

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA RTSAG18 COMO RECURSO
PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA
CISTICERCOSIS BOVINA**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

ABELARDO RODRIGUEZ GARDEA

DIRECTOR

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI BAJA CALIFORNIA, MEXICO

ENERO DE 2016

La presente tesis “(EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA RTSAG18 COMO RECURSO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA CISTICERCOSIS BOVINA)” realizada por el **C. Abelardo Rodríguez Gardea**, dirigido por el **Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.
Director de Tesis

Dr. Gilberto Lopez Valencia.
Secretario

Dra. Sawako Oshima
Sinodal

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Sinodal

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado
Sinodal

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Etiología	3
Taxonomía y morfología	3
Ciclo biológico del parásito	4
Nivel de infección del ganado con <i>Cysticercus bovis</i>	5
Epidemiología	5
Diagnóstico	7
Diagnóstico de la teniasis	7
Diagnóstico parasitológico	7
Diagnóstico inmunológico.....	7
Diagnóstico de cisticercosis bovina	8
Diagnóstico parasitológico.....	8
Examen estereoscópico.....	12
Histología.....	12
Inmunohistoquímica.....	14
ELISA basada en la detección de anticuerpos	15
ELISA basada en la detección de antígenos	16
Inmunoelectrotransferencia (EITB).....	17
Inmunoensayo (Dipstick)	17
ELISA de punto	17
Técnicas moleculares	18
Desarrollo de tecnología para el diagnóstico de cisticercosis bovina	18
Caracterización de la proteína recombinante rTsag18.....	20
Conclusiones.....	20
LITERATURA CITADA	20

Anexos

“Evaluation of a baculovirus recombinant 18 kda protein of taenia saginata as a potential source of antigen for the antemortem detection of antibodies to cysticercus bovis in feedlot cattle.” 31

“Expression of the Microbacterial Antigen Hsp65 in Food Lactococcus Lactis Bacterium” 43

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis bovina es una enfermedad que afecta al ganado y es causada por el *Cysticercus bovis*, forma larval de la *Taenia saginata* (Wanzala et al 2003, Abuseir et al 2007). Además de ser una causa importante de pérdidas económicas en la producción ganadera a nivel mundial, por causa de la retención y el decomiso de las canales sugestivas o positivas, tiene importancia en la salud pública por tratarse de una enfermedad zoonótica (Phiri 2006; Garza-Rodríguez et al., 2007). En México, su diagnóstico, se basa solo en la inspección visual de la carne según la NOM-009-ZOO-1994; con poca sensibilidad <(50%) ya que solo detecta casos de animales altamente infectados con cisticercos, degenerados o calcificados, y no las canales infectadas con cisticercos viables, ya que estos últimos pueden presentar un color desde blanco hasta rojizo, llegándose a confundir con la carne, además, la detección visual de la cisticercosis depende de la experiencia del inspector del rastro; se ha tratado de desarrollar distintas técnicas de diagnóstico alternativas rápidas y confiables dentro de las que se incluyen la detección serológica ante-mortem de antígenos y anticuerpos de *Cysticercus bovis* sin tener los resultados óptimos deseados, ya que han proporcionando solo un 60% de sensibilidad para detectar animales positivos (Minozzo et al., 2004; Monteiro et al., 2007; Rodríguez-Hidalgo et al., 2006).

Durante la última década, numerosas innovaciones tecnológicas se han llevado a cabo para mejorar el sistema de expresión en baculovirus y hoy en día resulta la opción más viable debido a su sencillez, economía y rapidez, así como por su bioseguridad y posibilidad de un fácil escalado a nivel industrial de la proteína de interés (Kost et al., 2005). El sistema de expresión por baculovirus (BEVS, del inglés Baculovirus Expression Vector System) resulta ser uno de los sistemas de expresión de proteínas 9 recombinantes más versátiles y poderosos (Luckow y Summers, 1988). Varias líneas establecidas de células de insecto son susceptibles a la infección por AcMNPV. Entre ellas están las provenientes de *Spodóptera frugiperda*. Las líneas más utilizadas son Sf9 y Sf21, ambas obtenidas a partir de tejidos de ovario de *Spodóptera frugiperda*. Aprovechando que el gen promotor de polihedrina en el baculovirus es un determinante

para una alta producción de las proteínas recombinantes, será utilizado para expresar y producir identificar la proteína Tsag18 antígeno de las oncósferas de los céstodos del género *Taenia* spp. Con esta nueva técnica de diagnóstico ante-mortem se evitaría la retención y destrucción de las canales en las plantas de sacrificio evitando pérdidas económicas hasta por 2 mil millones de pesos al año a nivel mundial (Wanzala et al., 2003).

Por lo cual el objetivo de la presente es desarrollar una plataforma de expresión en baculovirus para la producción de proteína recombinante rTsag18 de *T. saginata* como plataforma de diagnóstico serológico antemortem de cisticercosis bovina.

REVISION DE LITERATURA

Etiología.

El complejo teniasis- cisticercosis, es causado por el cestodo *Taenia saginata* el cual infectan al ser humano que constituye su huésped natural definitivo y al ganado bovino que representa su huésped intermediario. A la infección en el humano con el parásito adulto se le llama teniasis la cual es provocada por el consumo de carne cruda o mal cocida infectada con la fase larvaria o cisticerco a cuya dicha infestación se le conoce como cisticercosis; la cual es adquirida por el ganado bovino; al consumir huevecillos de la tenia, que son excretados en heces de portadores del parásito adulto (Wanzala *et al* 2003, Abuseir *et al* 2007).

Taxonomía y morfología.

Todas las especies de tenias del género *Taenia* se catalogan dentro de la familia *Taenidae*, en el orden *Cyclophyllidea*, de la clase *Cestoda*; la nomenclatura científica para las especies de Tenias, es algo confusa a diferencia de otras especies de parásitos; al estado larvario y al adulto de las tenias se les asignan diferentes nombres científicos. Esto debido a que la fase larvaria y adulta se encontraban en diferentes hospedadores por lo que se creía que se trataba de diferentes especies de parásitos originando así que a la larva de *Taenia saginata* se le nombrara *Cysticercus bovis* y no fue hasta mediados del siglo XIX que los científicos Kutchenmeister y Leuckart demostraron la conexión entre la fase larvaria y adulta de estas especies. Pero de cualquier manera esa nomenclatura persiste hasta hoy en día (Grove, 1990).

La tenia adulta puede llegar a medir varios metros de largo, estando constituida por un escólex o cabeza en su parte anterior ($\leq 2 \mu\text{m}$ de diámetro) y una cadena achatada dorsoventralmente llamada estróbilo; constituida por segmentos o proglótidos acomodados progresivamente, que al madurar cuentan con un sistema reproductivo hermafrodita. El escólex tiene cuatro ventosas musculares (Barriga 2002). La fase larvaria o cisticerco, alcanza normalmente una dimensión máxima de aproximadamente

de 2-10 mm cuando se desarrolla completamente. Dichos cisticercos están formados por una vesícula de forma ovalada y translúcida llena de fluido que contiene un escólex invaginado que al igual que la tenia adulta posee cuatro ventosas; dicha vesícula o cápsula es un tegumento citoplásmico, sincicial y continuo por donde obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos puesto que los cestodos carecen de tracto digestivo (Urquhart et al 2001, Barriga 2002). Los huevecillos provenientes de proglótidos maduros o “grávidos” son de un tamaño alrededor de 20-40µm y morfológicamente son indistinguibles de otras especies de tenia (Quiroz 2002).

Ciclo biológico.

Las tenias tienen un ciclo de vida indirecto, teniendo hospedadores relativamente específicos tanto para sus estadios larvarios como para sus estadios adultos; los humanos son los huéspedes naturales definitivos para la tenia adulta. En el caso de la *T. saginata* la infestación del humano se da por medio del consumo de carne de bovino cruda o mal cocida contaminada con *Cysticercus bovis* (Gracey et al 1999, Abuseir et al 2007, Geysen et al 2007). Una vez en el tubo digestivo del hospedador definitivo, las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares del huésped, participan en la activación del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex comenzando así su fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos. Después de ocho a doce semanas de la infección, los proglótidos grávidos comienzan a ser desprendidos espontáneamente por el gusano adulto y evacuados hacia el exterior en heces del huésped; donde por el mal manejo de excretas humanas, provoca la adquisición de la cisticercosis, en los bovinos, que se da por la ingestión accidental de material fecal con huevecillos fértiles que contaminan aguas o pastizales con los que se alimenta al ganado; los cuales una vez en el tubo digestivo del huésped intermediario son activados por las enzimas proteolíticas y las sales biliares para la liberación de los embriones hexacantos (oncosferas), los cuales, penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen primariamente en el sistema musculoesquelético y menos frecuentemente en grasa y

órganos viscerales donde se convertirán en metacestodos y podrán sobrevivir por algún tiempo ocasionando una reacción inflamatoria y posteriormente atravesará por distintas etapas hasta llegar a la muerte del embrión y a la fase de calcificación del quiste(Cordero del Campillo *et al* 1999).

Nivel de infección del ganado con *Cysticercus bovis*.

Los niveles de infección más común observada son las infecciones leves. Souza *et al* (2007) reportaron del total de canales positivas, el 94% de ellos estaban infectados por un solo cisticerco y 6% de infección masiva. En adición Jahed *et al* (2010) encontraron solo el 0,02% de infecciones masivas. Así como también Abuseir *et al* (2006) señalan que las infecciones con un solo cisticerco son altos, pero las infecciones con dos (5,6%), tres (0,4%) y masivos son bajos.

Adicionalmente los resultados de otros estudios realizados por Kyvsgaard *et al* (1991), Dorny y Praet (2007), Wanzala *et al* (2007), Dorny *et al* (2009) señalan que las infecciones masivas en el ganado son poco comunes mientras que la infección leve es mucho más común. Esto debido probablemente a la ingestión accidental de huevos que se encuentran diseminados en el medio ambiente. En países industrializados la infección está asociado con la aplicación ilegal de tanques de lodos sépticos en pastos o cultivos, o por la defecación indiscriminada de trabajadores agrícolas o relacionados con camping y turismo. Según Rodríguez-Hidalgo *et al* (2009) los bovinos ingieren huevos de *T. saginata* juntamente con el forraje y no con las heces fecales haciendo que las infecciones sean mínimas en el hospedador intermediario.

Epidemiología.

La infección es particularmente importante en África y Sudamérica y en algunos países mediterráneos. Según Murell (2005), la cisticercosis es altamente endémica en África, America latina y Asia. Entre las regiones con alta prevalencia se mencionan a los países del sur-este y sur del continente africano con rangos de 1,0-40,0% en bovinos sacrificados en Kenia, Uganda, Sudán, Tanzania, Botswana y Simbabwe y Sudáfrica.

También en otros estudios, realizados en Etiopía, mostraron rangos de 7,5-26,25% (Abunna *et al* 2008, Kebede 2008, Kebede *et al* 2009, Regassa *et al* 2009). Entre las regiones con una prevalencia moderada están: Irán con 0,25% (Jahed *et al* 2010), Chile con 0,39%, 0,17%, 0,28% respectivamente para los años 2007, 2008 y 2009 (Roco 2009, 2010), Ecuador con 0,37% (Rodríguez-Hidalgo *et al* 2003), Cuba con 0,9% (Suárez y Santizo 2005), Nicaragua con 0.14%, Salvador con 3.07 %, Uruguay con 0.50%, Colombia con 0.10% (De la Fe Rodríguez *et al* 2006), Bolivia con 0,11% (Peña 1991) y en Brasil los resultados de diferentes trabajos muestran rangos de prevalencia de 3,83-9,30% (Almeida *et al* 2006, Carvalho *et al* 2006, Falavigna *et al* 2006, Souza *et al* 2007). Por otra parte, bajas prevalencias son reportadas en Europa que oscila en general entre 0,007 a 6,8% (Cabaret *et al* 2002, Dorny y Praet 2007), en España se reportan prevalencias de 0,015- 0,54% (Allepuz *et al* 2009), en Alemania 0,48-1,08% (Abuseir *et al* 2006), en Italia 0,116% (Giuseppe *et al* (2010), en Bélgica 0,22-0,44% (Boone *et al* 2007), en Suiza 4,5% (Eichenberger *et al* 2011).

