnóstico de la Neurocisticercosis es muy importante ya que causa serios problemas neurológicos como epilepsia y cuadros convulsivos en los pacientes afectados (7, 8), y si no es tratada a tiempo, en algunos casos puede llegar a causar la muerte. Es por ello que se realizan estudios con diferentes marcadores moleculares específicos de *Taenia solium* para que puedan ser utilizados en el inmunodiagnóstico definitivo de la neurocisticercosis.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema

El Perú es considerado un país endémico de cisticercosis porcina y neurocisticercosis humana, siendo la totalidad de la sierra, la costa norte y parte de la selva, sitios con mayor incidencia y prevalencia (2, 5). Por ello es recomendable implementar un sistema de detección mediante inmunodiagnóstico y prevención mediante la vacunación, con el fin de prevenir la expansión del parásito y la enfermedad en todo el territorio peruano.

La cisticercosis porcina se produce cuando los cerdos son criados en lugares donde las condiciones de higiene son muy pobres; se puede sumar el hecho que muchos de estos lugares no tienen agua potable y las letrinas están construidas dentro de las casas cerca de donde están habitando los cerdos. Bajo estas circunstancias las personas sufren de enfermedades intestinales, producidas por infecciones bacterianas o parasitarias; una de ellas es teniasis-cisticercosis (*Taenia solium*) (3). La proporción de infección del ganado porcino es variable, pero en regiones endémicas alrededor del 30% de cerdos podría estar infectado (9).

La larva de *T. solium* provoca cisticercosis en cerdos, y una de las principales fuentes de pérdidas económicas para los criadores. Es importante detectar esos cerdos antes de que los seres humanos puedan consumirlos (10). Se han evaluado muchas pruebas serodiagnósticas en la detección de esta infección y se considera que el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) es uno de los ensayos más fiables y sensibles (11). La especificidad del ensayo de ELISA va a mejorar dependiendo del antígeno que se utilice y si

pertenece al sistema secreción y excreción del cisticerco de *T. solium*, como se ha reportado en diferentes parásitos (12). Con ese fin, es importante desarrollar pruebas de inmunodiagnóstico para detectar cisticercosis porcina.

La neurocisticercosis en humanos se origina cuando los metacéstodes llegan al sistema nervioso central, y se depositan en diferentes regiones del cerebro, originando la patología. La sintomatología varía dependiendo del sitio del cerebro en el que se alojó el parásito, siendo esta enfermedad la mayor causante de cuadros de epilepsia en países en vías de desarrollo y endémicos para la neurocisticercosis (8, 13). El diagnóstico se alcanza mediante pruebas serológicas y se logra un diagnóstico definitivo a través de resonancia magnética o tomografía axial computarizada, siendo limitado para algunas personas por su alto costo, y de difícil acceso a zonas rurales, zonas que son endémicas para esta enfermedad.

Entre las pruebas serológicas, la inmunotransferencia blot de glicoproteínas de afinidad lenteil lectin (EITB-LLGP) tiene una alta especificidad (100%) y alta sensibilidad (98%). Sin embargo la sensibilidad baja hasta 60% en casos de Neurocisticercosis de quiste único. Es recomendable desarrollar nuevos métodos de diagnósticos o nuevos ensayos para aumentar la sensibilidad de la prueba para estos casos.

Frente a la limitación del ensayo de Western blot en pacientes con quiste único, es que se ha reportado la producción de nuevos antígenos y propuesto mejorar algunas técnicas de inmunodiagnóstico a partir de suero o fluido cerebroespinal en ensayos de ELISA o el uso de tecnologías como nanopartículas magnéticas.

Se ha reportado la expresión de proteínas como enolasa (14) y otras proteínas del sistema de excreción/secreción (15, 16) y proteínas transmembrana, en las cuales se evaluó su potencial uso en inmunodiagnóstico con sueros humano positivo y negativo para cisticercosis, obteniendo una alta sensibilidad, pero una muy baja especificidad, ya que reaccionaban con los sueros negativos.

2.2. Marco Teórico

2.2.1. *Taenia solium*

T. solium es un gusano plano, su anatomía está conformada por un escólex y un estróbilo. El escólex tiene un grupo de ganchos y cuatro ventosas, que le ayudan al parásito a adherirse a la pared interna del intestino. El estróbilo está compuesto por varios segmentos unidos, los cuales se denominan proglótidos que se originan en el cuello del parásito, y se van desarrollando a lo largo del cuerpo. Así mismo, el proglótido ya desarrollado y maduro presenta órganos sexuales para autofecundarse, y el proglótido grávido contiene los huevos que luego puedan ser liberados. Ya que este parásito carece de tracto digestivo, en la parte superficial presenta extensiones pequeñas o también llamadas microtricas para absorber nutrientes y secretar desechos. El huevo contiene a la oncósfera, éste presenta seis ganchos, y está protegida por una estructura proteica denominada embrióforo. El cisticerco llamado también metacéstodo es de característica translúcida que contiene a la larva de *T. solium* (17).

En el ciclo biológico de *T. solium* (Figura 1), se tiene al cerdo como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo. El humano se contagia cuando ingiere carne de cerdo infectada con larvas, cuando las larvas de *T. solium* llegan al tracto digestivo son liberadas por los jugos gástricos y se adhieren a la

pared intestinal. Estas crecen y desarrollan proglótidos, que se caracterizan porque pueden autofecundarse y producir huevos, los que son expulsados mediante las excreciones (18). Luego de ingerir los huevos con las heces, éstos llegan hasta el intestino delgado, donde se liberan las oncósferas por acción de los jugos gástricos, éstas oncósferas debilitan la pared del intestino delgado por acción de proteasas y llegan hasta el torrente sanguíneo (16). Las localizaciones más comunes son el tejido subcutáneo, los músculos, el sistema nerviosos central y los ojos (19), cuando se alojan en los músculos o tejido subcutáneo, muchas veces no produce sintomatología, pero cuando las oncósferas atraviesan la barrera hematoencefálica y se alojan en el sistema nervioso central, se produce la neurocisticercosis, siendo una de las principales causas de epilepsia en países en vías de desarrollo (13).

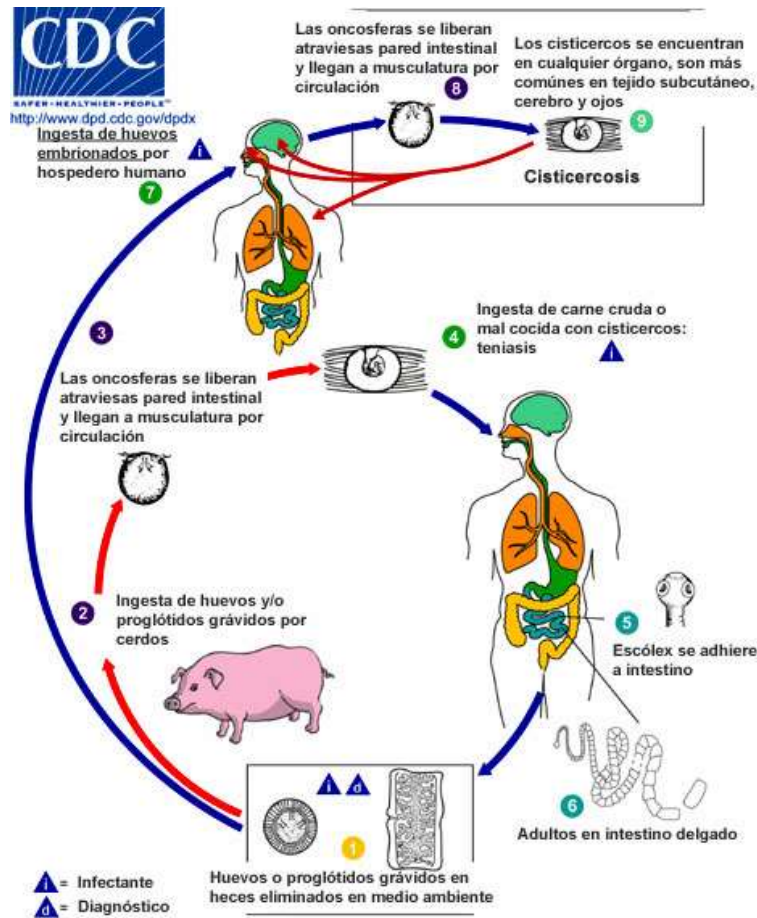


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (20).

2.2.2. Teniasis

La Teniasis o infección por el gusano adulto ocurre solo en el hospedero humano, causa una infección intestinal, cursa asintómicamente o produce síntomas digestivos leves e inespecíficos (18). La larva evaginada en el intestino delgado, la cabeza del parásito (escólex) se aferra de la mucosa y va formando segmentos a lo largo de su cuerpo (proglótidos). *T. solium* tiene su escólex con cuatro ventosas y doble corona de ganchos, el estróbilo contiene varios cientos de proglótidos. Alrededor de dos meses después de la infección, los proglótidos grávidos se separan del extremo distal y son excretados en las heces. Cada segmento contiene alrededor de cincuenta mil a sesenta mil huevos fértiles (21).

2.2.3. Cisticercosis

2.2.3.1. Cisticercosis porcina

En lugares con una inadecuada disposición de heces humanas, los cerdos ingieren proglótidos con huevos de *T. solium*; los cisticercos se alojan en cualquier parte del cuerpo del cerdo, más comúnmente en el musculo y el tejido graso subcutáneo (21). Las formas calcificadas (metacestodos degenerados) frecuentes en el cerdo, ya no son infectivas, por lo que ya no causan teniasis al ser ingeridas por el hombre (22). La infección en cerdos se puede diagnosticar en la inspección veterinaria *post mortem* y en el cerdo vivo (inspección *ante mortem*) por el examen de la lengua del animal o por serología. El examen serológico solamente es posible mediante el uso de la prueba de inmunoelectrotransferencia (EITB) o Western blot (23).

2.2.3.2. Cisticercosis humana

Es una parasitosis causada por el metacéstodo de *T. solium*, larva que tiene gran capacidad de invasión de tejidos como el músculo esquelético, tejido celular subcutáneo y músculo cardiaco (24). Los humanos adquieren la cisticercosis a través de la contaminación fecal-oral con huevos del adulto de *T. solium* (6, 21), además, otro medio de infección es por consumo de agua contaminada (21). La localización que genera mayores complicaciones, letalidad o secuelas es en el sistema nervioso central y constituye un serio problema de salud pública (25), produciendo un cuadro de neurocisticercosis cuyas manifestaciones clínicas son variadas y dependen de la ubicación y forma de las vesículas parasitarias (24, 26) generando diferentes tipos de Neurocisticercosis (NCC) que pueden ser, NCC parenquimal, NCC extraparenquimal, edema por peri-calcificación (27).

2.2.4. Antígenos candidatos alternativos para inmunodiagnóstico de cisticercosis

En Suramérica se realizaron diferentes estudios que permitieron determinar la prevalencia de la cisticercosis porcina. En Perú, un análisis serológico en cerdos en una zona rural realizado con el método de Western Blot, mostró una seropositividad del 43% - 52%. Así mismo, una comparación de dos métodos serológicos, ELISA y Western Blot, con la inspección de la lengua y la necropsia para el diagnóstico de cisticercosis en cerdos muestra que la prueba de la lengua tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100%, la EITB una sensibilidad y especificidad del 100%, y la ELISA una sensibilidad del 79% y una especificidad del 75% (28).

Es necesario implementar una prueba diagnóstica para ser usada en campo como el método de ELISA, utilizando nuevos antígenos del cisticerco de *T. solium* que mejoren la sensibilidad y especificidad del ensayo para usarlos de manera alternativa para en inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina.

2.2.4.1. Catepsina-L

Existe una gran variedad de catepsinas, debido a la duplicación de genes y divergencia, lo cual generó otras cisteínoproteasas con nuevas y diferentes funciones. Entre las Catepsinas-L producidas por *T. solium* se tienen descritas dos. La primera es la cisteínoproteasa del metacéstodo de *T. solium*, la cual tiene función proteolítica sobre la albúmina de suero bovino y sobre la inmunoglobulina G humana (con lo cual evade la respuesta inmune). La segunda Catepsina-L es homóloga a la cisteínoproteasa de *T. pisiformis*, que tiene la capacidad de degradar inmunoglobulina G humana, albúmina de suero bovino y

fibronectina; se diferencia de la primera en que ésta es secretada por la larva así como también por el parásito adulto (29).

2.2.4.2. Tetraspaninas

Son proteínas transmembrana, que participan en la coordinación de los procesos intracelulares e intercelulares que incluyen la transmisión de señales, proliferación celular, adhesión, migración, la fusión celular y la interacción hospedero-parásito (30). Se cree que las interacciones hospedero-parásito están asociados a la evasión inmune, lo cual se ha traducido en el uso de vacunas Tetraspaninas que puedan interferir con la estrategia de supervivencia de *Schistosoma* y *Taenia* (31, 32). Se tienen reportados el potencial antigénico de las Tetraspaninas TSP1, TSP2, Sm23 (*S. mansoni*), SJ23 (*S. japonicum*), son reportados como potenciales candidatos para la vacuna contra la esquistosomiasis. No se obtiene reportes sobre estudios de Tetraspaninas aisladas de las oncósferas de *T. solium* para aplicarlo en el diagnóstico de cisticercosis.

2.2.4.3. Enolasa

Enzima que pertenece al grupo de las liasas que cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato (2-PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP) en la vía Embden-Meyerhof (33). Es una enzima básica de la glucólisis que se encuentra universalmente distribuida en todos los organismos consumidores de glucosa. Reportada y caracterizada en varios organismos desde bacterias Gram negativas hasta vertebrados superiores como el humano (34). Es catalogada como una proteína multifuncional ya que actúa como una proteína de shock térmico, de unión a estructuras del citoesqueleto y de la cromatina o de recepción de plasminógeno, cuando ésta se encuentra en la superficie celular, y relacionada al proceso de

invasión al hospedero (35, 36). El plasminógeno, en algunos casos, se convierte en su forma activa, la plasmina, que es una potente proteasa ya que está relacionada con la degradación de la matriz extracelular durante la invasión de parásito al hospedero (37). Se han realizado diversos estudios con diferentes parásitos, en las investigaciones con tremátodos se ha encontrado que la enolasa se encuentra en los productos de excreción y secreción de *Fasciola hepatica* (38), en *Schistosoma bovis* la enolasa mejora la activación del plasminógeno a plasmina (39), los ratones vacunados con enolasa recombinante de *S. japonicum*, les confiere resistencia (40).

2.2.4.4. TsAg5

Es una proteína tipo Tripsina que tiene dos dominios, un dominio tipo tripsina, en el extremo amino terminal y un dominio de adherencia en el extremo carboxilo terminal, los cuales, se sospecha que están unidos por enlaces disulfuro (16), TsAg5 fue descubierta en *Taenia solium*, y se busca en la secuencia de *T. solium* un marco de lectura abierto que tenga una alta homología con la proteína Ag5 de *Echinococcus granulosus*, conocida como EgAg5. TsAg5 se clonó y expresó como antígeno de diagnóstico para neurocisticercosis (16), en su trabajo se clonó cada dominio por separado en un sistema de expresión de *E. coli*, encontraron que el dominio de adherencia no era inmunogénico, por otro lado el dominio tipo Tripsina, si lo era. También reportaron que la sensibilidad del dominio tipo Tripsina era de 96.36% para diagnosticar neurocisticercosis extraparenquimal, y un 75.44% para diagnosticar neurocisticercosis con múltiples quistes y solo una sensibilidad de 39.62% para diagnosticar Neurocisticercosis de quiste único; así mismo, la especificidad fue solo de 76.70%.

2.2.5. Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto⁺² (Dynabeads) para la inmovilización de antígenos e inmunodiagnóstico

La nanotecnología juega un papel muy importante en el campo de la ingeniería biomédica. Muchas nanopartículas de metales magnéticos o metales en su estado oxidado, tienen una propiedad paramagnética única, y la disponibilidad de las nanopartículas magnéticas ha inspirado un gran interés en sus aplicaciones biológicas tales como resonancia magnética, diagnóstico médico, administración de fármacos, nanoelectrónica en implantes, etc (41).

El óxido de cobalto tiene un gran campo de aplicaciones industriales, así como en los campos biomédicos, sus posibles aplicaciones en los campos biomédicos son ya previstas, tales como separación celular, administración de fármacos, hipertermia, etc. Los ensayos de compatibilidad con *Escherichia coli* y células L929 se llevaron a cabo, y los resultados sugieren una buena compatibilidad de His-CO₃O₄ en bajas concentraciones de nanopartículas en suspensión. (42).