El consumo de carne mal cocida o cruda infectada con cisticercos viables, es el mayor factor de riesgo para la transmisión de la *T. saginata* entre el ganado vacuno y el hombre (Barriga 2002, Kebede 2008); Respecto a la trasmisión de la fase larvaria o cisticercosis en el ganado donde el agente causal es el *Cysticercus bovis* ocurre por medio del consumo de huevecillos fértiles, que contaminan el alimento del ganado como, pasturas, forrajes o el agua de consumo. (Gracey *et al* 1999, Abuseir *et al* 2007, Geysen *et al* 2007). El contacto con humanos contaminados (granjeros, pastores etc.) constituye el principal factor de riesgo en la epidemiología de la cisticercosis bovina. El inadecuado control y manejo de heces humanas, así como la falta de procedimientos que destruyan los huevecillos contenidos en estos juegan un papel sumamente importante en la diseminación de la infestación de cisticercos (Opara *et al* 2006, Regassa *et al* 2009, Abunna *et al* 2008).

Recientemente también se han visto en aumento el número de diagnósticos de teniasis en países donde se consideraban libres de esta; como Estados Unidos de Norteamérica y algunos países de Europa, donde la migración de personas portadoras de la tenia que son procedentes de zonas endémicas, causan el aumento de las cifras de casos positivos (Abuseir *et al* 2006, Cabaret *et al* 2002, Scandrett *et al* 2009).

DIAGNÓSTICO.

Diagnóstico de la teniasis.

Diagnostico parasitológico.

El diagnóstico de la teniasis se basa en la obtención y estudio de material parasitario como: proglótidos grávidos, escólex o huevos por medio del tamizaje o por el encuentro casual en las heces del paciente. La observación de huevos mediante las técnicas coprológicas, solo puede indicar teniasis, ya que el estudio de la morfología de los huevos no permite ninguna diferenciación entre especies, pues son morfológicamente idénticos (Barriga 2002). Por otro lado, la observación directa de los parásitos en muestras fecales y el examen de las ramificaciones laterales uterinas de los proglótidos grávidos nos permite el diagnóstico de especie ya que la de *T. saginata* presentan más de quince ramas uterinas; aunque presenta inconvenientes, debido a la excreción irregular de elementos parasitarios, su falta de eliminación durante los tres primeros meses de la infección y el uso de fármacos cestocidas que provocan la desintegración de la parte proximal del gusano y la pérdida del escólex, dificultan dicha identificación, ocasionando que este tipos de técnicas tengan muy baja sensibilidad y especificidad (Allan *et al.*1990; Machnicka *et al.* 1996;Montenegro *et al* 1996).

Diagnostico inmunológico.

Se han desarrollado técnicas para la detección de coproantígenos de *Taenia* mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales en las heces, un método de enzimoimmunoensayo de captura, y permite la detección de antígenos específicos de género (*T. saginata* y *T. solium*), sin que existan reacciones cruzadas con otros parásitos. La detección de los niveles de coproantígenos es independiente de la presencia o número de huevos. Los coproantígenos no se detectan en heces tras una semana de tratamiento y son estables durante días en muestras fecales no fijadas a temperatura ambiente, y durante periodos muy largos (meses o años) en muestras congeladas o fijadas con formalina a temperatura ambiente. También se han

desarrollado técnicas para la detección de anticuerpos en sueros de individuos con teniasis, la mayoría con baja sensibilidad y especificidad (Meza-Lucas y Aguilar, 2002).

Diagnóstico de la cisticercosis bovina.

Diagnóstico parasitológico.

En el caso de cisticercosis bovina el diagnóstico parasitológico se efectúa de manera postmortem, por medio de la inspección de las canales en los rastros (Soulsby 1987).

En México la inspección de las canales es la única medida de salud pública implementada para la prevención de la zoonosis por teniasis en este caso por *Taenia saginata*; la cual consiste en efectuar una observación visual y/o palpación de la superficie de la canal expuesta después del sacrificio o de la superficie expuesta por cortes parciales en órganos y músculos (corazón, maseteros, lengua, bíceps, hígado) considerados como sitios de “predilección” o blanco de los cisticercos de *T. saginata* según la NOM-009-ZOO-1994. Aunque si bien se debe considerar que dependiendo la magnitud de la densidad, los embriones se diseminan por todo el cuerpo y se desarrollan en la musculatura esquelética y cardíaca, aunque también en la grasa y otros órganos como el hígado y el pulmón (Soulsby 1987, Cordero del Campillo *et al* 1999, Urquhart *et al* 2001). En el pasado se consideró que los músculos predilectos eran los maséteros, el corazón, el diafragma y la lengua, pero normalmente los cisticercos se distribuyen por todo el cuerpo (Soulsby 1987). Se han observado cisticercos degenerados en la superficie de la serosa del rumen, glándula salival, nódulos linfáticos submandibular y submaxilar (Ogunremi *et al* 2004a).

La distribución anatómica de la cisticercosis bovina depende de numerosos factores como la cinética de la sangre, raza, actividad muscular, edad, área geográfica (Opara *et al* 2006, Scandrett *et al* 2009) que afectan la distribución de las oncosferas en el organismo (Abunna *et al* 2008).

Los cisticercos a menudo pueden ser detectados durante la inspección rutinaria de carnes en los sitios tradicionales de inspección como el corazón, músculos maséteros

internos y externos, músculos pterigoideos, lengua, esófago, diafragma, músculo esquelético, músculo tríceps, músculos del muslo (Abuseir *et al* 2006, Abunna *et al* 2008, Kebede 2008, Kebede *et al* 2009, Scandrett *et al* 2009), coincidiendo con las localizaciones preferenciales del cisticerco (Soulsby 1987, Urquhart *et al* 2001).

En relación a la distribución de los cisticercos en sitios de inspección se observa mayor frecuencia del parasito en corazón y músculo masétero. De acuerdo a Abuseir *et al* (2006) los hallazgos de cisticercos en cabeza (músculos maséteros 86,1%) son más frecuente que el corazón, mientras que Carvalho *et al* (2006) observaron en cabeza 55,51%, seguido por corazón con 42,70%, en lengua 1,10% y en canal 0,69%, los cuales son comparables con los de Moreira *et al* (2001), quienes observaron en la cabeza 52%, en corazón 42,6%, en adición Souza *et al* (2007) observaron 57,77% en cabeza, y 39,65% en corazón. También Santos (2003) reportó en músculo masetero 56%, en corazón 28% y en lengua 8% en bovinos naturalmente infectados.

Minozzo *et al* (2002) han demostrado una amplia distribución del metacestodo de la *T. saginata* en los músculos del bovino. Pese a lo anterior, en muchos casos se han encontrado cisticercos en otros sitios no tradicionales (Wanzala *et al* 2003, Abuseir *et al* 2006), como el pulmón, hígado, músculos del cuello y extremidades posteriores, pecho, regiones pélvicas y lumbares (Scandrett *et al* 2009), bazo, músculos intercostales, mucosa intestinal (Kebede *et al* 2009).

En la disección total de la canal, la distribución de los cisticercos en los cortes de carne muestran variación, al respecto Lopes *et al* (2011) reportaron una amplia distribución de los cisticercos en los cortes de carne de bovinos infectados experimentalmente, donde los sitios de predilección de los cisticercos son la paleta 12,55%, corazón 11,02%, hígado 9,48%, músculos maséteros 8,51%, chuck 8,25%, bife angosto y filete 7,26%, osobuco 6,63% y costillas 5,53%, totalizando 69,23% de todos los cisticercos detectados, estos resultados son similares a los de Manhoso (1996), Kebede (2008) y Scandrett *et al* (2009). Sin embargo valores superiores fueron encontrados por Minozzo *et al* (2002) quienes demostraron que el 81,33% de los cisticercos parasitaban los músculos de la parte delantera y trasera. Por el contrario Wanzala *et al* (2003) en

infecciones artificiales observaron una mayor frecuencia de los cisticercos en vísceras (hígado 22,00% y el corazón 17,13%), seguido de los miembros (posteriores 15,02%, anteriores 13,35% y el pecho 6,49%). Este patrón se revirtió en el ganado infectado naturalmente, donde los miembros anteriores presentan 24,74%, el miembros posteriores 23,85%, el pecho 9,24% que albergan el mayor número de cisticercos y seguido por las vísceras (hígado 12,22% y el corazón 8,79%).

La mayoría de los autores muestran que hay diferencias en la distribución de los cisticercos en los sitios de predilección, probables se debe a la falta de estandarización de las técnicas, el tamaño de la muestra (n) examinados, diferentes zonas geográficas, actividad diaria de los animales, diferencia de edades de los animales beneficiados, densidad de la población en la zona de origen de los animales beneficiados, sistema de crianza y cinética de la sangre que determina la distribución de los cisticercos en el animal (Wanzala et al 2003, Ogunremi *et al* 2004a, Carvalho *et al* 2006, Souza *et al* 2007, Lopes *et al* 2011). De acuerdo a numerosos estudios de infecciones naturales y experimentales en el ganado, es discutible si el parásito tiene verdaderamente sitios de predilección o puede estar distribuido en cualquier sitio (Kyvsgaard *et al* 1990, Maeda *et al* 1996, OPS/OMS 2003). Por ejemplo (Wanzala *et al* 2003), reportaron que de un total de 25 canales de ganado que había sido infestado naturalmente, solo se detectaron el 14.1% del total de cisticercos de las canales por medio de la inspección de los sitios indicados anteriormente y solamente 5.8% de los cisticercos totales de las canales se encontraron en la superficie de los cortes hechos con la técnica de inspección de carnes. Este tipo de técnica se ve influida tanto por la prevalencia de la enfermedad, el número de parásitos que infestan la canal, el estado de desarrollo en el que se encuentra el parásito, así como, de la experiencia y la habilidad del inspector. (Walther y Koske, 1980) demostraron, que solo se detectaron el 27% de canales infestadas con 1 a 10 cisticercos, 42.9% de canales con 11 a 20 cisticercos y el 77.8% con más de 20 cisticercos por medio de la inspección de rutina.

Aunque bien la distribución anatómica de los cisticercos en sitios de inspección muestra que el corazón es el sitio con mas prevalencia seguido por el músculo masétero, en el caso de la viabilidad de los cisticercos sucede lo contrario, observándose mayor

proporción de cisticercos viables en el músculo masétero y en menor proporción en el corazón. De acuerdo Carvalho *et al* (2006) la condición de cisticercos degenerados predomina sobre los cisticercos viables. A su vez, los cisticercos degenerados se encuentran en mayor proporción en corazón con 53,95%, seguido de cabeza con 45,37%, de canal con 0,36% y el lengua con 0,32%. Moreira *et al* (2002) encontraron porcentajes de cisticercos viables de 61,5%, 27,2%, 2,2% y 6,4% para cabeza, corazón, lengua y canal respectivamente. Sin embargo Souza *et al* (2007) obtuvieron un 66,97% de cisticercos degenerados y el 33,02% de viables, de los cuales el 81% de los casos de cisticercos viables estaban localizados en los músculos de la cabeza y el 17% en el corazón, mientras que los degenerados el 52,11% se ubicaron en los músculos del corazón y el 47,88% cabeza. También Abunna *et al* (2008), reportó 55,9% cisticercos degenerados y 44,2% de viables. Así como también Almeida *et al* (2006) encontraron un 92,17% de cisticercos degenerados y el 6,08% de viables. Por el contrario Kebede (2008), reporta hallazgos de 85% de cisticercos viables y 14,4% de degenerados. Igualmente Wanzala *et al* (2003), demostraron una alta densidad de cisticercos viables y degenerados en diferentes sitios a la disección total.

Por otra parte, varios autores coinciden que los cisticercos viables se confunden con el color rosarajo de la carne y son muy difíciles de identificar a la inspección de la carne y se pasa para el consumo humano. Sin embargo, debido a que los cisticercos viables degeneran rápidamente generalmente forman lesiones blancas y fibróticas, por lo tanto pueden ser más fácilmente identificados (Onyango-Abuje *et al* 1996, Wanzala *et al* 2003, Kebede *et al* 2008, Scandrett *et al* 2009, Pearse *et al* 2010). Según Scandrett *et al* (2009) la reabsorción de cisticercos degenerados en el corazón se produce más lentamente que en otros sitios. Varios investigadores coinciden, que los cisticercos tienden a morir más rápidamente en las zonas de mayor irrigación, por ejemplo en el corazón los cisticercos se calcifican en un lapso de cuatro semanas lo que justifica el predominio de esta condición. Esto es debido a la mayor circulación sanguínea en dirección a estos músculos y una tasa más alta de actividad en estos músculos (lo que explica la mayor circulación) puede dañar a los parásitos, lo que permite el escape de líquidos y quizás trastorna la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune. Por el contrario en otros músculos tienden a permanecer viables durante muchos

meses (Carvalho *et al* 2006, OIE 2009, Ogunremi y Benjamin 2010, Pearse *et al* 2010). Esta situación es atribuible posiblemente al desarrollo del estado inmunitario, que es dependiente de la edad del animal al momento de la infección y re-infección con cisticercos. La reestimulación de la inmunidad de los animales tras la invasión continúa de oncósferas, explicaría el desarrollo de una fuerte inmunidad que no permitió el desarrollo de más cisticercos. Este fenómeno contribuye más a explicar la ocurrencia tanto de cisticercos viables y degenerados y sus correspondientes variaciones en los sitios de predilección examinados (Wanzala *et al* 2003, Lopes *et al* 2011).

Examen estereoscópico.

Un diagnóstico definitivo puede ser realizado fácilmente por un parasitólogo experimentado, ya sea por examen de rutina o utilizando un microscopio estereoscópico, si los cisticercos son viables, o si el metacéstodo se encuentra intacto o parcialmente degenerado son observados fácilmente lo que permite diferenciarlo de otras lesiones. Un diagnóstico de cisticercosis en muestras de tejido proveniente de ganado bovino implica que se trata de *T. saginata*, debido a la especificidad del hospedador intermedio de este parásito. Sin embargo, la degeneración de los cisticercos puede comenzar en un plazo de 20 días posteriores a la infección (Soulsby, 1963) ocasionando que la diferenciación de la lesión resultante de otras lesiones inflamatorias crónicas de diferentes etiologías pueden ser imposibles de confirmar por examen de rutina o estereoscópico, (Schandevyl y Vercruysse, 1982).

Histología.

Los métodos histológicos no son confiables para diferenciar cisticercos degenerados de *T. saginata* de lesiones inflamatorias crónicas de otras diversas etiologías (Schandevyl y Vercruysse, 1982). No se ha establecido ningún criterio estándar para la evaluación histológica de lesiones sugestivas a *C. bovis*. Las muestras son fijadas con formol, laminadas y teñidas, generalmente con hematoxilina y eosina. Otros métodos, incluyendo la técnica de Gomori para fibras reticulares, son necesarias para demostrar

características particulares del parásito de las lesiones en etapas avanzadas de degeneración (Slais, 1970); sin embargo, Geerts *et al.*, (1980) reportó que esta tinción no era mejor que la hematoxilina y eosina en la identificación de 32 cisticercos degenerados recuperados de 25 corazones de bovino. Silverman y Hulland (1961) fueron los primeros en describir en detalle observaciones histológicas en cisticercos de *T. saginata* obtenidos de bovinos infectados natural o experimentalmente con cientos de quistes. Los quistes viables se asociaron con una respuesta inflamatoria mínima del huésped con baja eosinofilia y sin células gigantes, mientras que con los cisticercos degenerados fueron asociados con la formación de tejido de granulación en el espacio del quiste, la presencia de células gigantes alrededor de fragmentos del parásito, la ruptura de la pared del quiste y una invasión de granulocitos, incluyendo eosinófilos típicos de la inflamación crónica. La identificación de algunas lesiones fue complicada por la aparición de degeneración de los quistes en varias etapas de desarrollo. En general, para un quiste maduro, la degeneración fue iniciada por la ruptura de la pared del quiste y la cutícula, seguido de desaparición de las capas subcuticulares, y por la eventual disolución de los restos de los cestodos como lo son las ventosas y el roseto del escolex (Silverman y Hulland, 1961). Puesto que no hay ganchitos presentes en la *T. saginata*, los restos del parásitos más frecuentemente identificados en etapas avanzadas de degeneración son corpúsculos calcáreos (Silverman y Hulland, 1961). Los corpúsculos calcáreos, encontrados en las larvas de los cestodos y ubicados principalmente en la región del cuello y el escolex (Slais, 1970) son microscópicas concreciones minerales de forma elipsoidal originarios del parénquima celular (Rodrigues *et al.*, 1997). Aunque la morfología y la citología de la lesión pueden utilizarse para diferenciarla de otras lesiones similares encontradas, comúnmente causadas por *Actinobacillus sp.*, miositis bacterémica o faciolosis. La demostración de estructuras específicas de cisticercos como lo son: la pared del quiste y material de las larvas del parásito (escolex, ventosas, vesícula, pared del cuerpo, corpúsculos calcáreos) son sumamente necesarias para un diagnóstico definitivo (Silverman y Hulland, 1961; Geerts *et al.*, 1980; Bundza *et al.*, 1986; Bundza *et al.*, 1988; Marty y Chester, 1997).

Inmunohistoquímica.

En un método de inmunotinción ABC (Complejo Avidina-Biotina), desarrollado para la fijación en formalina de cisticercos de *T. saginata* (Ogunremi et al., 2004a, b) se empleó un anticuerpo monoclonal IgG1 (158C11A10) contra una proteína de excreción/secreción (ES) de cisticercos de *T. saginata* (Brandt et al., 1992) desarrollado por Draelants et al (1995). El material para la prueba provino de cisticercos viables y degenerados de ganado infectado experimentalmente y sacrificado desde los 62 hasta los 376 días posteriores a la inoculación. La evaluación preliminar demostró que este ensayo tuvo una sensibilidad del 100% en la identificación de 87 quistes viables y 115 degenerados y una especificidad de 100% de un total de 46 muestras negativas, compuestas por *Sarcocystis* (n = 5), *Actinobacillus* (n = 5) y una variedad de tejidos bovinos normales como: ganglios linfáticos, tejido adiposo y músculo esquelético y cardíaco provenientes de animales infectados experimentalmente y de animales sanos. En quistes viables, la cutícula, la vesícula del parénquima, las ventosas y el epitelio rostral se tiñeron considerablemente; mientras que en la mayoría de los quistes degenerados donde dichas estructuras parasitarias eran poco o imposibles de reconocer, la reacción de tinción fue confinada a un área en el centro de la lesión (Ogunremi et al., 2004a). Los anticuerpos monoclonales generados contra el antígeno de ES de Cisticercos de *T. saginata* muestran una reacción cruzada contra sueros con antígenos de *T. solium*, *T. ovis* y *Echinococcus granulosus* (Brandt et al., 1992). Pero debido a que *T. ovis* y *T. solium* no se encuentran y *E. granulosus* solo se encuentra raramente en bovinos (Geerts et al., 1980), esta reactividad cruzada no es de importancia diagnóstica.

Aunque el Mab IgG1 todavía no ha sido evaluado en pruebas IHC para la identificación de éstos, o otros contenidos, se ha demostrado tener un 98.7% de especificidad cuando se utiliza un ELISA serológico para probar ganado infectado con una variedad de helmintos y hemoparásitos comunes (Van Kerckhoven et al., 1998).

ELISA basada en la detección de anticuerpos.

La detección de anticuerpos por medio de ELISA indirecto (Ab-ELISA) para el diagnóstico de la cisticercosis por *T. saginata* consiste en la detección de anticuerpos específicos en suero de bovinos infectados a partir de las tres semanas post-infección (Kamanga-Solloet *et al.*, 1987). La eficacia de este ensayo depende de la calidad del antígeno de diagnóstico empleado. Generalmente los antígenos diagnósticos empleados provienen de homogenizados crudos de cisticercos de *T. saginata* o del líquido del quiste y/o homogenizados crudos de parásitos relacionados como lo son *T. hydatigena*, *T. crassiceps* y *T. solium* (Craig y Rickard, 1980; Geerts *et al.*, 1981; Kamanga-Sollo *et al.*, 1987; Monteiro *et al.*, 2006). Estos antígenos crudos contienen isótopos específicos de especies y dan reacciones cruzadas con suero de bovinos infectados por helmintos heterólogos, como lo son la *Fasciola hepática* y *T. hydatigena* (Craig y Rickard, 1980). Debido a que los metacéstodos de *T. hydatigena* no se encuentra comúnmente en el ganado, la reacción cruzada puede no presentar un gran inconveniente en la práctica (Geerts *et al.*, 1981). Ab-ELISA usando antígenos salinos extraídos de diferentes estructuras de *T. solium* y *T. crassiceps* a demostrado un elevado número de reacciones falso negativas con los sueros de animales naturalmente infectados debido a las bajas infecciones que estos presentan originando con esto una respuesta inmunológica con muy baja producción de anticuerpos debido a esto dichos ensayos son deficientes para diagnosticar animales ligeramente infectados (Monteiro *et al.*, 2006). Por ejemplo, en un ELISA donde se emplearon antígenos hidrosolubles de *T. crassiceps* demostró una sensibilidad y especificidad de 37,5% (n = 24) y 95.7% (n = 69), respectivamente (Geerts *et al.*, 1981). El ELISA usando un antígeno recombinante de una proteína de adhesión de la oncosfera de *T. saginata* (Hp6-Tsag) mostró una sensibilidad de 100% y una especificidad de 93.2% en suero de ganado infectado experimentalmente (Ferrer *et al.*, 2007).

ELISA basada en la detección de antígenos.

El nivel de titulación de anticuerpos no corresponde con la carga de cisticercos vivos en animales naturalmente infectados (Onyango-Abuje *et al.*, 1996). En ganado sacrificado en un rastro dicho ensayo demostró ser tres veces más sensible que la inspección de canales. Además, el ensayo detecta cisticercos vivos los cuales son más difíciles de encontrarse por medio de la inspección organoléptica, ya que los cisticercos viables presentan un color rojizo que se confunde con el color de la carne (Onyango-Abuje *et al.*, 1996; Wanzala *et al.*, 2003). Dos sistemas de ELISA basados en el empleo de anticuerpos monoclonales (MoAb), el HP10 y (158C11 y 60H8), se desarrollaron para la detección de cisticercosis por *T. saginata* (Harrison *et al.*, 1989; Brandt *et al.*, 1992; Van Kerckhoven *et al.*, 1998). Ambos ensayos reconocen los antígenos glicoproteicos circulantes secretados por los metacestodos viables a partir de las cuatro semanas posteriores a la infección (Harrison *et al.*, 1989; Onyango-Abuje *et al.*, 1996). Un anticuerpo monoclonal de ratón IgM codificado HP10, desarrollado contra glicoproteínas de superficie de un extracto enriquecido de cisticercos de *T. saginata*, fue utilizado para el desarrollo de un ELISA diagnóstico para detectar dichas glicoproteínas en el suero de ganado infectado con *T. saginata*. El ensayo mostró mejores resultados cuando se emplearon los anticuerpos monoclonales homólogos HP10. Con la excepción de una útil reacción cruzada con *T. solium*, el ensayo mostró especificidad aceptable. Sin embargo, sólo se diagnosticó constantemente ganado infectado con más de 200 cisticercos vivos de 8 a 16 semanas de edad (Harrison *et al.*, 1989). En otro estudio llevado a cabo en Kenya el ensayo detectó 75% (n = 20) de ganado infectado naturalmente con uno o más cisticercos vivos en la disección de las canales. Todos los animales con cinco o más cisticercos fueron positivos en el ELISA directo (Wanzala *et al.*, 2007). En otro estudio se encontró una sensibilidad del 83% (n = 6) para animales con ≥ 30 cisticercos vivos, la cual se desplomó a 22% (n = 23) para animales con 1 a 29 cisticercos vivos (Onyango-Abuje *et al.*, 1996). En otro sistema ELISA directo donde se empleo un anticuerpo monoclonal desarrollado por Brandt *et al* (1992) y modificado por Van Kerckhoven *et al* (1998) y Dorny *et al* (2000). Dos MoAbs (158C11 y 60H8) del isotipo IgG1 se produjeron contra los productos de secreción y excreción (ES) de

cisticercos de *T. saginata*. El ensayo mostró una sensibilidad de 92% y una especificidad de 98,7% en sueros tratados con calor procedentes de bovinos infectados con más de 50 quistes viables. Sólo se detectaron el 12,8% (n=47) de animales infectados con menos de 50 quistes viables (Van Kerckhoven *et al.*, 1998). La baja sensibilidad de ambos sistemas de ELISA directo indicó que los ensayos fallaron en la detección de animales con bajas infecciones, lo cual es una condición muy común (Brandt *et al.*, 1992).