Las resinas quelantes de cobalto, son especialmente diseñadas para la purificación de proteínas recombinantes, donde los 6 residuos de Histidina de las proteínas a purificar se asocian con los iones de cobalto (Figura 2), aunque en la purificación los residuos de Histidina se unen con una eficiencia ligeramente menor comparada con las resinas quelantes de níquel, donde hay una reducción significativa en uniones no específicas. Las resinas de Cobalto tienen una selectividad mayor para las secuencias con residuos de Histidina, sin embargo tienen una capacidad de carga baja, por lo tanto las resinas quelantes de cobalto se deben usar para proteínas recombinantes muy valiosas con cantidades limitadas (43).

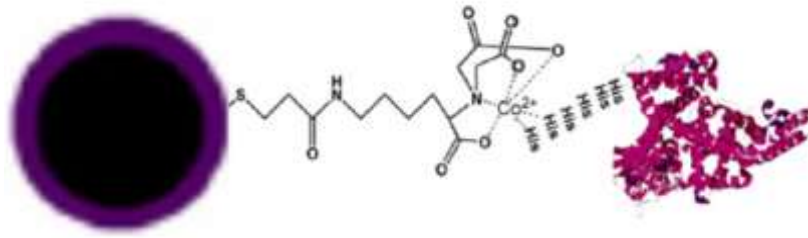


Figura 2. Esquema representativo de nanopartícula magnética funcionalizada con Cobalto⁺² unido a la cola de Histidina de una proteína (44).

2.3. Estudios Preliminares

A partir de la anotación completa del genoma de *T. solium* y del proteoma del cisticerco (*Cysticercus cellulosae*) se diseñaron los cebadores para cada uno de los antígenos candidatos para el inmunodiagnóstico de Cisticercosis, así como la obtención de cDNA y clonamiento de cada proteína. Así mismo se diseñó una proteína Multiepitópica a partir de epítopes seleccionados altamente inmunogénicos del sistema secreción y excreción del cisticerco de *T. solium* (ANEXO 1).

2.4. Justificación del Estudio

Las pruebas de diagnóstico por ELISA reportan una baja sensibilidad y alta especificidad en el inmunodiagnóstico de Cisticercosis porcina utilizando antígenos purificados. Es necesario implementar una nueva prueba diagnóstica con antígenos del sistema de secreción y excreción del cisticerco de *T. solium*; esta prueba debe ser rápida, simple y debe poder aplicarse en campo para el diagnóstico de cisticercosis porcina.

La prueba de inmunoelectrotransferencia (EITB) en combinación con antígenos purificados es muy específica y más sensible que el ELISA o examen de la lengua para la detección de la infección por *T. solium*. Sin embargo, la presencia de

anticuerpos circulantes contra *T. solium* no necesariamente se correlaciona con la presencia de quistes en la necropsia, y podría darnos resultados positivos cuando la necropsia es negativa (45). Es importante el uso de pruebas alternativas y evaluar correctamente la sensibilidad y especificidad.

Así mismo, es importante la estandarización de un ELISA indirecto con alta sensibilidad y especificidad, con cada uno de estos antígenos, como una alternativa para el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina.

Para el caso de inmunodiagnóstico de cisticercosis en humanos se tiene el ensayo de inmunotransferencia de glicoproteínas con afinidad lenteil lectin (LLGP-EITB) (46). Esta prueba LLGP-EITB tiene una baja sensibilidad para la detección de casos de neurocisticercosis asociado a un único quiste (13, 47). El inmunodiagnóstico por Western blot y ELISA usando las proteínas seleccionadas reaccionaron con los sueros negativos humanos, obteniendo una baja especificidad.

Es importante estandarizar un ensayo de ELISA para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis humana, utilizando proteínas recombinantes expresadas y purificadas, uniendo cada proteína por su cola de Histidina a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺², lo cual nos lleva a aumentar considerablemente la especificidad, del mismo modo se puede aumentar la concentración de antígenos por superficie.

2.5. Hipótesis

Las proteínas Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7, expresadas en el sistema *E. coli* BL21 sirven como antígenos en el

inmunodiagnóstico de cisticercosis con alta sensibilidad y especificidad mediante un ensayo de ELISA indirecto.

2.6. Objetivos de la Investigación

2.6.1. Cisticercosis Porcina

Objetivo General:

Evaluar la capacidad antigénica de cuatro proteínas recombinantes del sistema secreción/excreción del cisticerco de *Taenia solium* y la proteína Multiepitópica 1, para el inmunodiagnóstico por ELISA de cisticercosis porcina.

Objetivos específicos:

- Estandarizar el ensayo de ELISA indirecto con pool de sueros positivo y negativo a cisticercosis porcina.
- Evaluar las proteínas Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7 para su aplicación en el diagnóstico de cisticercosis porcina mediante el ensayo de ELISA indirecto.
- Determinar los indicadores de Sensibilidad, Especificidad e Índice de Youden de los test diagnóstico.

2.6.2. Neurocisticercosis Humana

Objetivo General:

Evaluar de manera exploratoria la capacidad antigénica de cuatro proteínas recombinantes del sistema secreción/excreción del cisticerco de *Taenia solium* y la proteína Multiepitópica 1, para el inmunodiagnóstico por ELISA de neurocisticercosis.

Objetivos específicos:

- Estandarizar la unión de los antígenos recombinantes con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺².
- Estandarizar el ensayo de fast ELISA beads con pool positivo y negativo de neurocisticercosis en humanos.
- Evaluar las proteínas Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7 para su aplicación en el diagnóstico de neurocisticercosis mediante el ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺².
- Determinar la Sensibilidad y Especificidad de los test diagnóstico.

III. METODOLOGÍA

3.1. Muestras de suero

3.1.1. Muestras de sueros de cerdo

Los sueros de cerdo positivos y negativos para cisticercosis fueron proporcionados por el Grupo de Cisticercosis del Perú, las muestras positivas provienen de cerdos infectados naturalmente y las muestras negativas provienen de cerdos de granjas tecnificadas y fueron confirmados como negativos para la prueba de Western blot (LLGP-EITB). El número de muestras proporcionadas para la primera etapa fue de 24 sueros individuales de cerdos (12 sueros individuales positivos y 12 sueros individuales negativos). Para la segunda etapa de evaluación nos proporcionaron 92 sueros de cerdos, de igual manera para trabajarlos en ciego.

3.1.2. Muestras de suero humano

Los sueros humanos de pacientes positivos y negativos para cisticercosis fueron proporcionados por el Grupo de Cisticercosis del Perú para evaluar la antigenicidad y el poder de inmunodiagnóstico utilizando el ensayo de ELISA. Nos proporcionaron un pool de sueros positivos para Neurocisticercosis confirmados por Western blot (LLGP-EITB); se obtuvo 11 sueros negativos confirmados por Western blot (LLGP-EITB) para Cisticercosis de personas que residen en zonas no endémicas, estos sueros negativos se utilizaron para evaluar la especificidad de cada una de las proteínas recombinantes; también 24 sueros individuales (12 positivos y 12 negativos) para trabajarlos en ciego, sueros confirmados por Western blot (LLGP-EITB).

3.2. Procedimientos y Técnicas

3.2.1. Extracción de plásmidos y transformación

Se extrajeron plásmidos pET28a+ que contienen el gen para cada proteína (individualmente) de las células inmovilizadas de *E. coli* que se encuentran almacenadas correctamente. Posteriormente se procedió a transformar cada uno de los vectores que portaban en su secuencia cada uno de los genes (por separado) obteniendo un total de cinco vectores y se realizó la transformación en un sistema de clonación como es la cepa “Novablue” de *E. coli*. Luego se realizó la evaluación de las clonas transformadas y verificación mediante digestión enzimática para cada una de las secuencias utilizando las enzimas correspondientes para cada plásmido por separado como se muestra en la Tabla 1, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Enzimas de restricción utilizadas para el clonamiento de cada gen en el vector pET28a+

gen	enzimas	
Catepsina-L	NcoI	XhoI
Enolasa	NcoI	XhoI
Multiepitopica 1	NcoI	XhoI
Tripsina	NheI	BamHI
Tetraspanina 7	NcoI	XhoI

3.2.2. Expresión de las proteínas recombinantes Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7 en *E. coli* BL21 (DE3) pLys

Se realizó la extracción y purificación de los plásmidos recombinantes siguiendo las condiciones de manufactura de QIAGEN (QIAprep® Miniprep Handbook) a

partir del cultivo de *E. coli* “Novablue” descrito anteriormente, los plásmidos se introdujeron (método de shock térmico) en *E. coli* BL21 (DE3) pLys para la expresión de cada uno de los genes en estudio. Se cultivó una colonia de la bacteria recombinante en 10 ml de caldo LB con kanamicina (40 ug/mL) a 37°C en agitación durante 18 horas. Cumpliendo este plazo, se pasó 1 mL de cada cultivo a un matraz con 50 mL de caldo LB con kanamicina (40 ug/mL) a 37°C en agitación durante 18 horas, luego se pasó 25 mL de cada cultivo a un matraz con 500 mL de caldo LB con kanamicina (40 ug/mL) a 37°C en agitación hasta que el OD se encontró entre 0.6-0.8 (lectura a 600 nm), se tomó una pequeña muestra del caldo de cultivo, para utilizarlo como control (No Inducido), luego se indujo la expresión con IPTG 1M (isopropil-β-tio-D-galactopiranosico) a una concentración final de 0.5mM y se incubó a 37°C en agitación durante 3 horas. Se realizó la verificación de la expresión mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, se utilizó como control el cultivo No Inducido (NI).

3.2.3. Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes expresadas se aislaron de las bacterias por shock térmico, se sonicaron y posteriormente se centrifugaron. El cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLys recombinante fue sometido a -70°C por 20 minutos y luego a 37°C por 10 minutos, proceso que se repitió 3 veces, luego las células se lisaron por sonicación en baño de hielo; para eliminar los restos celulares se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C. Para la verificación de las proteínas expresadas es que se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Las proteínas recombinantes tienen una cola de 6 Histidinas (6-HIS) (conferida por el vector pET28a+), en la región C-terminal; se realizó la purificación por

cromatografía de afinidad a 6-HIS para cada una de las proteínas recombinantes, utilizando columna His-Trap HP (GE Healthcare Life Sciences) de 5mL revestida con Sulfato de Niquel, los 6 buffers utilizados son preparados con 20mM de fosfato de sodio, 0.5M de NaCl y a diferentes concentraciones de Imidazol (20mM, 40mM, 60mM, 100mM, 300mM y 500mM) a pH 7.4 y para las proteínas recombinantes insolubles cada uno de los buffers se preparó adicionalmente con Urea 4M de concentración final.

Luego de obtener cada una de las proteínas recombinantes purificadas se procedió a concentrarlas (por separado) en un sistema de ultrafiltración Amicon®, de esta manera obtuvimos cada una de las proteínas en buffer fosfato 1X pH 7.4 (sin Imidazol), y si el caso fuese de una proteína insoluble, se concentraron éstas en buffer fosfato 1X pH 7.4 y Urea 4M.

3.2.4. Inmunización de animales

Con la finalidad de evaluar la inmunogenicidad de cada una de las proteínas, se prepararon anticuerpos policlonales mediante la inmunización de inmunizó conejos (*Orhyctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand White de 45 días de edad con cada uno de los antígenos. La inoculación se realizó en 4 dosis vía subcutánea, a intervalos de una semana para cada una de ellas, a excepción de la primera y la segunda dosis que fue cada dos semanas; el protocolo de inmunización en animales aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia se encuentra en el ANEXO 2.

3.2.5. Producción de anticuerpos policlonales anti-Catepsina-L, anti-Enolasa, anti-Multiepitópica 1, anti-Tripsina y anti-Tetraspanina 7

Para los estudios sobre la respuesta de anticuerpos específicos y la reactividad cruzada de cada una de las proteínas, el anticuerpo policlonal contra cada una de las proteínas, es que se usaron los anticuerpos anti-Catepsina-L, anti-Enolasa, anti-Multiepitópica 1, anti-Tripsina y anti-Tetraspanina 7 obtenidos en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID).

Se usó el suero pre inmune como control negativo, los sueros fueron alicuotados y almacenados a -70°C .

La obtención de anticuerpos policlonales de conejo nos ayuda a establecer el máximo ratio natural que se alcanza con los sueros hiperinmunes de conejo (suero positivo) y suero pre inmunes (control negativo), no se espera superar este ratio en los ensayos de fast ELISA beads con sueros humanos, ni en el ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo.

3.2.6. Unión de los antígenos recombinantes con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺²

Se preparó la muestra que contiene la proteína recombinante con cola de Histidina, para ello se preparó en un volumen de 200 uL de Binding/Wash Buffer 1X (con 0.02% tween[®]-20) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se resuspendió los Dynabeads[®] Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA) (48) en su frasco de origen, por vortex, por 30 segundos, luego se transfirieron 5 uL de Dynabeads[®] al tubo de microcentrífuga y se lavaron 3 veces con 1 mL de Binding/Wash Buffer 1X (con 0.02% tween[®]-20) utilizando un magneto (imán)

para tubos de 1.5ml y así no perder las nanopartículas durante los lavados, luego se incubaron con cada una de las proteínas recombinantes (volumen final de 200 uL) durante 30 minutos en un shaker 3D a 4°C, realizando una ligera homogenización cada 5 minutos. Luego se colocó cada uno de los tubos en el magneto para retirar el sobrenadante (200 uL) de cada una de las proteínas, se procedió a realizar 3 lavados con 300 uL de Binding/Wash Buffer 1X (con 0.02% tween[®]-20) sin eliminar el volumen de los lavados, y guardarlos en diferentes tubos rotulados correctamente. Se resuspendió las nanopartículas entre cada paso de los lavados (Figura 3).

La cantidad de proteína inicial y después de los lavados con el buffer se determinó mediante cuantificación en un NanoDrop 2000 Thermoscientific (UV-Vis Spectrophotometer). La proteína capturada en las nanopartículas se cuantificó como la cantidad de proteína inicial menos, la cantidad de proteína de la fracción del sobrenadante inicial y de las tres fracciones de los lavados realizados (44). Finalmente se resuspendieron las nanopartículas (ligadas a las proteínas por su cola de Histidina) en 40 uL de Buffer Pull-down 1X (con 0.02% tween[®]-20) (48).

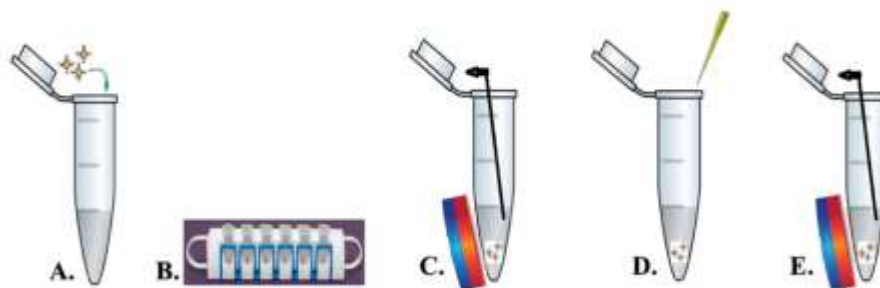


Figura 3. Unión de nanopartículas a proteína recombinante. Protocolo estandarizado de unión de proteína recombinante con nanopartículas magnéticas. **A.** Se agrega nanopartículas a 200uL de antígeno en buffer Binding/Wash 1X, pH8, se incuba, **B.** Se coloca el tubo en un magneto, **C.** Luego se colecta el sobrenadante y se cuantifica, **D.** Se realizan tres lavados con buffer Binding/Wash 1X, pH 8, **E.** Se retiran los sobrenadantes de cada lavado para su cuantificación

Se evaluaron diferentes cantidades de nanopartículas (2.5, 5, 10 uL) hasta estandarizar la cantidad correcta que aumente la concentración de antígeno por pozo de la placa en el ensayo de Fast ELISA beads.

3.2.7. Estandarización del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

3.2.7.1. Estandarización y selección de la placa de microtitulación, agente bloqueante y tiempo de incubación del anticuerpo primario.