Inmunoelctrotransferencia (EITB)

Hay escasa información sobre el uso de la inmunoelctrotransferencia (EITB) para diagnóstico de cisticercosis de *T. saginata*. Se evaluó una fracción hidrofóbica de 10 a 18 kDa, de un aislado del líquido del metacéstodo de *T. hydatigena*, recolectados de cabras infectadas naturalmente, en un inmunoensayo en el cual se detectó la infección por *T. saginata* en 14 de 21 terneros, respectivamente (Bogh *et al.*, 1995).

Inmunoensayo (Dipstick)

Aunque este tipo de inmunoensayo son más fáciles de usar que los tradicionales ELISA directo y el EITB, existen limitadas investigaciones del desarrollo y estandarización de dicho ensayo. Hayunga *et al* (1991) desarrolló un dipstick para el diagnóstico de cisticercosis por *T. saginata* y *T. solium* usando fracciones de sulfato de amonio soluble de *T. hydatigena* antígeno fluido quiste (ThFAS) adsorbido sobre varillas de membrana Immobilon P. El análisis detectó ganado cysticercotic 6 de 7 (85.7%) tres semanas después de la infección experimental (Hayunga *et al.*, 1991).

ELISA de punto.

Aunque se ha progresado considerablemente en el desarrollo de inmunoensayos de punto para el diagnóstico de cisticercosis por *T. saginata*, las técnicas aun no han sido estandarizadas (Jiang *et al.*, 1990; Draelants *et al.*, 1995; Biswas *et al.*, 2004; Agudelo

et al., 2005). Draelants *et al.*(1995) desarrolló un ELISA de punto para la detección de antígeno usando MoAbs (2H8 y 12G5) de isotipo IgM y membrana de nitrocelulosa según lo descrito por Brandt *et al.* (1992). El ensayo dio 87.5% y 93.5% de sensibilidad y especificidad, respectivamente en ganado con más de 100 cisticercos viables.

Técnicas moleculares.

Se han desarrollados protocolos para PCR multiple para la diferenciación molecular del ADN genómico (gDNA) y del rADN *T. saginata*, *T. solium*, *T. saginata asiática* y *Echinococcus granulosus* y se han aplicado en la identificación de cisticercos de *T. saginata* y *T. solium* (González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso por otros investigadores algunos iniciadores (primers) (Abuseir *et al.*, 2006), o de diferentes ensayos de PCR (Van der Logt Gottstein, 2000; Geysen *et al.*, 2007) han dado resultados poco confiables en cisticercos bovinos viables y degenerados de bovinos infectados naturalmente. Aunque la mayoría de los métodos actuales se han aplicado en muestras frescas o congeladas, presumiblemente también se podrían adaptar para tejidos fijados con formol; sin embargo, la fijación puede ocasionar una mayor degradación del ADN (Mygind *et al.*, 2001). Lo que ocasiona que aunque se ha demostrado que ensayo de PCR es más sensible que la Inmunohistoquímica para el diagnóstico de diversos patógenos (Brunnert *et al.*, 1994; Bazler *et al.*, 1999; Held *et al.*, 2000; Tegmeier *et al.*, 2000). En el caso de cisticercosis bovina los resultados que son arrojados como falsos negativos en muestras con quistes degenerados de *T.saginata* fijados en formalina podrían ser debido a la insuficiente cantidad ADN en la muestra (Van der Logt y Gottstein, 2000; Geysen *et al.*, 2007).

Desarrollo de tecnología para el diagnóstico de cisticercosis bovina.

Como resultado de cuatro años de investigación para mejorar los parámetros de detección y diagnóstico de cisticercosis en el ganado que se engorda en la región, en este trabajo se diseñó, desarrolló e instrumentó un sistema de expresión en baculovirus

que produce en forma recombinante la proteína de adhesión de *Cisticercos bovis* denominada Tsag18 en cultivo de 28 células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). La proteína Tsag18 pertenece al grupo de genes de adhesión de las Taenias (TAF III), juegan un papel esencial en la invasión de tejidos y el desarrollo de la respuesta inmunológica contra el parásito. Diversos estudios han demostrado que Tsag18 es una proteína expresada en la superficie de las oncosferas que presenta estructura y función de una molécula de adhesión; convirtiéndola en una proteína necesaria para el acoplamiento de las oncosferas con las vellosidades del intestino de los bovinos, para posteriormente migrar por la circulación sanguínea a los tejidos y dar lugar al desarrollo de los cisticercos. La proteína Tsag18 es altamente antigénica y es capaz de producir potentes respuestas humorales, donde los anticuerpos proporcionan un mecanismo de protección al neutralizar la función de adhesión, necesaria para la invasión y migración hacia los tejidos. También se ha comprobado que la respuesta de anticuerpos genera una excelente memoria inmunológica y es capaz de proteger contra subsecuentes infecciones del parásito (Parkhouse et al., 2008). En este proyecto, se pretende resolver la limitante de utilizar antígenos obtenidos a partir de parásitos frescos (cisticercos) en las pruebas serológicas, utilizando la proteína recombinante rTsag18 desarrollada por nuestro equipo, como antígeno de fase sólida en un sistema ELISA para detección de anticuerpos en muestras de suero (ELISA-rTsag18). La proteína recombinante rTsag18 se diseñó y sintetizó a partir de un plásmido que contiene el gen de la proteína de adhesión de *Cisticercos bovis* Tsag18, de acuerdo con la secuencia publicada por los National Centers for Biotechnology Information (NCBI) bajo la referencia GenBank: HQ318711.1. El gen Tsag18 fue sintetizado y subclonado en el vector de Baculovirus pFastBac (Life Technologies) para producir el plásmido pFastBacTsag18. El plásmido pFastBacTsag18 fue amplificado y transcrito en cultivo celular de Sf9 (Life Technologies) para obtener la primera generación de baculovirus (P1) que expresa Tsag18 recombinante en esa línea celular. En forma paralela, se adaptó la línea celular Sf9 para crecimiento en monocapa empleando medio de cultivo sin proteínas adicionado con suero fetal bovino. Actualmente se cuenta con un lote de 120 viales de la línea celular Sf9 29 congelados en medio de crio-conservación para desarrollar cultivos de Sf9 que serían utilizados para producir proteína recombinante rTsag18.

También se cuenta con un lote de 200 ml de virus con título superior a 2.5×10^8 virus por mililitro para su resguardo y utilización para producción de futuros lotes de proteína recombinante rTsag18.

Caracterización de la proteína recombinante rTsag18

La proteína rTsag 18 fue caracterizada parcialmente por SDS-PAGE empleando azul de Coomassie y comparada con extractos crudos de *C. bovis* obtenidos de canales confiscadas en un Rastro TIF local por infestación con el parásito. El resultado fue un patrón de al menos siete bandas de proteína con masas moleculares entre los 15 y 52 KDa, los cuales coinciden con el patrón de peso molecular teórico de dicha proteína. También se evaluó la antigenicidad de rTsag18 por western blot empleando un suero controle positivos de referencia provenientes de un bovino infectado experimentalmente con oncosferas de *Taenia saginata*. El suero control positivo fue amablemente proporcionado por la Dra. Edda Sciutto Conde, Jefa del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (IIBUNAM). Los resultados del western blot confirmaron la reactividad inmunológica de la proteína recombinante con anticuerpos producidos contra la proteína nativa del parásito.

CONCLUSIONES

Actualmente, existe una amplia disponibilidad de tecnología en materia de diagnóstico serológico para detectar antígenos o anticuerpos de teniasis o cisticercosis en muestras biológicas de pacientes humanos, sin embargo; esas plataformas de diagnóstico no han sido adaptadas para la detección y diagnóstico de esta parasitosis en el ganado. En este trabajo, se ha logrado desarrollar un sistema de expresión de la proteína recombinante rTsag18 y comprobar su inmunogenicidad para ser utilizada como plataforma para detectar anticuerpos producidos contra las oncosferas de *Taenia saginata*, cuyo producto terminal es un sistema de escrutinio serológico capaz de detectar la presencia de *Cisticercos bovis* en etapas tempranas de infección, cuando el ganado se encuentra en pradera o corral, mucho antes que los animales sean

finalizados y enviados al rastro, permitiendo la implementación de estrategias sanitarias o de tratamiento antiparasitario más adecuadas para cada caso, así como la oportunidad para decidir, antes del sacrificio de los animales, el destino industrial y comercial más pertinente de aquellos casos sugestivos o positivos a cisticercosis. El antígeno rTsag18 permitirá mejorar los niveles de detección de animales infectados con cisticercos, reflejándose en una mayor calidad e inocuidad de la carne que se produce en la región y que consume la población en general, además proteger la continuidad de los mercados internacionales contra un posible embargo sanitario a la carne producida en Baja California por presencia de cisticercos, de en beneficio de la economía del sector ganadero regional y del país.

LITERATURA CITADA

Abunna F, Tilahun G, Megersa B, Regassa A, Kumsa B. Bovine cysticercosis in cattle slaughtered at Awassa municipal abattoir, Ethiopia: prevalence, cyst viability, distribution and its public health implication. *Zoonoses Public Health*. 2008; 55:82-88.

Abuseir,S., Epe,C., Schnieder,T., Klein,G. & Kuhne,M. 2006. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: Is it unequivocal? *Parasitology Research* 99: 405-409.

Abuseir S, Kühne M, Schnieder T, Klein G, Epe C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. *Parasitol Res*. 2007;101:131–137.

Allan JC, Ávila G, García-Noval J, Flisser A, Craig PS.). Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 1990;101:473-7.

Allepuz A, Napp S, Picado A, Alba A, Panades J, Domingo M, et al. Descriptive and spatial epidemiology of bovine cisticercosis in North- Eastern Spain (Catalonia). *Vet Parasitol*. 2009;159:43-48.

Almeida DO, Igreja HG, Alves FM, Santos IF, Tortelly R. Cisticercose bovina em matadourofrigorífico sob inspeção sanitária no município de Teixeira de Freitas-BA: Prevalência da enfermidade e análise anatomopatológica de diagnósticos sugestivos de cisticercose. *R Bras Ci Vet*. 2006;13:178-182.

Aluja S. A. y A. N. M. Villalobos. 2000. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. *Vet. Mex*. 31(3):239-244.

Barriga O. Las enfermedades parasitarias de los Animales Domésticos en la América Latina.Geminal. Santiago. Chile. 2002; p 164-166.

Baszler, T.V., Gay, L.J., Long, M.T., Mathison, B.A. 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 4059-4064.