Para la elección de la placa de microtitulación se evaluó 3 marcas de placas de 96 pozos con capacidad de 0.3 mL cada pozo, las marcas evaluadas fueron Thermo Scientific NUNC MaxiSorp®, Costar® 96-Well EIA/RIA Stripwell™ Plate y Thermo Scientific Immulon 1B.

Para el caso del agente bloqueante se evaluó BSA 3% de Sigma-Aldrich diluido en PBS 1X (Buffer fosfato salino 1X), también se evaluó leche en polvo Anchor 5% de la marca Nestlé diluido en PBS 1X.

El tiempo de incubación del anticuerpo primario se evaluó por 16 horas a 4°C, así mismo se evaluó por una hora a 37°C.

El título de Antígeno, la concentración de anticuerpo primario y secundario, el sustrato OPD y el reactivo para detener la reacción (HCl 0.5M) fue el mismo, así mismo la cantidad de lavados realizados. Se siguió el siguiente protocolo:

Los antígenos seleccionados fueron diluidos en Buffer Carbonato-Bicarbonato (Sigma-Aldrich) a una concentración de antígeno previamente estandarizada, se utilizaron 100 uL para cubrir cada pocillo de la placa de microtitulación y se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación (350 rpm), luego se procedió a

agregar un agente bloqueante, (diluido en PBS 1X), los pocillos se incubaron a una temperatura de 37°C durante 1 hora con agitación (350 rpm). Luego, los pocillos se incubaron por duplicado con los sueros muestra diluido en BSA 3% en un volumen final de 100 uL. El agente bloqueante se añadió para bloquear interacciones no específicas entre el antígeno y otras proteínas presentes en el suero. Las placas se lavaron 8 veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 en un lavador de placas automatizado y los anticuerpos se detectaron con anticuerpos anti-IgG específicos (anticuerpo secundario) conjugados con peroxidasa de rábano picante de KPL (Gaithersburg, Maryland), a una dilución previamente estandarizada en PBS 1X, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 1 hora con agitación (350 rpm).

La reacción se desarrolló después de la incubación de 100 uL de OPD (por sus siglas en inglés: o-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) tableta diluida en 25 mL de buffer fosfato-citrato con perborato de sodio (Sigma-Aldrich), a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con HCl 0.5M. La densidad óptica (OD) se determinó por espectrofotometría en la lectora de placas a 490nm.

3.2.8. Estandarización de ensayo de ELISA indirecto en el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina

3.2.8.1. Estandarización de ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo

Para la evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes usando sueros de cerdo, se usó un pool (5 muestras) de suero de cerdo positivo para Cisticercosis, la estandarización se realizó mediante un tablero de Titulación

(Figura 4) para el título de antígeno y anticuerpo primario (suero muestra), luego se incubaron con anti-IgG de cerdo (anticuerpo secundario) conjugado con peroxidasa de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), la dilución del anticuerpo secundario se estandarizó mediante otro ensayo de titulación para cada proteína recombinante.

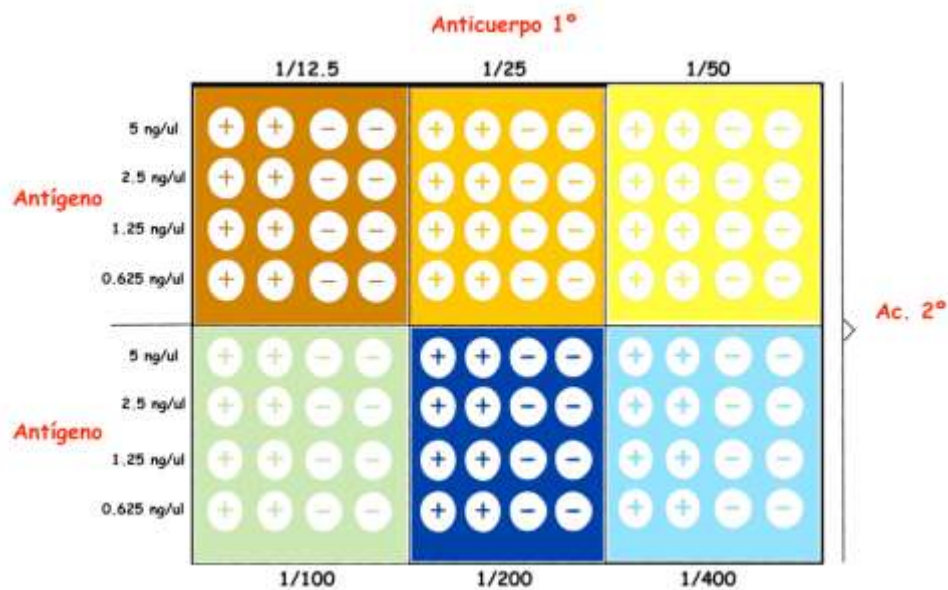


Figura 4. Esquema de Tablero de Titulación. Estandarización del Antígeno (4 diluciones) y Anticuerpo primario (6 diluciones) en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La Concentración de Anticuerpo secundario fue el mismo para cada pocillo

3.2.8.2. Preparación de placas de ELISA indirecto para evaluar 92 sueros individuales de cerdo

La preparación de las placas de ELISA incluye 2 muestras control positivo y 6 muestras control negativo (cada muestra control evaluada por triplicado) para calcular el punto de corte del OD (cutoff). Los pocillos con las muestras de sueros control negativo y positivo, corresponderán a sueros individuales de cerdos confirmados por Western blot (LLGP-EITB). Cada muestra problema se evaluó por duplicado. Las muestras serán rechazados si el coeficiente de variabilidad de

los OD en las lecturas duplicadas es mayor al 15%. La distribución de los controles positivo, negativos y de las muestras problema en la placa se muestra en la Figura 5. El ensayo con 92 sueros individuales de cerdo se realizó en ciego.

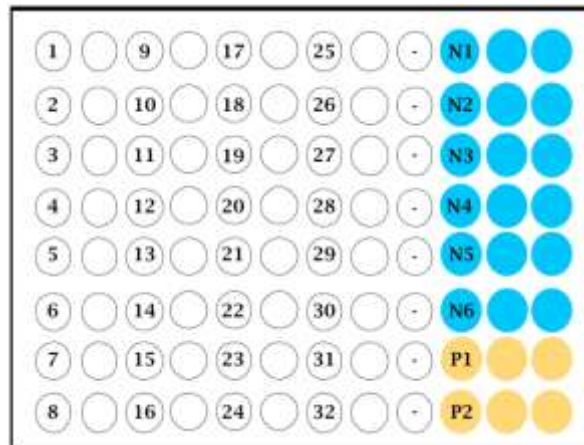


Figura 5. Esquema de distribución en la placa de microtitulación. Muestras (círculos en blanco) por duplicado, los controles negativos (círculos celestes) y controles positivos (círculos amarillos) por triplicado

Con la finalidad de controlar la variabilidad entre las placas de los valores absolutos de OD, el porcentaje de positividad (PP) será calculado para cada muestra del ensayo, dividiendo la media de los OD (muestra) entre la media de los OD de los controles positivos de la placa. Con el porcentaje de positividad de los sueros a evaluar, se calculará una curva de funcionamiento del receptor (ROC), y el cutoff para el porcentaje de positividad, que será estimada como el valor que producirá el mejor índice de Youden (Sensibilidad + Especificidad - 1) (49). Una muestra se considera positiva si su porcentaje de positividad es mayor que el punto de corte obtenido en base al porcentaje de positividad (PP). Se probará un criterio de clasificación adicional, considerando una prueba positiva si la media del OD de las muestras evaluadas fuese mayor que la media de los 6 controles negativos más tres veces la desviación estándar (NC-cutoff).

3.2.8.3. Plan de análisis de resultados del ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo

La sensibilidad se calculó como la proporción de las muestras que fueron correctamente clasificadas como positivas utilizando cada una de las proteínas recombinantes. La especificidad se calculó como la proporción de las muestras que fueron correctamente clasificadas como negativas utilizando cada una de las proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes que se utilizaron fueron Catepsina-L, Enolasa, Multiepitópica 1, Tripsina, Tetraspanina 7.

Se estimó dos puntos de corte, el primero a partir de la media de los negativos más tres veces la desviación estándar (NC-cutoff), y el segundo a partir del porcentaje de positividad (PP) se estimó el punto de corte de una escala continua que determinó la más alta sensibilidad y especificidad y que maximice el índice de Youden (49, 50).

Se calculó el porcentaje de positividad (PP) con el fin de controlar la variabilidad entre placas, el PP de cada muestra se estimó mediante regresión Logística aplicando una herramienta estadística en STATA 13, el PP de cada muestra se obtuvo a partir de la media de los ODs de cada muestra dividido entre la media de los controles positivos de la placa. A partir de los PP de los sueros evaluados se calcularon las Curvas ROC.

Se analizó las Curvas ROC de cada ensayo para estimar el porcentaje de datos correctamente clasificados. Se estimaron los intervalos de confianza al 95% y se evaluó la hipótesis nula comparando la sensibilidad y especificidad estimadas con las de EITB (46).

Se estimó si existe diferencia significativa entre las sensibilidades de cada ensayo, así mismo se evaluó si existe diferencia significativa entre las especificidades mediante una prueba de McNemar (51) para ambos casos. Se tomó como criterio de selección la sensibilidad y especificidad que maximizaba el índice de Youden.

3.2.9. Estandarización del ensayo de Fast ELISA beads para la evaluación, con carácter exploratorio, del inmunodiagnóstico de neurocisticercosis

3.2.9.1. Ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cobalto⁺² (fast ELISA beads) con anticuerpo policlonal de conejo

La placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp® fue bloqueada con BSA 3% (agente bloqueante previamente seleccionado y estandarizado) por 16 horas a 4°C. Se inoculó 1uL de nanopartículas ligadas al antígeno, con suero primario de conejo pre y post inmunizado con la proteína recombinante, por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm (el suero pre y post inmune se incubó realizando diluciones seriadas para determinar el título óptimo de anticuerpo primario). Luego se lavó la placa 8 veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se marcó el inmunocomplejo (antígeno-anticuerpo) con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante de KPL (Gaithersburg, Maryland), por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm (el título de anticuerpo secundario se determinó por diluciones seriadas). Luego se lavó la placa 8 veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se realizó el revelado con 100 uL de OPD (por sus siglas en inglés: o-phenylenediamine

dihydrochloride) de Sigma-Aldrich, en 25 mL de buffer fosfato-citrato con perborato de Sodio de Sigma-Aldrich, a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con HCl 0.5M. La densidad óptica (OD) se determinó por espectrofotometría en la lectora de placas de ELISA a 490nm (Figura 6).

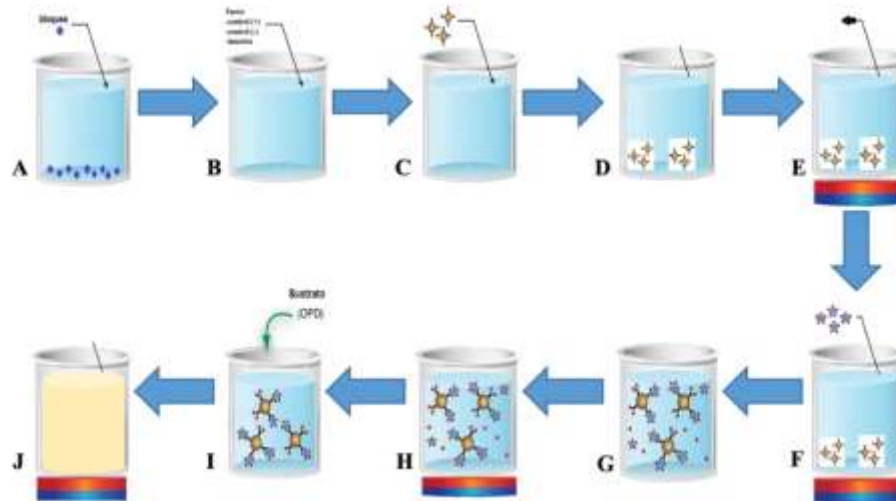


Figura 6. Esquema de ensayo de ELISA con nanopartículas magnéticas (fast ELISA beads). Donde: **A.** Bloqueo de Placa de microtitulación con BSA 3% a 4°C, **B.** Dilución de Anticuerpo primario en BSA 3%, **C.** Se añade nanopartículas ligadas con antígeno, **D.** Incubación a 37°C por 1 hora a 350 rpm, **E.** Lavado de pocillos por 8 veces con magneto, **F.** Dilución de Anticuerpo secundario en PBS 1X, **G.** Incubación a 37°C por 1 hora a 350 rpm, **H.** Lavado de pocillos por 8 veces con magneto, **I.** Revelado con OPD, se detiene la reacción con HCl 0.5M, **J.** Lectura a 490nm sin nanopartículas.

3.2.9.2. Estandarización del ensayo de Fast ELISA beads con sueros humanos

La placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp® fue bloqueada con BSA 3% (agente bloqueante previamente seleccionado y estandarizado) por 16 horas a 4°C. Para la estandarización del anticuerpo primario (pool suero positivo y pool suero negativo) se realizó una dilución seriada del suero en BSA 3% (diluido en PBS 1X) desde una concentración 1:12.5 hasta 1:1600 en un

volumen final de 100uL (Figura 7). Adicionalmente inoculó 1uL de nanopartículas ligadas al antígeno, por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm. Luego se lavó la placa 8 veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se marcó el inmunocomplejo (antígeno-anticuerpo) con anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugados con peroxidasa de rábano picante de KPL (Gaithersburg, Maryland), por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm (el título de anticuerpo secundario se determinó por diluciones seriadas). El anticuerpo anti-IgG humano se seleccionó en base a su mayor sensibilidad, como se muestra en estudios previos donde IgG fue probado y se obtuvo mayor respuesta inmune (52, 53). Luego se lavó la placa 8 veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se realizó el revelado con 100 uL de OPD (por sus siglas en inglés: o-phenylenediamine dihydrochloride) de Sigma-Aldrich, en 25 mL de buffer fosfato-citrato con perborato de Sodio de Sigma-Aldrich, a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con HCl 0.5M. La densidad óptica (OD) se determinó por espectrofotometría en la lectora de placas de ELISA a 490nm.

Para estandarizar el anticuerpo secundario, con el antígeno ligado a la nanopartícula magnética y el título de anticuerpo primario estandarizado, se realizó una dilución seriada del anticuerpo anti IgG humano conjugado con HRP a partir de una dilución 1:250 hasta 1:32000 en un volumen final de 100 uL.

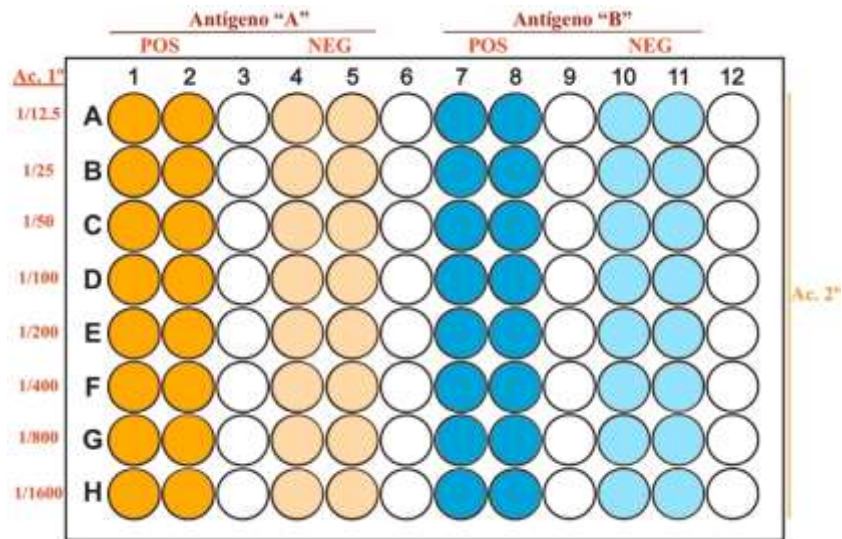


Figura 7. Esquema de dilución seriada. Estandarización de anticuerpo primario para el ensayo de fast ELISA beads para dos antígenos diferentes a una concentración fija de anticuerpo secundario.

3.2.9.3. Ensayo control con anticuerpo monoclonal anti-Histidina, para confirmar que no hay remanentes colas de Histidina expuestas

Para verificar que las proteínas ligadas al Cobalto⁺² de las nanopartículas, no tengan expuestas las histidinas se realizó un ensayo control, un pocillo no se trató con suero de paciente, sino con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Histidina de Invitrogen (Camarillo, CA), y un anticuerpo específico conjugado a una concentración previamente estandarizada.