Boone I, Thys E, Marcotty T, De Borchgrave J, Ducheyne E, Dorny P. Distribution and risk factors of bovine cysticercosis in Belgian dairy and mixed herds. *Prev Vet Med*. 2007;82:1-11.

Brandt, J.R., Geerts, S., De Deken, R., Kumar, V., Ceulemans, F., Brijs, L. & Falla, N. 1992. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *International Journal of Parasitology* 22: 471-477.

Brunnert, S.R., Dai, Y., Kohn, D.F. 1994. Comparison of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for the detection of *Mycoplasma pulmonis* in paraffin-embedded tissue. *Laboratory Animal Science* 44, 257-260.

Bundza, A., Finley, G.G., K.L. Easton. 1988. An outbreak of cysticercosis in feedlot cattle. *Canadian Veterinary Journal* 29, 993-996.

Cabaret J, Geerts S, Madeline M, Bellandonne C, Barbier D. The use of urban sludge on pastures: the cysticercosis threat. *Vet Res.* 2002;33:575–597.

Carvalho LT, Falcão RR, Dos Santos IF, Teixeira AL. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos em matadouro-frigorífico sob inspeção federal em Minas Gerais. *Measles prevalence in cattle slaughtered under sanitary inspection in Minas Gerais.* R Bras Ci Vet. 2006;13:109-112.

Cordero del Campillo M, Rojo V, Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete J, Díez P, et al. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España: Interamericana-McGraw-Hill; 1999. P 350-355.

De la Fe Rodríguez P, Brito E, Rodríguez L, Quiñones MC. Consideraciones sobre el ciclo de *Taenia saginata* en humanos y bovinos de la provincia de Villa Clara. *REDVET.* 2006;7: (4).

Díaz-Camacho, S., A. Candil, V. Suate, M. L. Zazueta, M. Felix-Medina, R. Lozano y K. Willms (1991), "Epidemiological study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45(4):522-531.

Dorny P, Praet N. *Taenia saginata* in Europe. *Vet Parasitol.* 2007;149:22–24.

Draelants, E., Brandt, J.R., Kumar, V. & Geerts, S. 1995a. Characterization of epitopes on excretory-secretory antigens of *Taenia saginata* metacestodes recognized by monoclonal antibodies with immunodiagnostic potential. *Parasite Immunology* 17: 119-126.

Eichenberger RM, Stephan R, Deplazes P. Increased sensitivity for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis infection by additional heart examination compared to the EU-approved routine meat. *Food Control*. 2011;22:989-992.

Falavigna A, Silva K, Araújo SM, Tobias ML, Falavigna DL. Cysticercosis in animals of Sabáudia, Paraná State. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58:950-951.

García H. H., Evans C. A. W., E. N. Theodore, O. M. Takayanagui, A. C. White, D. Botero, V. Rajshekhar, V. C. W. Tsang, P. M. Schantz, J. C. Allan, A. Flisser, D. Correa, E. Sarti, J. S. Friedland, S. M. Martinez, A. E. Gonzalez, R. H. Gilman and O. H. Del Brutto. 2002. Current consensus guidelines for treatment of Neurocysticercosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4):747-756.

García H.H., Parkhouse R.M., Gilman R.H., Montenegro T., Bernal T., Martinez S.M., et al. (2000). Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 94: 673-676.

Garza-Rodríguez A., P. Maravilla, F. Mendlovic, P. Mata-Miranda, L. Robert and A. Flisser. 2007. Lack of postmortem digestion of tapeworms in golden hamsters experimentally infected with *Taenia solium*. *Veterinary Parasitology*. 145 (2007):172-175.

Geerts, S., Kumar, V., Van den Abbeele, O. 1980. *Taenia saginata* cysticercosis in slaughter cattle in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 49, 365-374.

Geysen,D., Kanobana,K., Victor,B., Rodriguez-Hidalgo,R., De Borchgrave,J., Brandt,J. & Dorny,P. 2007. Validation of meat inspection results for *Taenia saginata* cysticercosis by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection* 70: 236-240.

Giuseppe M, Voghera M, Serra G. Epidemiological Survey on bovine cisticercosis in pinerolo district, northwest Italy. In: Board (ed). *Summaries XXVI World Buiatrics Congress*. Santiago. Chile: 2010. p 267.

Gracey J, Collins DS, Huey R. Diseases caused by helminth and arthropod parasites. In: *Meat hygiene*. 10th ed. Saunders, Philadelphia. 1999. p 243–259, 635–699.

Grove, D.I. 1990. *Taenia saginata* and Taeniasis saginata In: *A History of Helminthology*, C-A-B International, Wallingford Oxon, UK. 848 pp.

Hayunga, E.G., Wong, M.M., Sumner, M.P., Isenstein, R.S. 1991. Evaluation of a 'dipstick' immunoassay to detect cysticercosis in experimentally infected cattle. *Veterinary Parasitology* 38, 13-22.

Held, T.K., Kruger, D., Switala, A.R., Beyer, J., Kingreen, D., Busemann, C., Janitschke, K., Jahed KR, Raei M, Kia EB, Mmotevalli AH, Selseleh M. Prevalence of bovine cysticercosis in slaughtered cattle in Iran. *Trop Anim Health*. 2010;42:141-143.

Husain N., N. Shukla, R. Kumar, M. Husain, A. Chaturvedi, G. G. Agarwal and R. K. Gupta. 2008. ELISA in the evaluation of therapeutic response to albendazole in neurocysticercosis. *J.Infect*. 56(1):65-73.

Kebede N. Cysticercosis of slaughtered cattle in northwestern Ethiopia. *Res Vet Sci*. 2008;85:522-526.

Kebede N, Tilahun G, Hailu A. Current status of bovine cysticercosis of slaughtered cattle in Addis Ababa Abattoir, Ethiopia. *Trop Anim Health*. 2009;41:291-294.

Kyvsgaard NC, Ilsoe B, Henriksen SA, Nansen P. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. *Res Vet Sci*. 1990;49:29–33.

Lee W. A. y Engels D. 2006. Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Taeniosis. *Advances in Parasitology*. 61(2006):509-566.

Lopes W, Santos TR, Soares VE, Nunes JL, Mendonça RP, Lima RC, et al. Preferential infection sites of *cysticercus bovis* in cattle experimentally infected with *Taenia saginata* eggs. *Res Vet Sci*. 2011; 90:84-88.

Machnicka B, Dziemian E, Zwierz C. Detection of *Taenia saginata* antigens in faeces by ELISA. *Appl Parasitol* 1996;37:106-10.

Maeda GE, Kyvsgaard NC, Nansen P, Bogh HO. Distribution of *Taenia saginata* cysts by muscle group in naturally infected cattle in Tanzania. *Prev Vet Med*. 1996;28:81–89.

Manhoso F. Prevalência de cisticercose bovina em animais abatidos no município de Tupã, SP. *Higiene Alimentar*. 1996;10:44-47.

Marty, A.M., Chester, A.J. 1997. Distinguishing lipid pseudomembranes from larval cestodes by morphologic and histochemical means. *Archives of Pathological Laboratory Medicine* 121, 900- 907.

Meza-Lucas A. y F. R. Aguilar. 2002. Teniasis humana por *Taenia solium*. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 49(2): 92-99.

Minozzo, J.C., Gusso, R.L.F., Castro, E.A., Lago, O. & Soccol, V.T. 2002. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45: 451-455.

Minozzo J.C., V.S. Thomaz, C.O. Chaves, V. E Soares and J.D. Alvimar (2004) Teste Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para diagnostic da cisticercose bovina e estudo da cinetica de producao de anticorpos contra- *Cysticercus bovis* *CIENCIA RURAL* 34(003):857-864.

Monteiro, L.L., Pinto, P.S. & Dias, F.S. 2006. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. *Veterinary Parasitology* 141: 260-263.

Montenegro TC, Miranda EA, Gilman R. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. *Ann Trop Med Parasitol* 1996;90:145-55.

Moreira M, Reis DO, Almeida LA, Santos WL. Zoonoses reemergentes: a cisticercose bovina em matadouros de Uberlândia, MG. *Higiene Alimentar*. 2001;15:16-19.

Moreira M, Almeida LP, Reis DO, Santos WL. Cisticercose bovina: um estudo com bovinos abatidos em matadouro municipal de Uberlândia, MG. *Higiene Alimentar*. 2002;16:37-41.

Murrell KD. 2005. Epidemiology of taeniosis and cysticercosis. In: Murrell, KD. (ed.), WHO/FAO/OIE Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis. World Health Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France. 2002; p 27–43.

Mygind, T., Birkelund, S., Falk, E., Christiansen, G. 2001. Evaluation of real-time quantitative PCR for identification and quantification of *Chlamydia pneumoniae* by comparison with immunohistochemistry. *Journal of Microbiological Methods* 46, 241-251.

Ogunremi O, Benjamin J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2010;169:93-101.

Ogunremi, O., MacDonald, G., Geerts, S. & Brandt, J. 2004a. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis by immunohistochemical test on formalin-fixed and paraffin-embedded bovine 99 lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 438-441.

Ogunremi, O., MacDonald, G., Scandrett, B., Geerts, S., Brandt, J. 2004b. Bovine cysticercosis: preliminary observations on the immunohistochemical detection of *Taenia saginata* antigens in lymph nodes of an experimentally infected calf. *Canadian Veterinary Journal* 45, 852-855.

OIE, Office Internationale des Epizooties. Chapter 2.4.4, Bovine Cysticercosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, fifth edition, Paris, France. 2009; p 1216-1226.

Onyango-Abuje JA, Hughes G, Opicha M, Niginyi KM, Rugutt MK, Wrightand SH, et al. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenian cattle by antibody and antigen ELISA. *Vet Parasitol.* 1996;61:221–230.

Opara MN, Ukpong UM, Okoli IC, Anosike JC. Cisticercosis of slaughtered cattle in southeastern Nigeria. *Ann NY Acad Sci* 2006;1081:339–346.

OPS/OMS, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Cisticercosis (CIE-10 B69). En: Acha PN, B Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Vol 3. 3a ed. OPS/OMS, Washington, Estados Unidos. 2003; p.171-181.

Parkhouse, R. M., Bonay, P., Gonzalez, L., Ferrer, E., Garate, T., Aguilar, C., Cortez A, M., and Harrison, L. S. (2008). TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitology Research* 102(5), 921-926.

Pearse B, Traub RJ, Davis A, Cobbold R, Vanderlinde PB. Prevalence of *Cysticercus bovis* in Australian cattle. *Aust Vet J.* 2010;88:260-262.

Peña ML. Prevalencia de *Cysticercus bovis* en bovinos sacrificados en el matadero municipal “Pampa de la Isla” de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra en los

meses de octubre, noviembre y diciembre 1991. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Santa Cruz, Bolivia. 1991.

Phiri,A.M. 2006. Common conditions leading to cattle carcass and offal condemnations at 3 abattoirs in the Western Province of Zambia and their zoonotic implications to consumers. *Journal of South African Veterinary Association* 77: 28-32.

Quiroz H. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Limusa SA, México DF. 2002; p.336-353.

Regassa A, Abunna F, Mulugeta A, Megeria B. Major metacestodes in cattle slaughtered at Wolaita Soddo Municipal abattoir, Southern Ethiopia: Prevalence, cyst viability, organ distribution and socioeconomic implications. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41:1495-1502.

Riley T. and A. C. White. 2003. Management of neurocysticercosis. *CNS. Drugs.* 17(8):577-591.

Roco M. Beneficio y hallazgos patológicos en plantas faenadoras nacionales, 2007-2008. *Bol Vet Ofic. Chile.* 2009;10:1-23.

Roco M. Beneficio y hallazgos patológicos en plantas faenadoras nacionales, 2009. *Bol Vet Ofic. Chile.* 2010;11:1-15.

Rodríguez-Canul. R., J. C. Allan, C. Fletes, I. P. Sutisna, I. N. Kapti and P. S. Craig. 1997. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* Cysticercosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 4(5):579-582.