3.2.9.4. Evaluación del ensayo "fast ELISA beads" utilizando los sueros humanos de pacientes con neurocisticercosis

La placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp® para de ensayo de ELISA se bloqueó con BSA 3% por 16 horas a 4°C. Se inoculó 1uL de nanopartículas ligadas al antígeno en estudio, con anticuerpo humano positivo (suero de pacientes con Neurocisticercosis confirmado por Western blot LL-GP) y suero negativo, por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm. Luego se lavó la placa 8

veces con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se marcará el inmunocomplejo (antígeno-anticuerpo) con anticuerpo secundario anti-IgG humano por 1 hora a 37°C en agitación a 350rpm. El anticuerpo anti-IgG humano se seleccionó en base a su mayor sensibilidad, como se muestra en estudios previos donde IgG fue probado y se obtuvo mayor respuesta inmune (52, 53). Luego se lavó la placa con PBS 1X con 0.05% tween®-20 utilizando un magneto para la placa de Elisa. Se realizó el revelado con 100 uL de OPD (por sus siglas en inglés: o-phenylenediamine dihydrochloride) de Sigma-Aldrich, en 25 mL de buffer fosfato-citrato con perborato de Sodio de Sigma-Aldrich, a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con HCl 0.5 M. La densidad óptica (OD) se determinó por espectrofotometría en la lectora de placas de ELISA a 490nm.

3.2.9.5. Preparación de placa de ELISA con nanopartículas para evaluar 24 sueros humanos

Con el fin de obtener una máxima sensibilidad, la dilución del control positivo fuerte (1:8) se seleccionó en el punto medio de la fase exponencial de la curva de OD versus la concentración del suero. Con la finalidad de detectar cualquier indicio de sensibilidad en el ensayo, la dilución del control positivo débil (1:128) fue seleccionada en la parte entre el estado estacionario y la fase exponencial de la curva de OD versus la concentración del suero. Si alguno de los dos pozos de controles positivos débiles no muestra un resultado positivo, los resultados de toda esa placa serían descartados, y 11 muestras control negativo (por triplicado cada muestra) para calcular el punto de corte del OD (cutoff). Los controles positivos fuertes y positivos débiles corresponden a diluciones 1:8 y 1:128 respectivamente,

de un pool de muestras positivas para cisticercosis. Los pocillos con las 11 muestras de sueros control negativo corresponden a sueros individuales de pacientes negativos a cisticercosis y que residen en zonas no endémicas cuyos análisis serológicos son confirmados por Western blot (LLGP-EITB). Ver distribución en la Figura 8.

Cada muestra problema se evaluó por duplicado. Los ensayos de ELISA serían rechazados si el coeficiente de variabilidad de los OD en las placas es mayor al 15%, en tal caso, por lo tanto se procedería a repetir el ensayo.

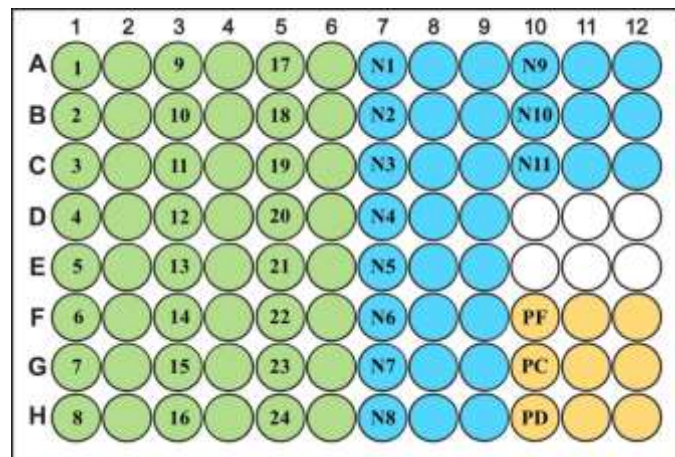


Figura 8. Esquema de la placa para el ensayo de fast ELISA beads. Distribución de 24 sueros individuales de humanos (círculos verdes) por duplicado y sus respectivos controles negativos (círculos celestes), y controles positivos donde, **PF**: positivo fuerte, **PC**: positivo control, **PD**: positivo débil. Controles por triplicado.

3.2.9.6. Plan de análisis de resultados del ensayo de “fast ELISA beads” con sueros humanos

Una muestra se considera positiva si la media del OD de las muestras evaluadas fuese mayor que la media de los 6 controles negativos más 3 desviaciones estándar (NC-cutoff).

La media los ensayos anti-His debe ser inferior al punto de corte calculado por la media de los 11 controles negativos más 3 desviaciones estándar (NC-cutoff).

Utilizando la clasificación de la media de los negativos más tres veces la desviación estándar, la sensibilidad se calculó como la proporción de las muestras que fueron correctamente clasificadas como positivas utilizando cada una de las proteínas recombinantes. La especificidad se calculó como la proporción de las muestras que fueron correctamente clasificadas como negativas utilizando cada una de las proteínas recombinantes. La proteína que se utilizó fue Tripsina y la proteína Multiepitópica. Se estimaran intervalos de confianza al 95% y se evaluará la hipótesis nula comparando la sensibilidad y especificidad estimadas con las de EITB (46).

3.3.Consideraciones éticas

El proyecto del presente estudio fue evaluado por el Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y fue aprobado por el Comité en mención, así mismo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales.

IV. RESULTADOS

4.1. Expresión de proteínas recombinantes en el sistema procariótico *E.*

coli BL21 (DE3) pLysS

Se logró expresar satisfactoriamente cada una de las proteínas recombinantes (Figuras 9 y 10) en el sistema de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLys, así mismo se realizó la purificación por Cromatografía de afinidad, se verificó por SDS-PAGE al 15% en cada etapa y se cuantificó la concentración de cada una de las proteínas recombinantes obtenidas (Tabla 2).

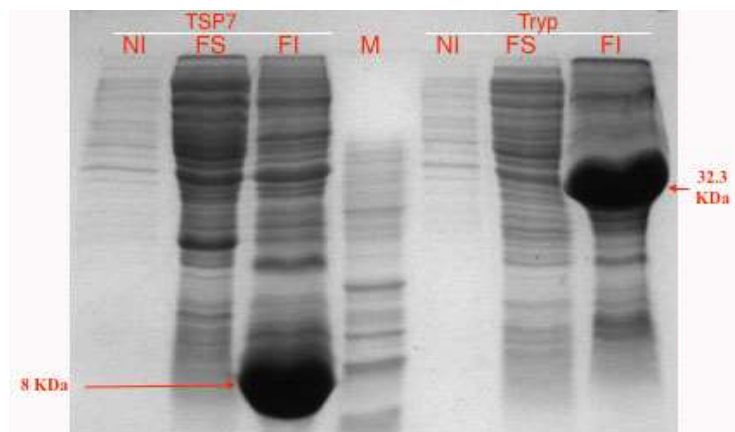


Figura 9. Expresión de proteínas recombinantes de *T. solium*. Una alícuota de los cultivos expresando dos proteínas recombinantes, Tetraspanina 7 y Tripsina en gel de poliacrilamida al 15%. Donde, **TSP7**: Tetraspanina 7, **Tryp**: Tripsina, **NI**: cultivo no inducido (sin IPTG), **FS**: Fracción soluble, **FI**: Fracción insoluble, **M**: Marcador de peso molecular Broad Range de Bio-Rad

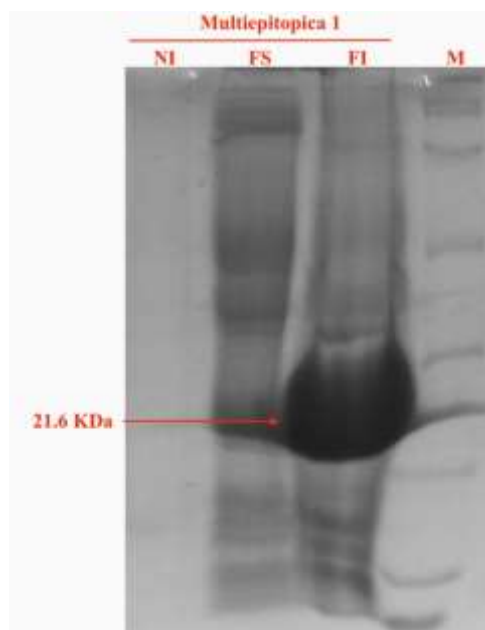


Figura 10. Expresión de proteína recombinante de *T. solium*. Una alícuota de los cultivos expresando la proteína recombinante Multiépitópica 1 en gel de poliacrilamida al 15%. Donde, **NI**: Control no inducido (sin IPTG), **FS**: Fracción soluble, **FI**: Fracción insoluble, **M**: Marcador de peso molecular Broad Range de Bio-Rad

Tabla 2. Concentración final obtenida (ug/mL) de cada proteína recombinante

proteína	concentración (ug/mL)
Catepsina-L	1622
Enolasa	483
Multiépitópica 1	2478
Tripsina	2133
Tetraspanina 7	1848

4.2. Ensayos de ELISA indirecto para inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina

4.2.1. Estandarización del ensayo de ELISA indirecto con sueros de cerdo

Se estandarizó el ensayo de ELISA indirecto con la placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp®. Los parámetros obtenidos en la estandarización se muestran en la Tabla 3. Los gráficos con los resultados de

estandarización de la concentración de antígeno y anticuerpo primario obtenidos mediante el Tablero de Titulación se muestran en las Figuras 11, 12, 13, 14, 15.

La estandarización del anticuerpo secundario se realizó mediante diluciones seriadas, cada muestra se trabajó por duplicado en la placa.

El protocolo con los resultados de estandarización de cada etapa se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Parámetros estandarizados de ELISA indirecto para cada uno de los antígenos con sueros de cerdo

Antígeno	Título de antígeno (ng/ul)	Título de anticuerpo primario	Título de anticuerpo secundario
Catepsina-L	2.5	1:100	1:2000
Enolasa	1.25	1:100	1:2000
Multiepitópica 1	5	1:50	1:2500
Tripsina	2.5	1:50	1:2500
Teraspanina 7	1.25	1:100	1:1000

Tabla 4. Protocolo estandarizado del ensayo de ELISA indirecto para la evaluación de los antígenos con pool de sueros de cerdo

Etapa	Compuesto utilizado	Parámetro
Antígeno	proteína recombinante en buffer carbonato-bicarbonato	1 hora, 37°C, 350 rpm
Agente bloqueante	BSA 3%	1 hora, 37°C, 350 rpm
Anticuerpo primario lavado	pool suero de cerdo en BSA 3% PBS 1X con 0.05% tween®-20	16 horas, 4°C 8 veces, T° ambiente
Anticuerpo secundario lavado	anti-IgG (cerdo) con HRP en PBS 1X PBS 1X con 0.05% tween®-20	1 hora, 37°C, 350 rpm 8 veces, T° ambiente
revelado	OPD en 25 ml de buffer citrato fosfato-perborato de sodio	al instante
se detuvo la reacción	0.5M HCl	al instante
lectura	-	490nm

*el lavado se realizó en un lavador automatizado de placas de microtitulación

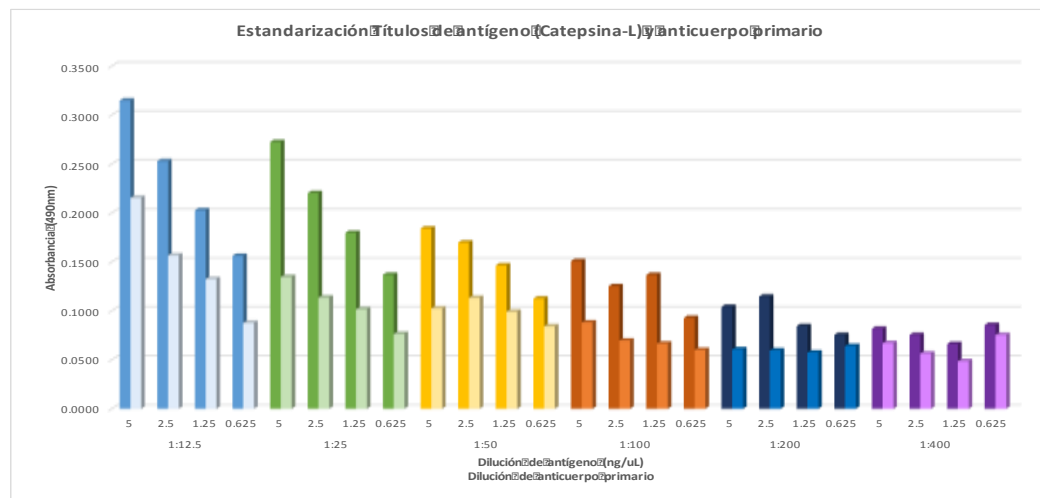


Figura 11. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Catapsina-L) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.

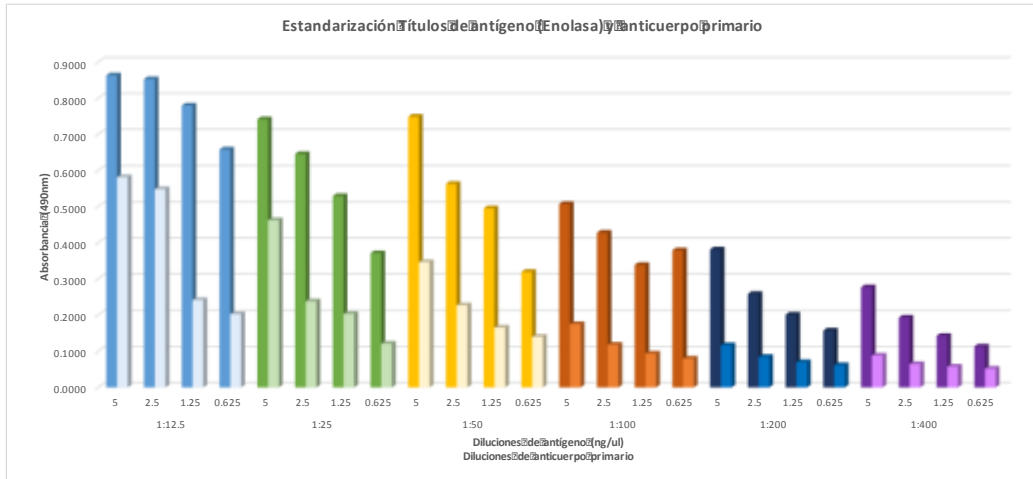


Figura 12. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Enolasa) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.

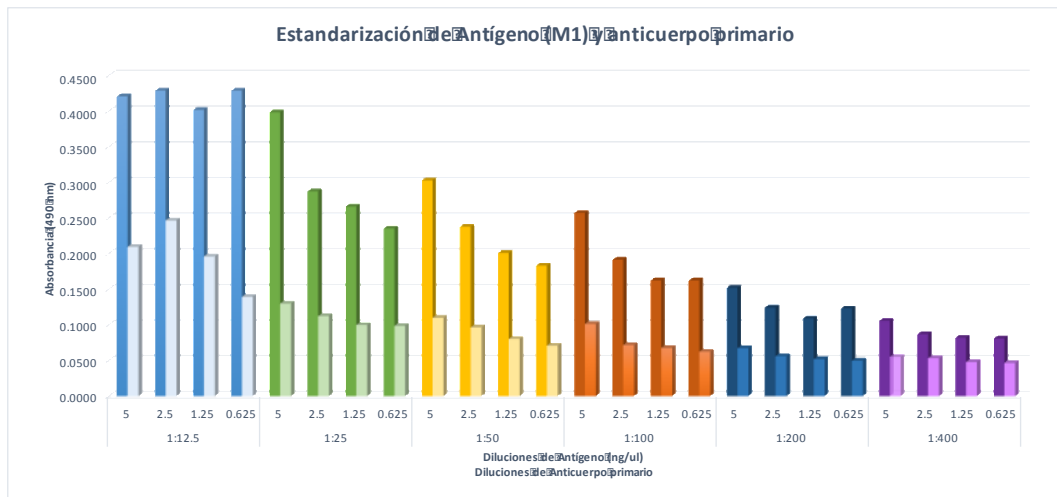


Figura 13. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Multiepitópia 1) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.