Rodrigues, J.J.S., Ferreira, H.B., Farias, S.E., Zaha, A. 1997. A protein with a novel calciumbinding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 451-456.

Rodríguez-Hidalgo R, Benítez-Ortiz W, Dorny P, Geerts S, Geysen D, Ron RJ, et al. Taenioscysticercosis in man and animals in the Sierra of Northern Ecuador. *Vet Parasitol.* 2003;118:51-60.

Rodriguez-Hidalgo,R., Benitez-Ortiz,W., Praet,N., Saa,L.R., Vercruyssen,J., Brandt,J. & Dorny,P. 2006. Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 779-782.

Santos R, Santos IF, Bonisson JC. Estudo comparativo entre a técnica post mortem de Santos e a do Serviço de Inspeção Estadual para a detecção do *Cysticercus bovis* em matadouros no estado do Rio de Janeiro, Brasil. R Bras Ci Vet. 2003;10:175-181.

Scandrett B, Parker S, Forbes L, Gajadhar A, Dekumyoy P, Waikagul J, et al. Distribution of *Taenia saginata* cysticerci in tissues of experimentally infected cattle. Vet Parasitol. 2009;164:223-231.

Schandevyl, P., Vercruyse, J. 1982. Cysticercosis in cattle in Senegal. Veterinary Parasitology 11, 267-270.

Silverman, P.H., Hlland, T.J. 1961. Histological observations on bovine cysticercosis. Research in Veterinary Science 2, 248-252.

Slais, J. 1970. The morphology and pathogenicity of the bladder worms: *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Czechoslovak Academy of Sciences, Junk Publishers, The Hague, 144 pp.

Soulsby, E.J.L. 1982. Cestodes. In: Soulsby, E.J.L. (Ed.), Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals, 7th Edition, Bailliere Tindall, London, pp. 87-136.

Soulsby E. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª ed. Interamericana, México DF. 1987; p 106-112.

Souza V, Pessôa-Silva MD, Kowalczyk M, Marty S, Thomaz-Soccol V. Anatomic regions of major occurrence of *Cysticercus bovis* in bovines under federal inspection at slaughterhouse in the municipality of São José dos Pinhais, State of Paraná from July to December, 2000. R Bras Parasitol Vet. 2007;16:92-96.

Suárez H, Santizo RM. Epidemiology of the *Taenia saginata* complex and *C. bovis* in Ciego de Avila, province of Cuba. Rev Patolog Trop. 2005;34:43-52.

Tegtmeier, C., Angen, O., Ahrens, P. 2000. Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. Veterinary Microbiology 76, 385-394.

Urquhart G, Armour J, Duncan J, Duna A, Jennings F. Parasitología veterinaria. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, España. 2001; p 139-141.

Van der Logt, P.B., Gottstein, B. 2000. Unidentified parasite cysts in cattle. Veterinary Record 146, 610-612.

Van Kerckhoven, I., Vansteenkiste, W., Claes, M., Geerts, S., Brandt, J. 1998. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Veterinary Parasitology* 76, 269-274.

Walther, M. & Koske, J.K. 1980. *Taenia saginata* cysticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in calves. *Veterinary Record*. 106: 401-402.

Wanzala W, Onyango-Abuje JA, Kang EK, Zessin KH, Kyule NM, Baumann MPO, et al. Control of *Taenia saginata* by *post mortem* examination of carcasses. *Afr Health Sci*. 2003;3:68–76.

**“EVALUATION OF A BACULOVIRUS RECOMBINANT 18 KDA PROTEIN OF
TAENIA SAGINATA AS A POTENTIAL SOURCE OF ANTIGEN FOR THE
ANTEMORTEM DETECTION OF ANTIBODIES TO CYSTICERCUS BOVIS IN
FEEDLOT CATTLE.”**

Monge Navarro F^a., Cueto González S^a., Rodríguez Gardea A^a., Trasviña Muñoz E^a.,
Rodríguez Castillo J^a., Hernández Gómez E^a., López Valencia G^a., y Bermúdez
Hurtado R^a.

^a Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja
California, Baja California, México.

Resumen

Evaluation of a baculovirus recombinant 18 KDa protein of *Taenia saginata* as a potential source 1 of antigen for the antemortem detection of antibodies to *Cysticercus bovis* in feedlot cattle.

Sergio Arturo Cueto González (1), Abelardo Rodríguez Gardea (1), Enrique Trasviña Muñoz (1), José Luis Rodríguez Castillo (1), Erika Selene Hernández Robles (1), Gilberto López Valencia (1), Rosa María Bermúdez Hurtado (1), Francisco Javier Monge Navarro (1)*

Cuerpo Académico en Diagnóstico de Enfermedades, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Km 3.5 Carretera a San Felipe, Mexicali, Baja California, México, C.P. 21386

*Corresponding author: Cuerpo Académico en Diagnóstico de Enfermedades, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California California, Km 3.5 Carretera a San Felipe, Mexicali, Baja California, México, C.P. 21386.

Telephone: +52 686 563 6907

E-mail address: fmonge@uabc.edu.mx

Abstract

The aim of the study was to evaluate the immunogenicity of a recombinant 18 KDa protein (rTsag18) of *Taenia saginata* (*T. saginata*) to be use as the basis of serological methodologies for the diagnosis of bovine cysticercosis in feedlot cattle before they are sent to slaughter. The rTsag18 protein contain a His tag at the C terminus and was produced in a baculovirus expression system in Sf9 insect cell cultures. The rTsag18 was compared with protein extracts of *Cysticercus bovis* (*C. bovis*) obtained from condemned bovine carcasses. Coomassie blue stained SDS25

PAGE of rTsag18 cleared lysates showed a pattern of at least seven protein bands with molecular masses of 15 KDa, 21 KDa, 32 KDa, 34 KDa, 38 KDa, 46KDa and 52 KDa present in both the rTsag18 and protein extracts from *C. bovis*. Immunogenicity of rTsag18 was evaluated by western blot using a positive reference control sera

developed in an experimentally infected animal, revealing several recombinant protein fractions at molecular masses similar to those obtained in the Coomassie blue stained gels. The rTsa18 protein antigen developed here is a potentially source of antigen to be use as the basis of serological methodologies for the antemortem diagnosis of bovine cysticercosis in feedlot cattle before they are sent to slaughter, giving the opportunity for the application of treatments and sanitary measurements to avoid carcass condemnation and economic losses to the livestock industry.

Keywords: *Taenia saginata*, bovine cysticercosis; recombinant proteins, antemortem serological diagnosis, feedlot cattle.

Introduction

The taeniid cestode *Taenia saginata* (*T. saginata*), is the etiological agent of bovine cysticercosis. Adult stages of *T. saginata* inhabit the small intestine of their host with low pathological significance, whereas larval stages develop in tissues of intermediate hosts causing morbidity in humans and economic losses to farmers and the livestock industry (Lightowlers et al., 2003). Visual inspection of carcasses remains the most common method for the detection of bovine cysticercosis, however; efforts to estimate the failure rate of detection during meat inspection show that over 85% of infected animals may be missed during routine meat inspection (Kyvsgaard et al., 1990). The limitations of the current meat inspection imply significant challenges for sanitary authorities responsible of preventing zoonotic transmission of the parasite (Ogunremi and Benjamin, 2010). *T. saginata* oncospheres components play an essential role in cell adhesion, tissue invasion and in the establishment of protective immune responses (Gonzalez et al., 2007). The oncospheres adhesion proteins of *T. saginata* might allow the use of the 18 KDa oncosphere antigen to develop a serological platform to detect in a single test, livestock harboring larval stages of *T. saginata* at any moment during the animal feeding process, long before livestock are sent to slaughter, reducing the possibility of human infection and the economic loss due condemnation of infected carcasses. The diagnostic utility of the *T. saginata* 18 KDa oncosphere antigens has already been demonstrated its capacity to stimulates excellent protective immunity and can be effectively monitored by serological assays (Harrison et al., 2005). The detection of antibodies to the 18 KDa oncosphere antigens in cattle may be useful to indicate exposure to infection with the parasite and an excellent target for a diagnostic tool (Abuseir et al., 2007). Thus, an antibody detection platform allowing the premortem identification of animals naturally infected with taeniid cestodes could be used to monitor the infection status of livestock and became a reliable alternative to the low sensitivity postmortem inspection of cattle at slaughter. The objective of this work is to evaluate the possible diagnostic utility of the 18 KDa oncosphere antigens

of *T. saginata* expressed in a baculovirus system in sera from experimentally infected cattle to develop a serological platform for the antemortem diagnosis of bovine cysticercosis.

Materials and Methods

T. saginata 18 KDa oncosphere antigen The *T. saginata* isolate 8 oncosphere antigen gene sequence (GenBank HQ318711.1) was sub cloned into the baculovirus vector pFastBac1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) including an eight histidine tag at the C terminus of the protein. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cell line was used to generate a P1 recombinant baculovirus stock expressing the 18 KDa oncosphere adhesion proteins. Sub cloning of *T. saginata* isolate 8 oncosphere antigen gene and generation of P1 recombinant baculovirus stock was performed at Blue Sky Bioservices (Worcester, MA).

Production of recombinant 18 KDa oncosphere protein and *C. bovis* cleared lysates Sf9 cell cultures were infected with P1 recombinant baculovirus stock expressing the 18 KDa oncosphere adhesion proteins at a MOI of 10 in EX-CELL media (Life Technologies) and incubated for 68-70 hours at 27°C. Infected Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801 Foodborne Pathogens and Disease For Peer Review ONLY/Not for Distribution cells were harvested, centrifuged and washed twice with PBS pH 7.4. Cell pellets were stored at -80°C and supernatants discarded. To extract the recombinant 18 KDa oncosphere adhesion proteins (rTsag18), 1 gram (g) of infected Sf9 cell pellets or fresh, 1 g of vesicular state *T. saginata* larvae (*C. bovis*) obtained from bovine infected carcasses at local slaughterhouses, or 1 g of Sf9 cells were resuspended in neutral pH lysis buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 25 mM Bicine, 1M Dithiothreitol diluted 1:1000 and 1% protease inhibitor cocktail. Cell suspensions or larvae were ground in a glass cell homogenizer on ice for 5 minutes. The disrupted cell lysates were incubated overnight at 4°C. The next morning, cell lysates were vortexed at maximum speed for one minute and centrifuge at 10,000 x g for 30 minutes at 4°C to obtain a cleared lysate containing the recombinant 18 KDa oncosphere adhesion proteins (rTsag18) and the cleared lysates from *C. bovis* or Sf9 cells. Uninfected Sf9 cells cleared lysates were used as negative reference control. Resulting stocks of extracted rTsag18, *C. bovis* and Sf9 cells were stored at -80°C in 1 ml aliquots until SDS-PAGE experiments.

Partial characterization of rTsag18 protein and *C. bovis* cleared lysates by SDS-PAGE

Cleared lysates from *C. bovis* or containing rTsag18 were separated by SDS-PAGE and protein bands revealed using Coomassie blue staining. To determine the approximate molecular weight Novex Sharp Protein Standard ladder (Life Technologies). Western blot analysis using denaturing conditions was used to test the ability of rTsag18 to react with bovine sera from an experimentally infected animal used as reference control. Reference control sera was developed in a bovine experimentally infected with *T. saginata* eggs, kindly provided by Dr. Edda Sciutto Conde, from the Department of Immunology, Institute of Biomedical Investigations at National Autonomous University of Mexico. After denature at 95°C for 5 minutes in reducing buffer, samples were loaded into NuPAGE Novex 4-12% Tris gradient polyacrylamide gels (Life Technologies) and proteins separated by electrophoresis at 200 volts for 45 minutes. Proteins were then either dye with SimplyBlue (Life Technologies) Coomassie blue stain for 60 minutes or transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot semi-dry blotting system (Life Technologies). Blotted membranes containing the immobilized rTsag18 were blocked for 60 minutes with SuperBlock T20 blocking buffer (Thermo Scientific), washed five times over a period of 15 minutes and tested for antibody binding using the bovine positive reference control diluted 1:1,000 in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween-20 (working buffer). After incubation at room temperature (RT) for one hour on a rocking platform, membranes were washed as described before the addition of goat anti-bovine IgG alkaline phosphatase conjugate antibody (Kirkegaard & Perry) diluted 1:2,000 in working buffer. After another hour of incubation and washing, NBT/BCIP alkaline phosphatase substrate solution (ROCHE) was added and incubated at RT on a rocking platform for 10 minutes. When bands develop, the substrate reaction was stopped by rinsing the membranes with distilled water.

Results

We developed a baculovirus expression system for the production of the 18 KDa adhesion proteins of *T. saginata* in Sf9 insect cell cultures. The recombinant protein, named rTsag18, is expressed and stored in the cytoplasm of Sf9 cells and harvested 70-72 hours post infection. Extraction of rTsag18 from Sf9 cells was made by chemical lysis using a lysis buffer containing a mix of ionic and non-ionic detergents and protease inhibitors. 112 A first lot

of fifty 150 cm² 113 culture flasks were infected to produce approximately 90 grams of infected Sf9 cells. From those, we processed and obtained an initial batch of 30 ml of cleared lysates of rTsag18 (Figure1.). Cleared extracts of rTsag18 were mixed, homogenized and partially characterized by SDS-PAGE. Coomassie blue staining was used to estimate the approximate molecular weight and target protein homology with crude extracts of *C. bovis* obtained from bovine infected carcasses condemned at a local slaughterhouse. The Coomassie blue stained SDS-PAGE revealed multiple common bands of protein at approximately the same molecular weight in at least seven protein bands at 15 KDa, 21 KDa, 32 KDa, 34 KDa, 38 KDa, 46KDa and 52 KDa present in both the rTsag18 and the protein extracts from *C. bovis* (Figure 1.). Immunogenicity of rTsag18 was evaluated by western blot using a positive reference control sera developed in an experimentally infected animal. The western blot produced several recombinant protein fractions with a pattern of molecular masses similar to those obtained in the Coomassie blue stained gels (Figure 1.). The immunogenicity of the rTsag18 was tested and confirmed in at least seven different protein fractions with molecular masses between 15 KDa and 52 KDa when compared with protein extracts of *C. bovis*.

Discussion

Serological diagnosis of bovine cysticercosis depends on the availability of specific antigens capable to be used for the detection of antibodies that indicate exposure to the parasite. The 18 KDa oncosphere adhesion proteins of *T. saginata* elicit strong antibody mediated responses and have been proved to be a good protein antigen for diagnostic purposes (Ferrer et al., 2007; Parkhouse et al., 2008) .

The objective of this study was to evaluate the diagnostic utility of a recombinant *T. saginata* oncosphere adhesion protein (rTsag18) expressed in a baculovirus system, compared with a lysate obtained from infective, vesicular stage, *C. bovis* extracts obtained from infected bovine carcasses condemned at a slaughterhouse during post mortem inspection. The immunogenicity of the rTsag18 was tested and confirmed in western blots showing a similar pattern of bands in at least seven different protein fractions with molecular masses between 15 KDa and 52 KDa from the protein extracts of *C. bovis*. The technology required to produce recombinant proteins from a baculovirus expression system is simple and cost effective and may be the more practical diagnostic solution in situations where economical factors cost are of major importance such as in areas of the developing world where these parasites infections in humans and animals are a major problem (Harrison et al., 2005).

Therefore, our results indicate that the rTsa18 protein antigen developed here is a potentially source of antigen to be use as the basis of serological methodologies for the diagnosis of bovine cysticercosis, particularly for the development of an ELISA system to detect cattle infected with *C. bovis* during the industrial fattening phase of cattle at the feedlot, weeks or months before they are sent to slaughter, giving the opportunity to the farmers of the livestock industry to apply treatments and sanitary measurements to avoid carcass condemnation and economic losses. The development of a reliable antemortem test for *T. saginata* cysticercosis for feedlot cattle should ensure that control strategies for the parasite are oriented only the infected animals. The test could be used in the feedlot and herds where an exposure to the parasite due human infection with *T.*

saginata is suspected. It can also be used in Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Foodborne Pathogens and Diseases feedlot and herds with history of *T. saginata* to determine which animals could be chosen for treatment or safely sent to slaughter. Besides the opportunity for testing cattle before they are sent to slaughter, additional measures such as an enhanced meat inspection of specific tissue sites like in the heart (Eichenberger, Stephan, and Deplazes, 2011), could be used in conjunction with the test to prevent zoonotic transmission of the parasite.

Abuseir, S., Kuhne, M., Schnieder, T., Klein, G., and Epe, C. (2007). Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. *Parasitol Res* 101(1), 131-7.

Eichenberger, R. M., Stephan, R., and Deplazes, P. (2011). Increased sensitivity for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercus infection by additional heart examination compared to the EU-approved routine meat inspection. *Food Control* 22(6), 989-992.

Ferrer, E., Gonzalez, L. M., Martinez-Escribano, J. A., Gonzalez-Barderas, M. E., Cortez, M. M., Davila, I., Harrison, L. J., Parkhouse, R. M., and Garate, T. (2007). Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol Res* 101(3), 517- 25.

Gonzalez, L. M., Bonay, P., Benitez, L., Ferrer, E., Harrison, L. J., Parkhouse, R. M., and Garate, T. (2007). Molecular and functional characterization of a *Taenia* adhesion gene family (TAF) encoding potential protective antigens of *Taenia saginata* oncospheres. *Parasitol Res* 100(3), 519-28.

Harrison, L. J., Garate, T., Bryce, D. M., Gonzalez, L. M., Foster-Cuevas, M., Wamae, L. W., Onyango-Abuje, J. A., and Parkhouse, R. M. (2005). Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. *Trop Anim Health Prod* 37(2), 103-20.

Kyvsgaard, N. C., Ilsoe, B., Henriksen, S. A., and Nansen, P. (1990). Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance

for routine meat inspection. *Res Vet Sci* 49(1), 29-33. Lightowlers, M. W., Gauci, C. G., Chow, C., Drew, D. R., Gauci, S. M., Heath, D. D., Jackson, D. C., Dadley-Moore, D. L., and Read, A. J. (2003). Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *Int J Parasitol* 33(11), 1207-17.

Ogunremi, O., and Benjamin, J. (2010). Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 169(1-2), 93-101. Parkhouse, R. M., Bonay, P., González, L., Ferrer, E., Gárate, T., Aguilar, C., Cortez A, M., and Harrison, L. S. (2008). TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitology Research* 102(5), 921-926.

Anexos

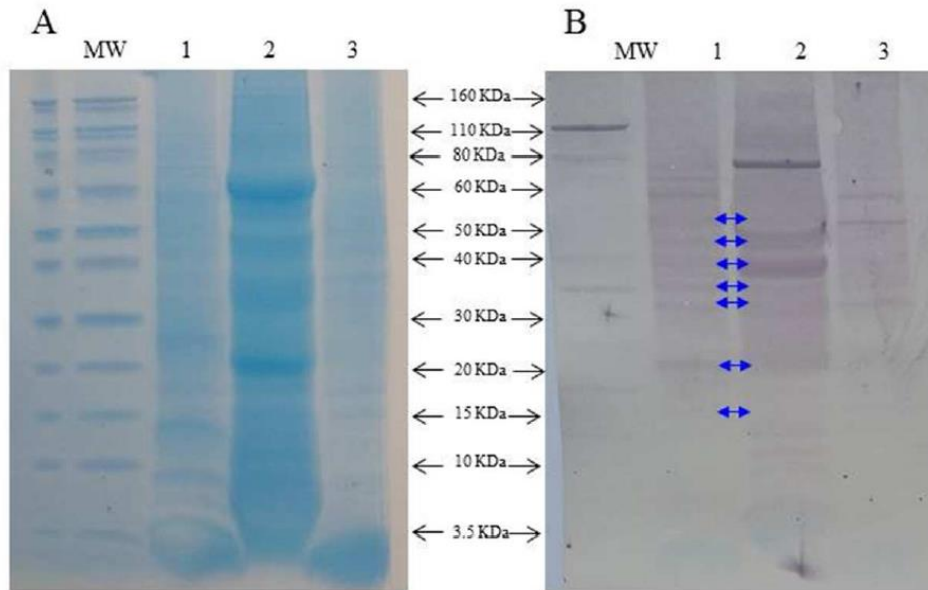


Fig. 1. A, Coomassie blue-stained SDS-PAGE in 4-12% polyacrylamide gel (Novex, Life Technologies) analysis of cleared lysates. B, Western blotting of rTsag18 (lane 1), *C. bovis* (lane 2) and Sf9 cell culture (lane 3) cleared lysates with anti-*C. bovis* reference sera. Lane MW Novex Sharp Protein Standard (Life Technologies).

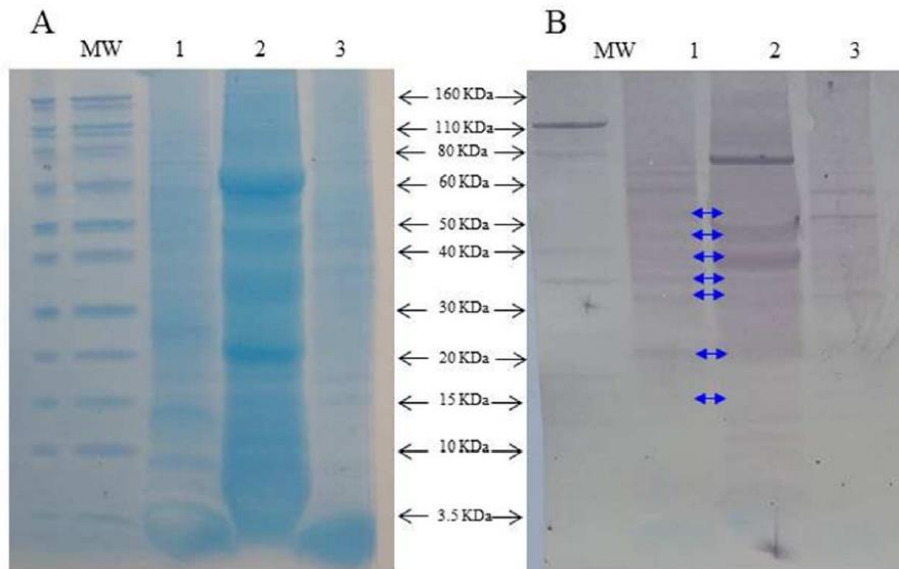


Fig. 1. A, Coomassie blue-stained SDS-PAGE in 4-12% polyacrylamide gel (Novex, Life Technologies) analysis of cleared lysates. B, Western blotting of rTsag18 (lane 1), *C. bovis* (lane 2) and Sf9 cell culture (lane 3) cleared lysates with anti-*C. bovis* reference sera. Lane MW Novex Sharp Protein Standard (Life Technologies).

“Expression of the Microbacterial Antigen Hsp65 in Food Lactococcus Lactis Bacterium.”

Medina Basulto G^a, Herrera Ramirez J^a, Chavez de la Mora A^a, De la Mora Valle A^a, López Valencia G^a, Bermudez Hurtado R^a, Renteria Evangelista T^a, Rodriguez Castillo J^a, Rodriguez Gardea A^a. y Gomez Gomez S^a.

^a Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a zoonotic disease distributed worldwide and is of great importance for public health and the livestock industry. Several experimental vaccines against this disease have been tested in recent years, yielding varying results. An example is the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, which has been used extensively in humans and tested in cattle showing mixed results related to protection (0–80%) against *Mycobacterium bovis* (Fine, 1995, Thoen et al., 2006). In this study, we used the food grade bacterium *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) as an expression vector of the mycobacterial protein Hsp65. For this, the construction of a replicable plasmid in strain NZ9000 *L. lactis* (pVElepr) was conducted, which expressed the protein Hsp65 of *M. leprae* and was recognized by traded anti-Hsp65 antibodies. The strain NZ9000-pVElepr was applied to calves that were negative to a tuberculin test and the immune response was monitored. The results showed that immune response was not significantly increased; no injury was observed in any of the study groups, suggesting that the NZ9000 strain of *L. lactis* may protect against the development of infection.