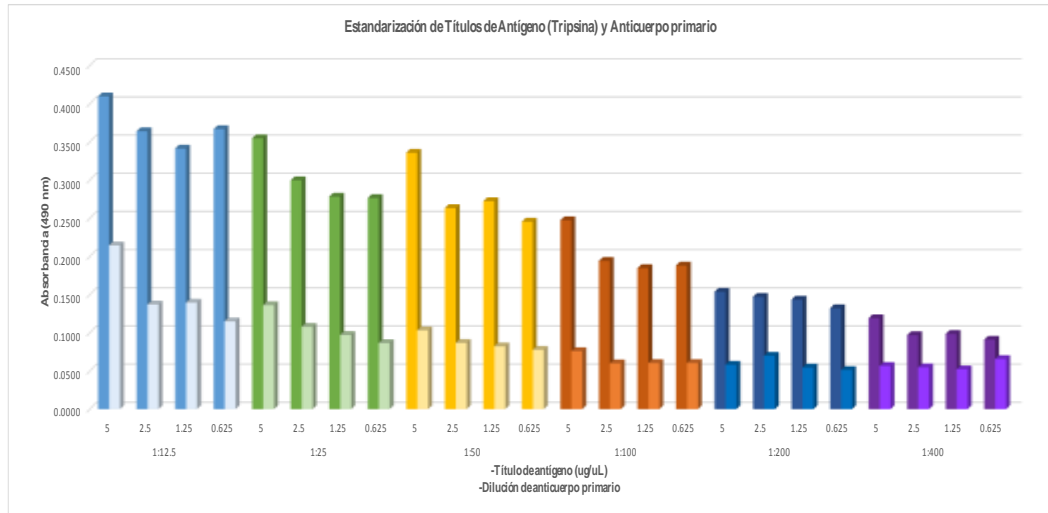


Figura 14. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Tripsina) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.

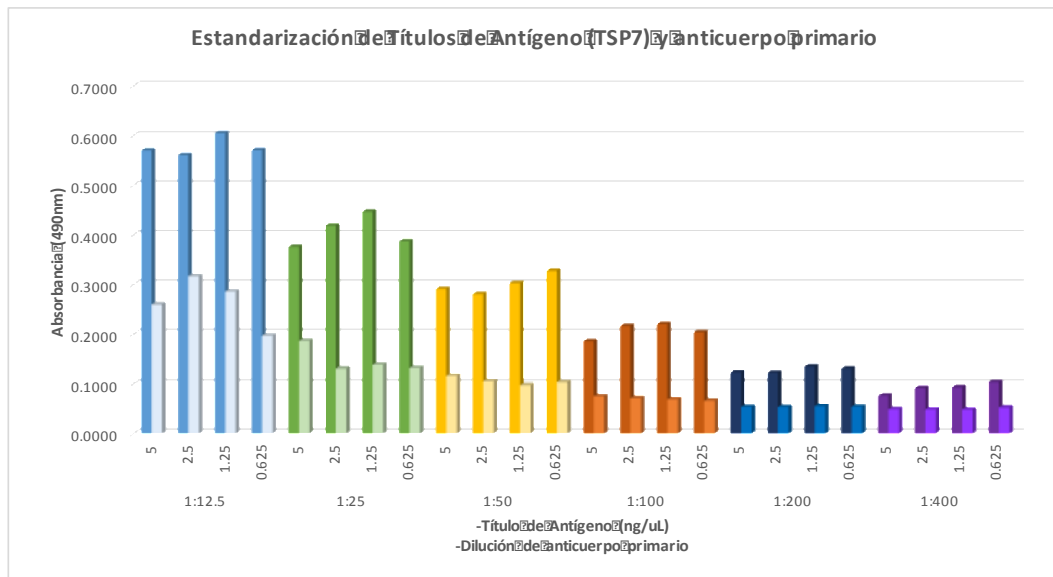


Figura 15. Estandarización del ensayo de ELISA para el título de antígeno (Tetraspanina 7) y anticuerpo primario (pool de suero de cerdo positivo y negativo), donde en cada pareja de barras corresponde a la media de las lecturas de OD del pool Positivo y pool Negativo.

La estandarización del ensayo de ELISA indirecto con cada una de las cinco proteínas recombinantes se realizó con una razón óptima entre el pool de sueros

positivos y el pool de sueros negativos utilizando un tablero de titulación. Luego de estandarizar el ensayo, se realizó un ensayo de ELISA indirecto con 24 sueros individuales de cerdos, se obtuvo una Sensibilidad del 100% y una Especificidad del 100% para Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7.

4.2.2. Inmunodiagnóstico de cerdos infectados con cisticercosis por *T.*

solium

Los resultados de sensibilidad y especificidad utilizando como punto de corte la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar (NC-cutoff) y el punto de corte a partir del porcentaje de positividad (PP) se muestran en la Tabla 5, así mismo el índice de Youden.

Tabla 5. Indicadores Sensibilidad, Especificidad e índice de Youden del ensayo de ELISA con cada uno de los antígenos utilizando sueros de cerdos

Antígeno	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	índice de Youden
Catepsina-L	NC-cutoff	56.52% (95% IC: 0.41-0.71)	85.37% (95% IC: 0.70-0.94)	41.9%
	PP	84.78% (95% IC: 0.71-0.94)	63.41% (95% IC: 0.46-0.78)	48.2%
Enolasa	NC-cutoff	87.50% (95% IC: 0.74-0.95)	81.82% (95% IC: 0.67-0.92)	69.3%
	PP	87.50% (95% IC: 0.75-0.95)	88.64% (95% IC: 0.75-0.96)	76.1%
Multiepitopica 1	NC-cutoff	90.70% (95% IC: 0.78-0.97)	95.24% (95% IC: 0.83-0.99)	85.9%
	PP	90.70% (95% IC: 0.77-0.97)	92.86% (95% IC: 0.81-0.99)	83.6%
Tripsina	NC-cutoff	68.89% (95% IC: 0.53-0.82)	83.33% (95% IC: 0.69-0.93)	52.2%
	PP	93.33% (95% IC: 0.82-0.97)	78.57% (95% IC: 0.63-0.90)	71.9%
Tetraspanina 7	NC-cutoff	95.74% (95% IC: 0.85-0.99)	95.45% (95% IC: 0.84-0.99)	91.2%
	PP	93.62% (95% IC: 0.82-0.99)	97.73% (95% IC: 0.88-0.99)	91.4%

95%IC: intervalo de confianza al 95%

Se realizaron gráficos de dispersión de los valores de porcentaje de positividad de cada muestra de suero de cerdo, se pueden observar los datos que se obtuvieron en cada ensayo con cada antígeno por separado.

En la dispersión de puntos se pueden observar los valores falsos positivos y falsos negativos (Figuras 16, 17, 18, 19 y 20).

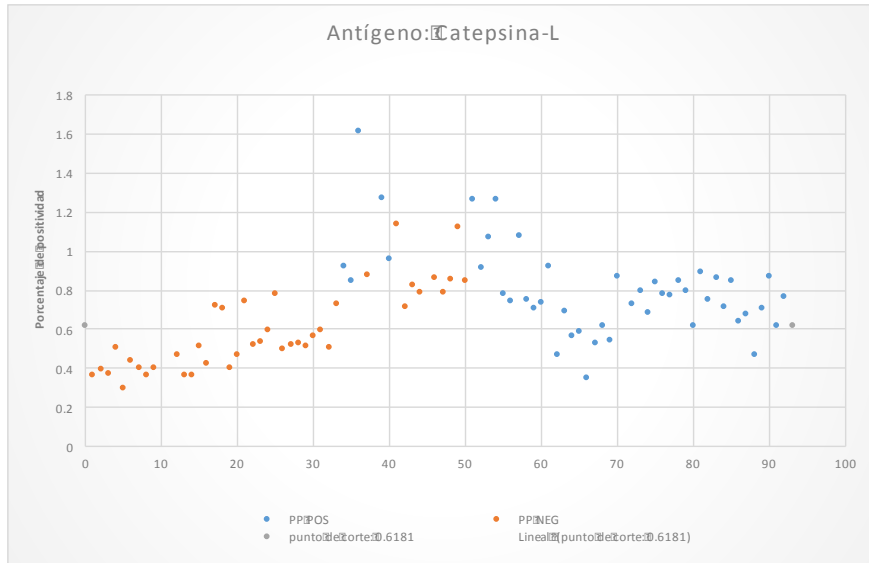


Figura 16. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Catepsina-L. Donde **PP POS:** porcentaje de positividad de sueros con resultado Positivo; **PP NEG:** porcentaje de positividad de sueros con resultado negativo.

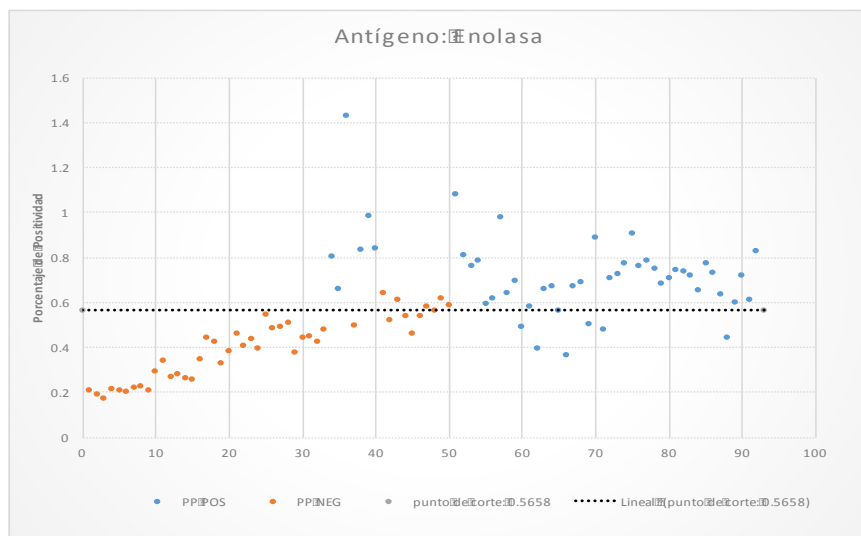


Figura 17. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Enolasa. Donde **PP POS:** porcentaje de positividad de sueros con resultado Positivo; **PP NEG:** porcentaje de positividad de sueros con resultado negativo.

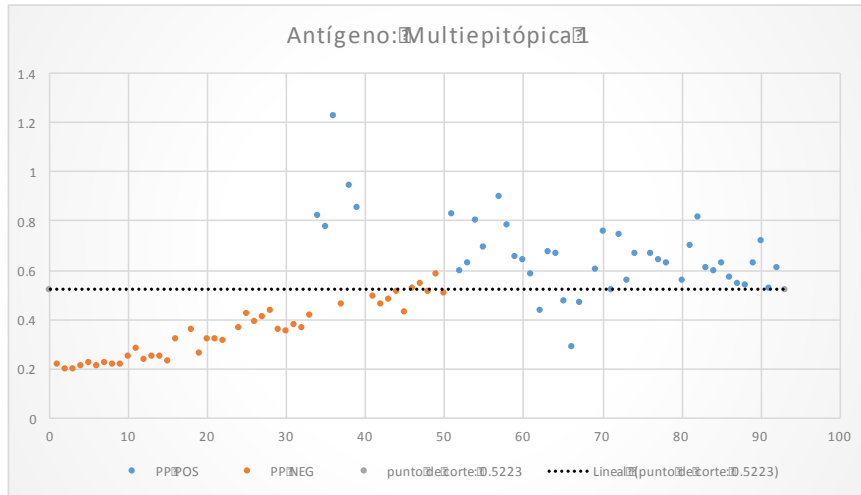


Figura 18. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Multiepitópica 1. Donde **PP POS:** porcentaje de positividad de sueros con resultado Positivo; **PP NEG:** porcentaje de positividad de sueros con resultado negativo.

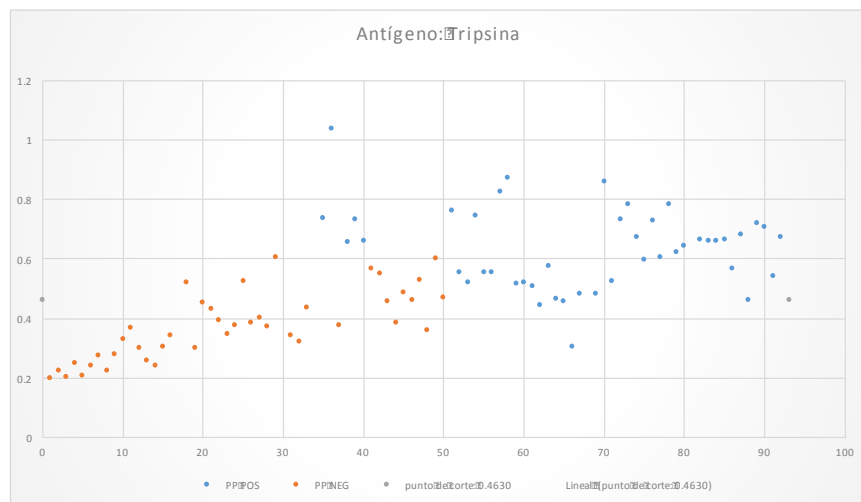


Figura 19. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Tripsina. Donde **PP POS:** porcentaje de positividad de sueros con resultado Positivo; **PP NEG:** porcentaje de positividad de sueros con resultado negativo.

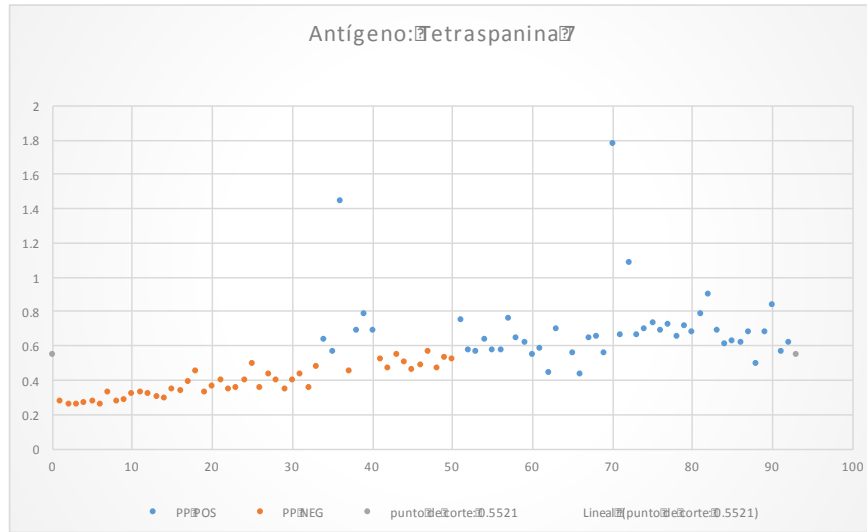


Figura 20. Gráfico de dispersión de los valores de Porcentaje de positividad (PP) de los sueros individuales de cerdos tratados con el antígeno Tetraspanina 7. Donde **PP POS:** porcentaje de positividad de sueros con resultado Positivo; **PP NEG:** porcentaje de positividad de sueros con resultado negativo.

Un indicador de la bondad de clasificación de la prueba es el área bajo la curva ROC, obtenida a partir de los modelos de clasificación de las regresiones logísticas. El porcentaje de datos correctamente clasificados se obtiene a partir del área bajo la curva ROC para cada uno de los ensayos de ELISA (Figuras 21, 22, 23, 24 y 25) el análisis ROC se realizó en el software estadístico STATA 13.

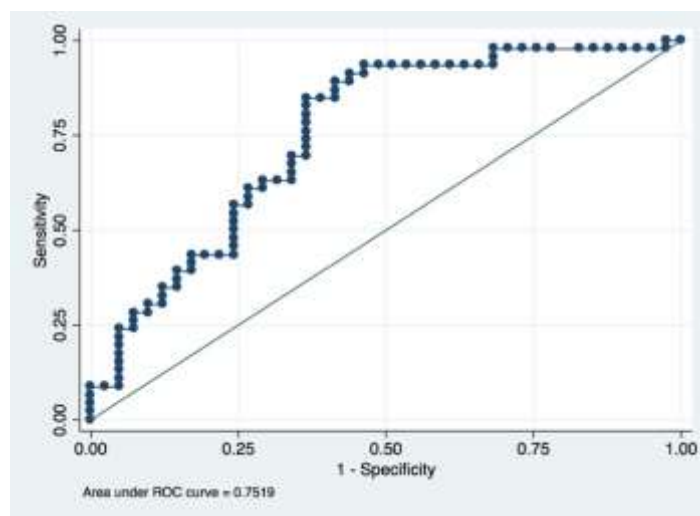


Figura 21. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Catepsina-L para cada suero de cerdo evaluado.

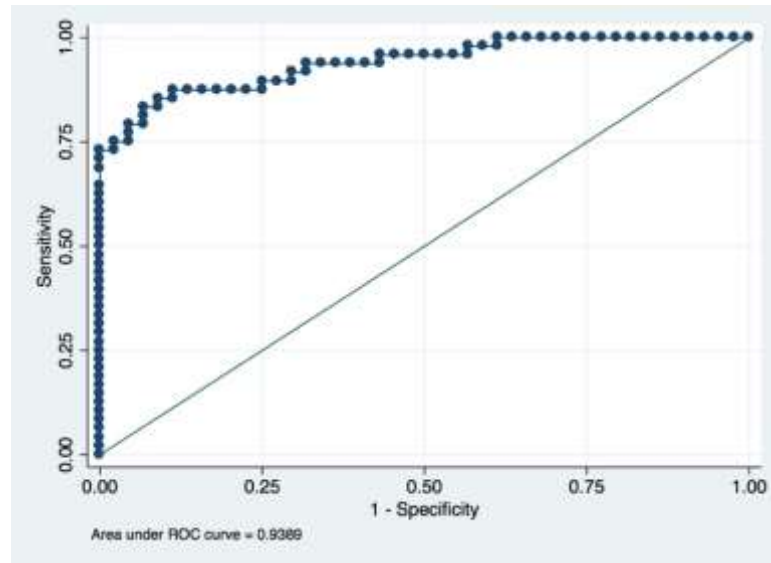


Figura 22. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Enolasa para cada suero de cerdo evaluado.

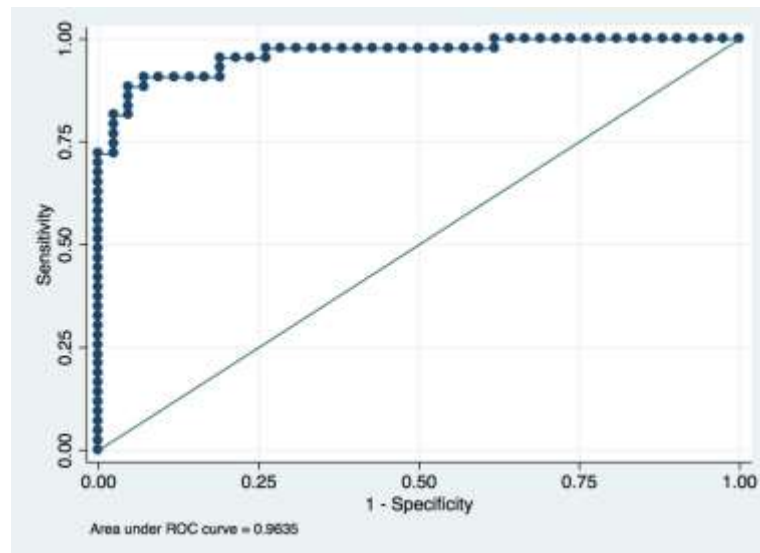


Figura 23. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Multiepitópica 1 para cada suero de cerdo evaluado.

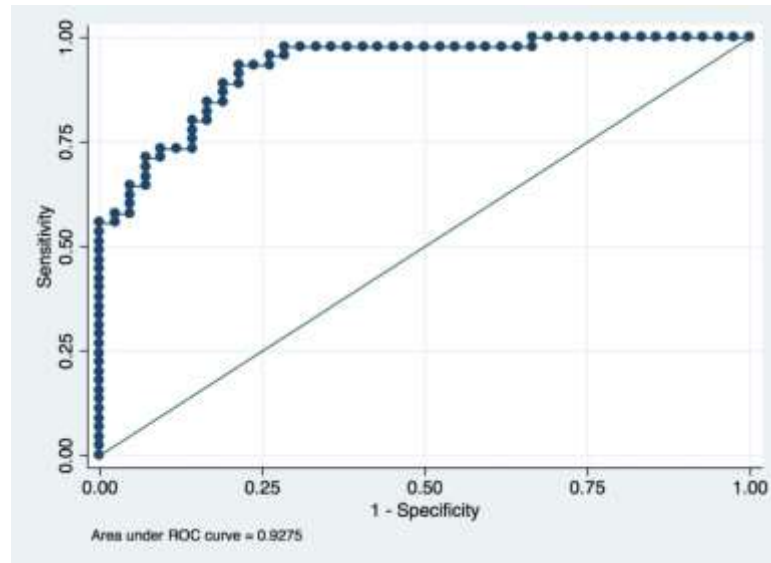


Figura 24. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Tripsina para cada suero de cerdo evaluado.

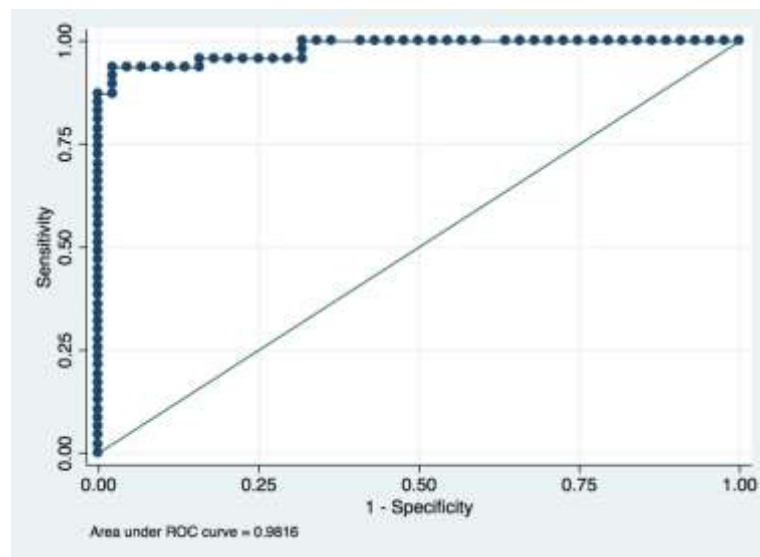


Figura 25. Curva ROC empírica para el ensayo de ELISA convencional con el antígeno Tetraspanina 7 para cada suero de cerdo evaluado.

El porcentaje de datos correctamente clasificados para cada ensayo de ELISA indirecto, se calculó mediante un análisis ROC, las curvas ROC empíricas nos muestran que con una probabilidad del 95% la mejor área bajo la curva pertenece al ensayo con Tetraspanina 7 con 0.9816 lo que significa que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo positivo tiene un valor en la prueba mayor

que el de un individuo elegido aleatoriamente del grupo negativo un 98% de las veces (54), por otro lado, el área más baja se obtuvo en el ensayo con Catepsina-L con 0.7519, debido a la baja Sensibilidad y Especificidad de la prueba diagnóstica en comparación con los resultados de Tetraspanina 7 y Multiepitópica 1.

4.2.3. Comparación de Sensibilidades y Especificidades entre los distintos antígenos para el inmunodiagnóstico con sueros de cerdo

Se seleccionó los resultados de sensibilidad y especificidad que maximizaban el índice de Youden indicados en la Tabla 5, para cada antígeno, se evaluó la diferencia entre los resultados de sensibilidad y la diferencia entre los resultados de especificidad aplicando una prueba de McNemar (51), lo resultados se muestran en una tabla de doble entrada (Tabla 6). Se evaluó en el software estadístico STATA 13.

Se seleccionaron los indicadores que se calcularon a partir del porcentaje de positividad (PP) para los cinco ensayos a excepción del ensayo con Multiepitópica 1 que se escogió la Sensibilidad y Especificidad obtenidos a partir de la media de los negativos mas tres veces la desviación estándar (NC-cutoff).

Tabla 6. Diferencia significativa (p) entre sensibilidades, y la diferencia entre especificidades de los ensayos con cada antígeno trabajado en el inmunoensayo con sueros de cerdo.

SENSIBILIDAD						
	CAT-L	ENO	M1	TRIP	TSP7	
	84.8%	87.5%	90.7%	93.3%	93.6%	
CAT-L		0.625	0.250	0.125	0.250	CAT-L
ENO	0.002		0.688	0.375	0.250	ENO
M1	0.001	0.250		1.000	1.000	M1
TRIP	0.070	0.219	0.016		1.000	TRIP
TSP7	0.000	0.125	1.000	0.008		TSP7
	63.4%	88.6%	95.2%	78.6%	97.7%	
ESPECIFICIDAD						

diferencia significativa ($p < 0.05$)

Como se mencionó anteriormente Tetraspanina 7 y Multiepitópica 1 alcanzaron Sensibilidad y Especificidad altas, lo cual se refleja en la prueba de McNemar, las sensibilidades no presentan diferencias significativas, en el caso de sus especificidades, no existe diferencias significativas entre Tetraspanina 7 y Multiepitópica 1, pero si existe diferencias significativas entre las especificidades con Catepsina-L y Tripsina, lo que nos sugiere que el inmunodiagnóstico con Catepsina-L y Tripsina con una probabilidad del 95%, no ofrece una especificidad tan alta y confiable.

4.3. Ensayo de Fast ELISA beads para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis

4.3.1. Estandarización del ensayo de fast ELISA beads con sueros humanos

Se estandarizó el ensayo de ELISA con nanopartículas obteniendo óptimos resultados con la placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp®. El protocolo completo y las etapas estandarizadas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7. Parámetros estandarizados de fast ELISA beads para cada uno de los antígenos con sueros humanos

Antígeno	*Título de antígeno (ng/ul)	Título de anticuerpo primario	Título de anticuerpo secundario
Catepsina-L	90	--	--
Multiepitópica 1	60	1:25	1:500
Tripsina	100	1:25	1:500
Tetraspanina 7	60	--	--

*antígeno ligado a 5 uL de nanopartículas

Para la validación del ensayo se realizó evaluaciones usando solo las NPM (sin unión con antígenos), con anticuerpo primario (pool positivo y pool negativo) y anticuerpo secundario (anti IgG humano conjugado con HRP) los resultados muestran que no existe reacción cruzada con las NPM y la razón entre el pool positivo y pool negativo fue de 1.0; se evaluó también un ensayo de NP solo con anticuerpo primario y otro ensayo de NPM solo con anticuerpo secundario; también se realizó un ensayo de NPM ligadas con el antígeno sin añadir anticuerpo primario ni secundario al ensayo y se reveló con OPD y se detuvo la reacción con HCl 0.5M, en los tres casos los resultados nos muestran que no hubo reacción cruzada.

Los resultados de validación del ensayo fast ELISA beads con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Histidina para verificar que no exista reacción cruzada con la cola de Histidina de los antígenos nos indican que no había reacción y la razón entre el pool positivo y pool negativo fue de 1.0 lo que nos indica que no habían colas de histidinas expuestas y la unión entre la proteína recombinante y el cobalto⁺² era estable y específico.

Tabla 8. Protocolo estandarizado para el ensayo de Elisa con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto⁺² con sueros humanos

Etapa	Compuesto utilizado	Parámetro
Agente bloqueante	BSA 3%	16 horas, 4°C
Anticuerpo primario	pool de suero humano en BSA 3%	
Antígeno-Nanopartículas	proteína recombinante única a nanopartículas	1 hora, 37°C, 350 rpm
lavado	PBS 1X con 0.05% tween®-20	8 veces, T° ambiente
Anticuerpo secundario	anti-IgG (humano) con HRP en PBS 1X	1 hora, 37°C, 350 rpm
lavado	PBS 1X con 0.05% tween®-20	8 veces, T° ambiente
revelado	OPD en 25 ml de buffer citrato fosfato-perborato de sodio	al instante
se detuvo la reacción	0.5M HCl	al instante
lectura	-	490nm

*para el lavado se utilizó una barra magnética para placas de microtitulación

4.3.2. Inmunodiagnóstico mediante ensayo de fast ELISA beads con sueros individuales de humanos

Ensayo con el antígeno Tripsina, se obtuvo una baja sensibilidad y especificidad, por otro lado el ensayo con sueros humanos utilizando el Antígeno Multiepitópica 1, nos muestra una sensibilidad alta y una especificidad baja (Tabla 9).

Tabla 9. Indicadores de Sensibilidad y Especificidad del ensayo de ELISA con nanopartículas utilizando los antígenos Tripsina y Multiepitópica 1 en sueros humanos

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad
Tripsina	50%	58%
Multiepitópica 1	90%	15%

DISCUSIÓN

En el presente estudio se desarrolló una prueba de ELISA indirecto para el diagnóstico de Cisticercosis porcina que constituye una alternativa con antígenos del sistema de excreción y secreción de cisticerco de *T. solium*. Así mismo, se desarrolló una prueba rápida de ELISA con nanopartículas magnéticas (fast ELISA beads) para el inmunodiagnóstico de Neurocisticercosis en humanos.

Los resultados del presente estudio nos muestran que se logró expresar con éxito las proteínas recombinantes incluida la proteína Multiepitópica, alcanzando concentraciones altas y óptimas para los ensayos de ligación a nanopartículas magnéticas (NPM) y para los ensayos de inmunodiagnóstico por ELISA.

Se estandarizó el agente bloqueante que se utilizó en el ensayo de fast ELISA beads, así mismo se evaluó el tipo de placa de microtitulación a usar para la estandarización del ensayo, lo cual nos mostró como mejores resultados la placa de microtitulación Thermo Scientific NUNC MaxiSorp® para el ensayo y se bloqueó con BSA 3% (diluido en PBS 1X pH 7.4), tal como se ha demostrado de manera similar en estudios previos (55, 56).

Inmunodiagnóstico de cerdos

Actualmente el análisis de la lengua es usado en campo como diagnóstico de Cisticercosis porcina, pero presenta una baja sensibilidad y alta especificidad (57, 58), y requiere un manejo especial de la población desde el punto de vista ético.

Con fines de investigación y para la estimación de la prevalencia, la metodología utilizada es la disección de cerdos sacrificados seguido del conteo de cisticercos, considerado como gold standard, pero es una pérdida de tiempo y un

procedimiento costoso, por lo tanto no es práctico para la prevalencia de rutina (59).

Algunos autores aplican la examinación por necropsia para determinar la intensidad de la infección en cerdos experimentalmente infectados por *T. solium* (60), otros estudios comparan la necropsia y técnicas de inspección de la lengua y carne para determinar la infección por cisticercosis porcina en cerdos naturalmente infectados (61) y otros, para determinar la sensibilidad y especificidad de EITB para cisticercosis porcina (62).

En los estudios de Jayachi y col. (2004), describen que los cerdos infectados con cestodos, o la exposición a otros parásitos y cestodos no ha dejado claro los efectos a los ensayos de EITB, por esas razones es que los animales con EITB positivos pero con necropsia negativos han sido considerados como falsos positivos; adicionalmente, sus resultados muestran que el área bajo la curva (ROC) es de 0.84 mostrando diferentes puntos de corte (cut-off) para una sensibilidad y especificidad por debajo del 90%, así mismo encuentran inconsistencia en la relación entre la reactividad de EITB y la carga de quistes encontrados por necropsia (62), esto podría deberse a la viabilidad de los quistes encontrados, ya que es importante indicar el porcentaje de quistes degenerados y quistes viables hallados en el animal.

Según los reportes en la literatura consultada, es posible mejorar la sensibilidad y especificidad a partir de un ensayo de inmunodiagnóstico con antígenos purificados del sistema de secreción y excreción del Cisticerco de *T. solium* (10).

Es por ello que en el presente estudio se planteó evaluar la capacidad antigénica de 4 proteínas recombinantes y una proteína Multiepitópica, por lo que se realizó la correcta estandarización de un ensayo de ELISA indirecto.

Posteriormente a la estandarización, se evaluó el ensayo de ELISA indirecto con 92 sueros individuales de cerdos para cada una de las cinco proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos con los puntos de corte evaluados (NC-cutoff y PP) (Tabla 5) muestran que con una probabilidad del 95%, Tetraspanina 7 y Multiepitópica 1 (Sensibilidad de 93.62% y 90.70% respectivamente, y Especificidad de 97.73% y 95.24% respectivamente) son antígenos candidatos para inmunodiagnóstico por ELISA para Cisticercosis porcina por su alta Sensibilidad y Especificidad; pero Enolasa, Tripsina y Catepsina-L mostraron los indicadores de Sensibilidad, Especificidad e Índice de Youden bajos en comparación con los otros dos antígenos, esto podría deberse a una reacción cruzada y es posible que estén reconociendo anticuerpos que pertenecen a otros céstodos, o anticuerpos de proteínas homólogas (40). Se debe considerar que un resultado positivo no necesariamente significa que el animal esté infectado ya que podría ser causa de una exposición previa (10).

Ensayos previos con extractos crudos de cisticerco de *T. solium* en ensayos de ELISA muestran reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos del cerdo (63) así mismo, ensayos de Dot blot con antígenos crudos de cerdos propios de su región reportan una sensibilidad de 86.4% y especificidad del 93.2% (10).

Posteriormente algunos autores reportan ensayos de inmunodiagnóstico para cisticercosis porcina utilizando antígenos del sistema de excreción y secreción de *T. solium*, para ello los antígenos fueron obtenidos a partir de cultivos *in vitro* de

cisticercos en medio RPMI 1640, logrando una regular sensibilidad y alta especificidad del ensayo de ELISA (12). Estos últimos años, diferentes autores propusieron pruebas serológicas para el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina utilizando antígenos obtenidos de cisticercos de *T. solium* y *T. craciceps*, la detección de cisticercos viables se logró mediante un ensayo de captura de antígeno basado en anticuerpos monoclonales (HP10), utilizaron pruebas como ELISA y Western Blot (64). Así mismo se propuso utilizar siete antígenos candidatos para el diagnóstico de cisticercosis porcina, antígenos obtenidos a partir del genoma total de *T. solium* ya reportado (65), los cuales no tenían reacción cruzada con otros parásitos como *Ascaris* spp., *Cysticercus tenuicollis*, quistes hidatídicos de *Echinococcus* spp. o *Taenia saginata* (66), no se mostraba la especificidad y sensibilidad de cada antígeno utilizado en su estudio.

Otros estudios con Glicoproteínas y un antígeno quimérico recombinante (RecTs) indican que obtuvieron resultados con cerdos infectados naturalmente, 30 días post infección, a su vez no tenían reacción cruzada con *Taenia hydatigena*, los resultados que presentan en su estudio son correlativos a los que publican autores como Gonzales y col. en 1990 (28), utilizaron ensayos de ELISA e Immunoblot con sueros de cerdos infectados mostrando una sensibilidad mostrando una positividad de 64 y 68% para RecTs y 76 y 78% para Glicoproteínas respectivamente para cada ensayo (67). Ensayos de Ab-ELISA (utilizando antígenos de metacéstodes de *Taenia cassiceps*) muestran una sensibilidad de 35.8% y especificidad de 91.7%, y ensayos de Ag-ELISA muestran una sensibilidad de 86.7% y especificidad de 94.7%, los autores indican que la baja sensibilidad puede deberse a que su análisis estadístico no diferenció entre quistes

viabiles y quistes degenerados, en contraste, con el Ab-ELISA, que mide la exposición al parásito, el Ag-ELISA solo detecta cisticercos viabiles (59).

En base al análisis de McNemar podemos decir que los mejores antígenos para el inmunodiagnóstico de Cisticercosis porcina son Tetraspanina 7 y Multiepitópica 1, ya que ambas no presentan diferencias significativas entre sus especificidades y sensibilidades. Estos antígenos presentan porcentajes altos de sensibilidad y especificidad en el inmunodiagnóstico por ELISA en comparación con otros estudios, donde reportan ensayos de ELISA con un solo antígeno mostrando porcentajes menores a los obtenidos en el presente trabajo.

Inmunodiagnóstico en humanos

A nuestro entender, basado en la literatura actual, no existen reportes de trabajos similares para inmunodiagnóstico empleando una técnica similar al fast ELISA beads descrito en este trabajo.

Las proteínas recombinantes expresadas y purificadas en el laboratorio, tuvieron diferente reacción con las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto²⁺, ya que proteínas insolubles como Multiepitópica 1, Tripsina y Tetraspanina 7, requerían de Urea 4M para la denaturación química de la proteína (68), en el protocolo de ligación (antígeno-nanopartícula). En el caso de Catepsina-L, la dilución de los buffers (buffer de ligación y buffer de elución) se realizó con agua milliQ. Sin embargo, Enolasa, que es una proteína soluble, no pudo ligarse correctamente debido a que aglutinaba las nanopartículas magnéticas formando pequeños cúmulos, se realizó la estandarización a diferentes Temperaturas, pH de los buffers, ligación de NP-Proteína con agua MilliQ y Urea

4M. Es posible que el plegamiento de la proteína esté ocultando la cola de Histidina (6-HIS) y el Cobalto⁺² no pueda reconocerla fácilmente.

Aun cuando se da una alta variabilidad en el protocolo de ligación de antígeno a nanopartícula, se ha podido normalizar gracias a que hemos cuantificado la concentración de antígeno unido a NPM, esto nos permitió estandarizar el ensayo de fast ELISA beads.

De las proteínas seleccionadas para la estandarización del Ensayo de ELISA con NPM, se evaluó los Títulos de anticuerpo primario (pool de sueros positivos y negativos) y anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con HRP). Las proteínas recombinantes Multiepitópica 1 y Tripsina obtuvieron una razón de 2.8 y 4.0 respectivamente entre el pool positivo y negativo. Lo cual nos permitió estandarizar el ensayo de fast ELISA beads para ambas proteínas por separado.

En el ensayo de estandarización, las proteínas Catepsina-L y Tetraspanina 7 presentaban reacción cruzada con los sueros negativos, dando como resultado positivo para ambos controles (pool positivo y pool negativo). Esto puede tener muchas posibles explicaciones. Por ejemplo, es posible que la concentración de antígeno sea muy elevada, o que la estabilidad del antígeno sea afectada por la temperatura o el pH de los buffers durante el ensayo (69), o que el Co⁺² tenga poca estabilidad con algunas proteínas y sea recomendable utilizar otras nanopartículas funcionalizadas con Co⁺³ que tienen mejor estabilidad (70). Se requieren más estudios para aclarar esta observación.

La unión de las Histidinas con el Cobalto⁺² parece inicialmente ser débil, pero hemos demostrado que no es así, ya que luego de estandarizar el protocolo de

unión de la proteína recombinante con las nanopartículas, y realizar varios lavados, los antígenos permanecen ligados por su cola de Histidinas al Cobalto⁺² (44, 70).

El inmunoensayo de Fast ELISA beads con 24 sueros humanos se llevó a cabo con los antígenos Multiepitópica 1 y Tripsina por separado, de acuerdo a la Tabla 9, la Sensibilidad del ensayo de ELISA con nanopartículas fue del 50% y la Especificidad del 58% en el inmunodiagnóstico de Neurocisticercosis, resultados obtenidos con el antígeno Tripsina.

Según algunos autores indican que es posible que la reducción de anticuerpos circulantes en el humano infectado se deba a que ha recibido tratamiento alguno, la reducción va de 53% a 75%, 42 meses después del tratamiento con praziquantel (71). Por ello es que se utilizaron diluciones muy bajas de anticuerpo primario (suero de paciente), así mismo de anticuerpo secundario (anticuerpo anti IgG humano), es posible que esta alta concentración de suero esté influyendo en la sensibilidad del ensayo.

Es posible que en el caso de pacientes con Neurocisticercosis asociado a quiste único, se obtenga una baja sensibilidad y especificidad debido a que los niveles de anticuerpos circulantes son muy bajos, y por lo tanto no sean reconocidos por los antígenos en estudio.

El Ensayo de fast ELISA beads, no lleva Urea en el protocolo, por lo tanto, los antígenos que se encuentran resuspendidos en el buffer de elución 1X (diluido con Urea 4M), podrían tomar una conformación o plegarse al momento de ser diluido 100 veces en el pocillo de la microplaca de titulación con el BSA 3% y sueros.

Esto explicaría por qué los anticuerpos no lograrían reconocer la región antigénica en la proteína ligada a la NPM.

Es posible que exista reacción cruzada con anticuerpos de otros Helmintos, esto puede estar influyendo la especificidad del ensayo. Existen reportes donde indican que algunos sueros de pacientes con cisticercosis reaccionan con antígenos homólogos y heterólogos (72). Inclusive antígenos obtenidos a partir de *T. crassiceps* son utilizados para el diagnóstico de Neurocisticercosis humana en muestras de fluido cerebroespinal (73).

Lee y col. (74) propusieron expresar un antígeno recombinante (10-kDa) en el sistema de Baculovirus para el inmunodiagnóstico de Neurocisticercosis por Dot blot en suero y fluido cerebroespinal (CSF por sus siglas en inglés) alcanzando una alta sensibilidad y especificidad, y una reacción cruzada muy baja, pero evaluado los mismos sueros mediante un ensayo de ELISA tuvieron una alta reacción cruzada con *Echinococcus*.

La ventaja de usar nanopartículas magnéticas en una nueva técnica de fast ELISA beads, es mejorar la especificidad, ya que solo tendremos a nuestro antígeno unido por la cola de Histidina al Cobalto de la NPM. Así mismo se maximiza la sensibilidad del ensayo ya que se aumenta la superficie de captura de antígeno, y no depende solo de la superficie del pozo, ya que las NPM se encuentran en un buffer en el pozo de la micro placa de ELISA.

La cantidad de antígeno no va a aumentar a medida que usemos mayor cantidad de NPM ya que llega un punto en que se satura (no es lineal) por lo que no se

captura más antígeno por su cola de Histidina, por lo tanto, es importante estandarizar la cantidad de NPM que se van a utilizar en el ensayo.

CONCLUSIONES

Se expresó correctamente cada una de las cinco proteínas recombinantes en sistema procariótico de *E. coli* BL21 (DE3) pLys, obteniendo concentraciones altas de cada antígeno, a excepción de Enolasa.

Inmunodiagnóstico de Cisticercosis Porcina

Se evaluó la capacidad antigénica de cada una de las cinco proteínas recombinantes mediante el inmunodiagnóstico por ELISA, obteniendo una alta sensibilidad y especificidad para cisticercosis porcina.

La evaluación de la estandarización de los cinco antígenos recombinantes para el inmunodiagnóstico por ELISA de Cisticercosis porcina nos muestra una buena razón entre los pool de sueros positivos y negativos de cerdos. Se usaron dos puntos de corte (el primero es la media de los negativos más tres veces la desviación estándar y el segundo con el porcentaje de positividad) para los indicadores de sensibilidad y especificidad en el test de inmunodiagnóstico por ELISA indirecto con sueros de cerdo.

Se evaluaron los indicadores de sensibilidad, especificidad e índice de Youden para los test de inmunodiagnóstico por ELISA de 92 sueros individuales de cerdos, alcanzando altos porcentajes con los antígenos Tetraspanina 7 (sensibilidad: 93.6% especificidad: 97.7%) y Multiepitópica 1 (sensibilidad: 90.7% especificidad: 95.2%).

Inmunodiagnóstico de Neurocisticercosis Humana

Se evaluó la capacidad antigénica de cada una de las cinco proteínas recombinantes mediante el inmunodiagnóstico por ELISA, obteniendo una baja sensibilidad y especificidad para neurocisticercosis.

La estandarización de ligación de cada proteína recombinante a nanopartículas magnéticas funcionalizadas con Cobalto⁺² fue diferente, se logró con éxito unir el Cobalto de las nanopartículas magnéticas a la cola de Histidina para su aplicación en un ensayo de fast ELISA beads, a excepción de la estandarización con Enolasa que aglutinaba las nanopartículas.

La estandarización del ensayo de Fast ELISA beads con anticuerpos policlonales de conejo, mostró una buena razón entre los sueros positivos y negativos, así mismo, sin reacción cruzada con de los sueros policlonales con nanopartículas sin antígeno.

De los antígenos que se ligaron correctamente a las nanopartículas magnéticas, solo Tripsina y Multiepitópica 1 alcanzaron una razón aceptable para evaluar sueros humanos con Neurocisticercosis.

Se evaluaron los indicadores de sensibilidad, especificidad para los test de inmunodiagnóstico por fast ELISA beads de 24 sueros individuales de humanos con Neurocisticercosis, mostrando baja sensibilidad y especificidad con los antígenos evaluados (Tripsina y Multiepitópica 1).

RECOMENDACIONES

Si se conoce que el único hospedero intermediario de la Cisticercosis/Teniasis es el cerdo, se debe considerar un plan de vacunación, previa evaluación de cerdos para descartar Cisticercosis porcina mediante un ensayo de bajo costo, rápido, que sea sensible y específico.

Para validar la prueba de inmunodiagnóstico de Cisticercosis porcina se deben realizar nuevos ensayos con los antígenos con alta sensibilidad y especificidad, así mismo se deben evaluar nuevos sueros de cerdos infectados naturalmente, y sueros infectados con otros parásitos para evaluar si existe reacción cruzada.

En el ensayo de ELISA con nanopartículas se deben evaluar otras nanopartículas funcionalizadas ya sean con Cobalto⁺², Cobalto⁺³, Niquel⁺² o de otra casa comercial; ya que es posible que la manera que la proteína recombinante interacciona esté afectando las lecturas en el ensayo.

Ensayar otra forma de unión a nanopartículas como por ejemplo biotinar las proteínas recombinantes y unir las a nanopartículas funcionalizadas con estreptavidina. Producir las proteínas sin cola de histidinas, pero sí con biotina para unirla posteriormente a nanopartículas funcionalizadas con estreptavidina.

Concentrar anticuerpos de las muestras de sueros de los pacientes previo al ensayo de ELISA o Western blot.

Producir las proteínas en un sistema eucariótico como el de *Pichia pastoris* o de células de Insecto-Baculovirus, con un sitio de corte enzimático para la cola de Histidina, evaluar sueros de pacientes con Neurocisticercosis asociado quiste único mediante un ensayo de ELISA y Western blot.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO-WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Born Parasites. Rome; 2014.
2. Watanabe R. Estudio de la Cisticercosis Porcina en el Perú. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional de San Marcos; 2013.
3. Arroyo-Hurtado G. Serológica de la cisticercosis porcina en el Perú. 2010;15.
4. INEI. Resultados Definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Instituto Nacional de Estadística e Informática; 2012.
5. Taico U. F, López U. T, González Z. A, García L. H, Gilman R. Epidemiología de la cisticercosis porcina en tres caseríos de la provincia de Zarumilla, Tumbes. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2003;14:166-73.
6. Garcia HH, Del Brutto OH. *Taenia solium* cysticercosis. Infectious disease clinics of North America. 2000;14(1):97-119.
7. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, Angulo N, Chile N, Carmen R, Medina R. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. The American journal of pathology. 2015;185(8):2259-68.
8. Garcia HH, Gonzalez AE, Tsang VC, O'Neal SE, Llanos-Zavalaga F, Gonzalez G, Romero J, Rodriguez S, Moyano LM, Ayvar V. Elimination of *Taenia solium* transmission in Northern Peru. New England Journal of Medicine. 2016;374(24):2335-44.
9. Gonzalez AE, Garcia H, Gilman RH, Tsang VC, in Peru CWG. Control of *Taenia solium*. Acta tropica. 2003;87(1):103-9.
10. Agudelo Flórez P, Palacio L. Dot blot para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. Rev Sci Tech int Epiz. 2009;28(3).
11. Kumar D, Gaur S. *Taenia solium* cysticercosis in pigs. Helminthological Abstracts. 1994;63:365-83.
12. D'Souza P, Hafeez M. Detection of *Taenia solium* cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. Veterinary research communications. 1999;23(5):293-8.
13. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. The Lancet Neurology. 2014;13(12):1202-15.

14. Ayón ND, Fragoso G, García L, Roas G, Espitia C, Laclette J, Bobes RJ. The capacity of *Taenia solium*'s enolase to bind and activate human plasminogen. 2006.
15. Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, Valero ML, Del Pino MMS, Muñoz-Antoli C, Toledo R. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. PloS one. 2012;7(9):e45974.
16. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, Carrasco S, Larson S, Mayta H, Verástegui M, Rodríguez S, Gutiérrez-Correa M, García HH, Sheen P, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. Molecular and biochemical parasitology. 2011;180(2):115-9.
17. Flisser A, Avila G, Maravilla P, Mendlovic F, León-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Garza A, Gómez B, Aguilar L, Terán N, Velasco S, Benítez M, Jimenez-Gonzalez DE. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. Parasitology. 2010;137.
18. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, Gilman RH. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2010;27:592-7.
19. Bouteille B. Épidémiologie de la cysticercose et de la neurocysticercose. Médecine et Santé Tropicales. 2014;24(4):367-74.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cisticercosis [en línea]. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html>.
21. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH, Peru CWGi. *Taenia solium* cysticercosis. The Lancet. 2003;362(9383):547-56.
22. De Aluja AS, Villalobos AN. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México D.F.; 2000.
23. García H. H, Gonzales A, Martínez SS, Gilman RH. Teniasis/Cisticercosis por *Taenia solium*, un serio problema de salud pública en el Perú. PERU: Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología; 2001.
24. Walteros Acero D. Cisticercosis: Situación de la parasitosis. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2009.
25. Singhi P, Suthar R. Neurocysticercosis. The Indian Journal of Pediatrics. 2015;82(2):166-71.
26. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. Acta tropica. 2003;87(1):79-86.

27. Mahanty S, Garcia HH, Perú CWGi. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Progress in neurobiology*. 2010;91(2):172-84.
28. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1990;43(2):194-9.
29. Wang Q, Zhang S, Luo X, Hou J, Zhu X, Cai X. Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia pisiformis*. *Veterinary parasitology*. 2013;194(1):26-34.
30. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(2):136-48.
31. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R, Loukas A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature medicine*. 2006;12(7):835-40.
32. Zhu Y, Ren J, Da'dara A, Harn D, Xu M, Si J, Yu C, Liang Y, Ye P, Yin X, He W, Xu Y, Cao G, Hua W. The protective effect of a *Schistosoma japonicum* Chinese strain 23kDa plasmid DNA vaccine in pigs is enhanced with IL-12. *Vaccine*. 2004;23(1):78-83.
33. Wold F. 18 Enolase. *The enzymes*. 1971;5:499-538.
34. Fletcher L, Rider C, Taylor C. Enolase isoenzymes: III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1976;452(1):245-52.
35. Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MD. Capturing host plasmin (ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in microbiology*. 1994;2(1):20-4.
36. Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2001;58(7):902-20.
37. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106:85-90.
38. Bernal D, de la Rubia JE, Carrasco-Abad AM, Toledo R, Mas-Coma S, Marcilla A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS letters*. 2004;563(1-3):203-6.
39. de la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Pérez-Sánchez R, Siles-Lucas M, Oleaga A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding

surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary parasitology*. 2010;173(1):76-84.

40. Yang J, Qiu C, Xia Y, Yao L, Fu Z, Yuan C, Feng X, Lin J. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitology research*. 2010;107(3):667-77.

41. Bohara RA, Thorat ND, Yadav HM, Pawar SH. One-step synthesis of uniform and biocompatible amine functionalized cobalt ferrite nanoparticles: a potential carrier for biomedical applications. *New Journal of Chemistry*. 2014;38(7):2979-86.

42. Zhao J, Huang Z, Zeng J, Deng M, Yin G, Liao X, Gu J. Histidine-Assisted Synthesis and Cellular Compatibility of Magnetic Cobalt Oxide Nanoparticles at Room Temperature. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2012;22(2):492-9.

43. G-Biosciences. Cobalt Chelating Resin. Geno Technology Inc. USA.2014. p. 12.

44. Zhang L, Zhu X, Jiao D, Sun Y, Sun H. Efficient purification of His-tagged protein by superparamagnetic Fe₃O₄/Au-ANTA-Co²⁺ nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(4):1989-92.

45. Gavidia CM, Verastegui MR, Garcia HH, Lopez-Urbina T, Tsang VC, Pan W, Gilman RH, Gonzalez AE, Peru CWGi. Relationship between serum antibodies and *Taenia solium* larvae burden in pigs raised in field conditions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2192.

46. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases*. 1989;159(1):50-9.

47. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist*. 2014;4(4):205-12.

48. NOVEX®. Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown 2011 [Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/DynabeadsHisTagIsolationPulldown_man.pdf].

49. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-5.

50. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*. 2012;29(2):138-41.

51. Trajman A, Luiz R. McNemar χ^2 test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2008;68(1):77-80.

52. Malla N, Kaur R, Ganguly NK, Sawhney I, Mahajan RC. Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. *Nepal Medical College journal: NMCJ*. 2005;7(1):1-9.
53. Odashima NS, Takayanagui OM, Figueiredo JFdC. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2002;60(2B):400-5.
54. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical chemistry*. 1993;39(4):561-77.
55. Clement F, Dewar V, Van Braeckel E, Desombere I, Dewerchin M, Swysen C, Demoitié M-A, Jongert E, Cohen J, Leroux-Roels G. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of human IgG directed against the repeat region of the circumsporozoite protein of the parasite *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal*. 2012;11(1):1.
56. Sækmose SG, Schlosser A, Holst R, Johansson SL, Wulf-Johansson H, Tornøe I, Vestbo J, Kyvik KO, Barington T, Holmskov U. Enzyme-linked immunosorbent assay characterization of basal variation and heritability of systemic microfibrillar-associated protein 4. *PloS one*. 2013;8(12):e82383.
57. Gilman R, Garcia H, Gonzalez A, Dunleavy M, Verastegui M, Evans C. Short cuts to development: methods to control the transmission of cysticercosis in developing countries. *Taenia solium taeniasis/cysticercosis* Lima Ed Universo p. 1999:313-26.
58. Sikasunge C, Johansen MV, Willingham A, Leifsson PS, Phiri I. *Taenia solium* porcine cysticercosis: viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. *Veterinary parasitology*. 2008;158(1):57-66.
59. Dorny P, Phiri I, Vercruysse J, Gabriël S, Willingham Iii A, Brandt J, Victor B, Speybroeck N, Berkvens D. A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *International journal for parasitology*. 2004;34(5):569-76.
60. Flisser A, Gauci CG, Martinez-Ocaña J, Zoli A, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowers MW. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncospheres antigens. *Infect Immun*. 2004;72.
61. Phiri I, Dorny P, Gabriël S, Willingham AL, Sikasunge C, Siziya S, Vercruysse J. Assessment of routine inspection methods for porcine cysticercosis in Zambian village pigs. *Journal of helminthology*. 2006;80(1):69-72.

62. Jayashi CM, Gonzalez AE, Neyra RC, Rodríguez S, García HH, Lightowlers MW, Peru CwGi. Validity of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for naturally acquired porcine cysticercosis. *Veterinary parasitology*. 2014;199(1-2):42-9.
63. Cheng R, Ko RC. Cross-reactions between crude antigens of larval *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) and other helminths of pigs. *Veterinary parasitology*. 1991;39(1-2):161-70.
64. Sciutto E, Hernández M, García G, De Aluja A, Villalobos A, Rodarte L, Parkhouse M, Harrison L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Veterinary Parasitology*. 1998;78(3):185-94.
65. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 2013;496(7443):57.
66. Diaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, Mendoza-Hernández G, Rosas G, Estrada K, Carrero JC, Sciutto E, Laclette JP, Bobes RJ. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. *The Veterinary Journal*. 2013;198(3):656-60.
67. Sato M, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Plancarte A, Kassuku A, Dorny P, Geerts S, Benitez-Ortiz W. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. *Veterinary Parasitology*. 2003;111(4):309-22.
68. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5142-7.
69. Yang J, Ni K, Wei D, Ren Y. One-step purification and immobilization of his-tagged protein via Ni²⁺-functionalized Fe₃O₄@ polydopamine magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2015;20(5):901-7.
70. Wegner SV, Schenk FC, Spatz JP. Cobalt (III)-Mediated Permanent and Stable Immobilization of Histidine-Tagged Proteins on NTA-Functionalized Surfaces. *Chemistry—A European Journal*. 2016;22(9):3156-62.
71. Sarti E, Schantz P, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(1):85-9.
72. Ishida M, Rubinsky-Elefant G, Ferreira A, Hoshino-Shimizu S, Vaz A. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*,

Schistosoma mansoni and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta tropica*. 2003;89(1):73-84.

73. Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ, dos Ramos Machado L, Peralta JM. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002;9(1):190-3.

74. Lee E-G, Lee M-Y, Chung J-Y, Je E-Y, Bae Y-A, Na B-K, Kim T-S, Eom K-S, Cho S-Y, Kong Y. 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):919-26.

75. León N, Padilla C, Pajuelo M, Sheen P, Zimic M. Cathepsin L cysteine protease from *Taenia solium*: its biological role in the infection and potential use for the immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2013;30(3):446-54.

76. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC bioinformatics*. 2007;8(1):1.

ANEXOS

ANEXO 1: Estudios preliminares

Trabajos previos reportan que se tiene la anotación completa del genoma de *Taenia solium*, del mismo modo se cuenta con el proteoma completo de la larva (cisticerco), para lo cual se realizó dos tipos de predicciones, primero se identificó proteínas potencialmente expuestas, se filtran todas las proteínas de secreción y transmembrana y se analizan sus dominios extracelular; segundo, de las proteínas seleccionadas, se realizó un ranking de antigenicidad, se realizó una predicción de epítopes inmunogénicos, a partir de un programa bioinformático (NetMHC), obteniendo un score con el grado de inmunogenicidad de cada una de las proteínas expuestas (cantidad de epítopes y score de cada una).

Diseño de cebadores, obtención de cDNA y clonamiento

Se diseñaron cebadores para clonamiento y para amplificar cada una de las proteínas seleccionadas (Tetraspanina 7, Enolasa, Tripsina, y Catepsina-L). Se utilizaron la secuencia de mRNA de cada proteína localizada en el GenBank, y se utilizaron herramientas bioinformáticas con PrimerBlast y Blast. Se debe tener en cuenta que el sitio de corte de la enzima de restricción en el vector de clonación pET28a+ incluya a la cola de Histidina para cada proteína independientemente. Así mismo, se utilizó el programa en línea Oligoanalyzer 3.1 para evaluar que los cebadores seleccionados no formen estructuras secundarias, ya que podrían inhibir la hibridación de los cebadores seleccionados a la secuencia molde, se verificó que las temperaturas de hibridación de los pares de cebadores sean muy similares, no más de 3°C de diferencia entre ellos.

En el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular se realizó la extracción de mRNA maduro (método de TRIZOL-Invitrogen) de tejidos de *T. solium* en estado larval (*Cysticercus cellulosae*). Luego se produjo cDNA a partir del mRNA de cada uno de los cuatro genes (Tetraspanina 7, Enolasa, Tripsina y Catepsina-L) mediante cebadores, y un kit de amplificación de RT-PCR (TaqMan Universal PCR®, Applied Biosystems).

Se realizó la digestión enzimática de cada uno de los genes y del vector pET28a+ con enzimas sitio específico (NcoI y XhoI), luego se realizó la ligación de cada uno de los genes por separado en un vector pET28a+, una vez realizado el ensayo de ligación se procedió a transformar cada uno de los vectores que llevaban cada uno de los genes (por separado) obteniendo un total de cuatro vectores (16, 75), se realizó la transformación en un sistema de clonación como es la cepa “Novablue” de *E. coli*. Luego se extrajeron los plásmidos y se realizó una secuenciación y confirmó la presencia de cada uno de los insertos (Tetraspanina 7, Enolasa, Tripsina y Catepsina-L) y que se encuentren sin mutaciones, para realizar la siguiente etapa que es la expresión de cada uno de los genes.

Diseño de proteína Multiepitópica 1 a partir de proteínas de alta exposición

A partir del genoma disponible de *T. solium*, se identificaron secuencias codificantes de proteínas de superficie altamente antigénicas. Adicionalmente se han identificado un grupo de proteínas que por investigaciones previas en otros parásitos cercanos evolutivamente, han demostrado ser altamente antigénicas. A partir del proteoma

parcial de la larva de *T. solium* (aproximadamente 1500 proteínas) se predijo las potenciales proteínas antigénicas (1048 proteínas).

Predicción de epítopes

De las 1048 proteínas seleccionadas previamente, se escogieron los alelos de MHC-II humano más frecuente en la población mundial. La predicción se realizó usando el predictor en línea NetMHCIIpan v3.0 (76). Debido al gran número de proteínas candidatas, la predicción se tuvo que realizar por partes.

Selección de epítopes

El criterio para la selección de epítopes afines a los diferentes alelos de MHC clase II fue el recomendado por el predictor: péptidos con un IC50 teórico menor a 50 nM, el resto de los péptidos fueron descartados. Se filtraron los epítopes por alelos para facilitar el análisis a futuro.

Los epítopes obtenidos fueron filtrados seleccionando los que cumplan los siguientes criterios en orden de prioridad: 1). No estar presentes en el proteoma o microbioma humano, ni posibles organismos que pudieran dar reacción cruzada. 2). Alta afinidad a todos los alelos de MHCII humano analizados ($IC_{50} < 500nM$). 3). Ser estrictamente conservados a nivel de secuencias homologas reportadas en *T. solium*, respecto a la información disponible.

Diseño de la secuencia génica codificante

Con los epítopes seleccionados, se diseñó *in silico* las correspondientes secuencias génicas que codifican a la proteína multiepitópica, uniendo los epítopes consecutivamente y evitando la formación de nuevos epítopes en las uniones. Se

optimizó la frecuencia de codones a la distribución natural de codón usage de *E. coli*. Finalmente se añadió sitios de restricción para clonación a los extremos. La empresa Genscript USA Inc. sintetizó la secuencia de ADN codante para la proteína diseñada.

ANEXO 2: Protocolo de Inmunización en conejos

Con la finalidad de evaluar la inmunogenicidad de cada una de las proteínas, se realizaron ensayos en los que cada una de las proteínas fueron inoculadas (individualmente) en conejos (*Orhyctolagus cuniculus*) de la raza New Zealand White de 45 días de edad (de acuerdo a las normas del comité de Bioética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia). La inoculación se realizó en 4 dosis vía subcutánea, a intervalos de una semana para cada una de ellas, a excepción de la primera y la segunda dosis que fue a las dos semanas.

Antes de la inmunización se obtuvo el suero pre-inmune mediante la dosis intradermicamente. Las muestras de sangre pre-inmune se tomaron de la punta de la oreja, lejos de la base de la oreja. La oreja se calentó con el fin de dilatar el vaso sanguíneo, esto se hizo acariciando suavemente. La técnica se llevó a cabo aseptícamente desinfectando la zona de la oreja con alcohol de 70° y se anestesió usando Lidocaína local en ungüento, por lo que no se generó dolor en el conejo.

En el caso de la punción cardiaca, se siguieron procedimientos básicos para evitar cualquier dolor o estrés en el animal. Al animal anestesiado se le extrajo toda la sangre del corazón mediante punción cardiaca. Se administró una sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal) en una dosis de 70 mg/Kg (2.15 mL de Halatal al 6.5%), es hipnótico y anticonvulsivante que en sobredosis produce un paro cardio-respiratorio lo que lleva a la muerte del animal. El conejo fue envuelto en una tela grande para evitar movimientos inadvertidos. El conejo estuvo restringido, no obstante, para que esto no cause estrés, la duración de la restricción fue minimizada.

Manejo de la muestra: La sangre fue centrifugada a 3000g por 5 minutos a 4°C para obtener el suero, al cual se le midió los niveles de anticuerpos contra la proteína de interés, los sueros fueron alicuotados y correctamente rotulados para posteriormente sean almacenados a -70°C.

Manejo de residuos biológicos contaminados: Los desechos fecales no estaban contaminados con tóxicos o microorganismos, y fueron eliminados en bolsas rojas para autoclave, al igual que los animales muertos, luego de esterilizados fueron descartados por el personal del bioterio en el contenedor de sustancias orgánicas ubicados en la parte posterior del edificio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID). Las agujas fueron descartadas en un descartador para punzocortantes.

Se desinfectó la zona de trabajo con lejía al 10%, los desechos como algodón jeringas, tubos y guantes fueron eliminados en bolsas rojas para material Biológico.

Alojamiento de los animales: Se mantuvo a los animales en el bioterio de la facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), los animales fueron atendidos de acuerdo a las directrices de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, los cuales han sido reconocidos en cumplir con los estándares de Estados Unidos. El cuidado de los animales es administrado día a día. La luz proporcionada fue artificial (foco fluorescente), se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, la temperatura se mantuvo entre 22-25°C.

Alimentación: Se suministró aproximadamente 250 gr de conejina 2 veces por día, así como 250 ml de agua por cada conejo.