Key Words: Bovine tuberculosis, Hsp65, Vaccination, *Lactococcus*.

INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (TBB) is an infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium bovis* bacterium (*M. bovis*), which is a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and has an economic impact on dairy cattle in Mexico by reducing the production by 17%: in Mexico, only the 28% of milk produced is pasteurized (Modification NOM-031-ZOO, 1995). In dairy cattle herds, such as those located in Tijuana, Baja California, Mexico, TBB is a severe problem due to its high prevalence (16.5%) (according to SAGARPA in 2012), indicating that actions contemplated on Mexican Official Standard NOM-031.-ZOO-1995 had been insufficient in order to reduce this disease in a significantly way. Thus, it is necessary to implement several alternatives to achieve the reduction of TBB in a short time. Studies about vaccinations on bovines using a BCG vaccine show a reduction of severity and quantity of injuries ($p > 0.05$) when used in a dose of 5×10^3 and 5×10^6 colony-forming units (CFU) for a later challenge using the *M. bovis* pathogen at a rate of (5×10^3 CFU) (Buddle et al., 1995, Buddle et al., 2003). Meanwhile, Lopez et al., in 2009, observed that, when using a BCG vaccine in a dose of 1×10^6 CFU in field conditions, the frequency of cases with TBB on those vaccinated was 9.7% compared with 22.7% on those not vaccinated.

The immunological strategy, as an alternative against several pathogens, is the use of Gram-positive bacteria, food-grade or commensal, particularly those based on the model of lactic acid bacteria (LABs). Some studies showed the possibility to modulate both systemic and mucosal immune response (Bermúdez-Humarán et al., 2011, Bahey-EI-Din et al., 2010). Among the group of LABs, *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) can be found; its genome has been completely sequenced by Bolontin et al (2001). Additionally, several plasmids had been studied for the expression of heterologous proteins induced by nisin (a grade food natural preserver) and selected antibiotics. Profiling this kind of system has an excellent potential to obtain recombinant grade food live vaccines, with adequate efficiency and extensive use (Santos Pontes et al., 2011; Nouaille et al., 2003).

The interest of the present study on the implementation of a highly preserved chaperonin of the genre *Mycobacterium*, such as Hsp65, is the important role at the

initiation of innate as well as adaptive immune responses. Although it is questioned, immune-stimulation activity using a recombinant *L. lactis* (rL. Lactis) model has shown its efficiency to produce cytoplasmic and extracellular forms of this chaperonin (Azevedo et al., 2012). Studies have shown that using 100µg of Hsp65-DNA intramuscularly in mice induced a statistically significant adaptive and innate response ($p > 0.01$), as well as a reduction at the quantity of CFU in 100% of animals that received three immunizations (Lowrie et al., 1999, Lima et al., 2003, Lowrie, 2006). Actually, the vaccination system using *L. lactis* as a vector for protein and DNA expression has been successfully used for its prophylactic and therapeutic effects in several animal models. An example of this is a study to treat the 16 type human papillomavirus (HPV-16) in mice, which showed a reduction of 35% in the frequency of this cancer induced by the virus (Bermúdez-Humarán et al., 2011). Recombinant *L. lactis* used to immunize mice induced a statistically significant cellular immune response ($p > 0.05$) on assays against avian influenza virus HA1 antigens compared with the effect of *L. lactis* without the recombinant fragment (Lei et al., 2011). Azevedo et al. (2012), using a similar model to the one proposed in this study, produced approximately 7mg/L of recombinant Hsp65. Based on the above-described results, the present study aimed to build an *L. lactis* strain that expressed a mycobacterial Hsp65 protein for further characterization. Additionally, a brief preliminary experimental assay was conducted in order to evaluate its capability of induction of the innate and adaptive immune response in calves challenged experimentally.

MATERIALS AND METHODS

The location of the study was the Laboratories of Molecular Biology, Tuberculosis and Brucellosis and Experimental unit at the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias of the Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico.

Bacterial strains and growing conditions.

The *L. lactis* strain NZ9000 was grown in a Difco M17 broth medium, containing 0.5% glucose (GM17), at 30°C overnight without agitation. If required, 10µg/mL of chloramphenicol was added to the broth medium. *Escherichia coli* DH5α strain was aerobically cultured at 37°C in a Luria-Bertani broth medium with 100µg/mL ampicillin or 10µg/mL chloramphenicol, when needed.

Plasmid construction.

An EcoR1 fragment DNA from the *Mycobacterium leprae* Hsp65 gene (provided by Laboratorio de inmunología molecular y biotoxinas, CICESE, Ensenada, BC. Mexico) was inserted in pCR – Blunt II – TOPO® (GenBank: M14341.1) then inserted in *E. coli* as a cloning host. Selection was done on agar with yeast-triptone (LB) containing 50µg/ml of Kanamycin.

The subcloning in the pVE5547 vector (Cortes-Perez et al., 2003; Dieye et al., 2001) was done by using a high fidelity enzyme (iProof™. High Fidelity DNA Polymerase, BioRad), amplifying the Hsp65 gene by PCR with Sall and NheI enzyme sites (primer pveleprcF: 5´ TGGGA GGAAA AATTA CAAA GAACA-3´ and pveleprcR: 5´-CTTCT AAAGC TAGCA AGTCC ATAC-3´) and inserting the amplified fragment (Hsp65) in the pVE5547 plasmid, which was previously partially digested with the same restriction enzymes and purified with the S.N.A.P.™ Miniprep Kit (Invitrogen Inc.) method, obtaining a fragment of 4791pb.

Subcloning in the pSEC/E7 vector is replicable on *L. lactis* (Bermúdez-Humarán et al., 2002). Once the pVE5547 vector contained the Hsp65 sequence, it was transferred to the pSEC/E7 vector by means of digestion with BglIII-NheI restriction enzymes, selecting a fragment of 3403pb for its final subcloning. The result of this was the construction of the pVElepr plasmid replicable on *L. lactis* as shown in Figure 1.

A Western blot was used to determinate the Hsp65 expression. To analyze the protein profile on studied strains, an electrophoretic assay of supernatant and bacterial biomasses was made. Fractions were separated on polyacrylamide gels containing 0.1% SDS, according to Laemmli (1970). A concentrator gel at 5% and a separator gel at 8% of acrylamide was used. Of each fraction of the gel, 5µg, as well as a known protein (PROMEGA, cat V849A) were running at 100 volts using Tris-Glicine pH 8.3 with an SDS 0.1% buffer and were stained with 0.2% blue Coomassie.

For immune electro transference, the method described in Towbin et al. (1979) was used. After electrophoresis, gel was incubated on a transfer buffer (25mM Tris base, 192mM glycine and 20% methanol, pH 8.3) for one hour. Transference to a nitrocellulose membrane on a transference buffer was conducted in a Trans-Blot SD semi Dry Transfer Cell (BioRad) at room temperature with a constant voltage (25 V) for one hour. After the transference to the nitrocellulose membrane, the blocking of reactive free sites was done with 5% skim milk on PBS for 1.5 hours at 37°C and the membranes were washed five times with 0.01% PBS Tween 20 (PBS-T) for five minutes each wash. IgG anti-Hsp65 was used as a primary antibody (Biothechologies, Stressgen) in a 1:1000 dilution and was incubated for one hour at room temperature. The secondary antibody used was an anti-mouse IgG of rabbit with peroxidase attached (SIGMA) in a 1:4000 dilution, which was incubated for one hour at room temperature. Finally, membranes were revealed with Coomassie Brilliant Blue (BioRad) for analysis.

Experimental units

Twelve calves (three months of age, of the Holstein Friesian breed, with the males castrated), derived from a local herd that has been free of TBB for 30 years, were tested with intradermic tuberculin and were found to be negative.

Experiment on experimental units

Three calves were vaccinated with *L. lactis* pSEC/E7 (control group) and three calves were vaccinated with *L. lactis* pVElepr (vaccinated group “V”). Both were vaccinated with a dose of 2×10^6 CFU (one dose intranasal and one dose via the intramuscular pathway on the neck) followed by two boosters at intervals of two weeks using the same dose and route. Two new groups were formed, each having the same conditions as the first two. However, the difference with the previous groups lies in a challenge conducted at month two by the intratracheal pathway with *M. bovis* strain 138 (Martínez-Vidal et al., 2011) in a 1×10^4 CFU dose; thus, forming the challenged control group, “Control + R”, and challenged vaccinated group, “V + R”, respectively

.

Testing

Previously, all animals were tested with double comparative intradermal tuberculin tests conducted at the start of the study (of which the results were negative) under the established rules of the Mexican Official Standard (NOM-031-ZOO-1995) and established protocols of the Bioethics Committee from the IICV/UABC (Asociación Médica Mundial, 2009). These standards guided everything related to experimentation proceedings on live animals, while considering facilities and appropriate equipment to maintain biosafety standards required by the experiment.

Sample collection

Heparinized and non-coagulant tubes were used for blood sample collection starting at month three, collecting at intervals of 28 days for six months from the coccygeal vein for a total of eight samplings for each animal.

Antibody evaluation

Levels of specific antibodies were determined on 96 well ELISA plates (Maxisorp NUNCTM) for each sample. Plates were coated with 10ng per well with a commercial *M. bovis* recombinant Hsp65 protein (Biotechnologies, Stressgen) on a Carbonate-Bicarbonate buffer solution pH 9.6 (1.53gr/L NaCO₃, 2.93gr/L NaHCO₃, adjusted with 37% Hydrochloric Acid) at 4°C for 24 hours. The plates were blocked with 200µl per well of 3% non-fat milk on sterile PBS-T at room temperature. Each serum of the study was added at a rate of 1:100, using 50µl per well for two hours at 37°C. For detection of specific antibodies, IgG anti-bovine in mice (SIGMA) was used at a 1:20,000 rate for two hours at 37°C. Fifty µl of a TMB solution (20ml of pH 4.0 citrate solution, 100µl TMB stock solution (0.1grs TMB, 10ml DMSO)), 10µl H₂O₂ (30%) was added to each well. The reaction was stopped after 15 minutes with an acid solution using 50µl per well of 0.5M H₂SO₄. Optical density (OD) was read at 450nm on a spectrophotometer. Titles of antibodies were established by duplicating the value obtained per well and subtracting standard deviation of a blank sample.

Interferon gamma assay

To determinate the interferon gamma assay (γ - IFN), 750µl of heparinized whole blood was cultured in borosilicate tubes, adding 50µl of antigen (CSL, Australia) per sample; the samples were incubated at 37°C in high ambient relative humidity for 24 hours. The supernatant was collected and the γ - IFN level was measured by using the Immunoenzymatic assay package BOVIGAM (CSL, Melbourne, Australia).

Postmortem examination

At the end of the study (six months post inoculation), animals were sent to the Federal Inspection slaughterhouse (TIF) for sacrifice and inspection. After the federal inspection, lungs and lymph nodes (retropharyngeal, bronchial and mediastinal) were collected for a second examination in the laboratory. They were stored in biological bags at 4°C and

identified with the animal number for transportation. Tissues were sectioned at 0.5–1cm thickness by means of standard procedures and cut at 4 μ m and stained with hematoxilin and Ziehl Neelsen stains.

Lungs. Pulmonary lobes were examined individually (apical, cardiac and diaphragmatic left lobes and apical, cardiac, diaphragmatic and accessory right lobes). For each lobe, the following scoring system was applied: 0, no visible lesion; 1, no macroscopic lesion but lesion at cutting; 2, <5 macroscopic lesions with <10mm of diameter; 3, <6 lesions with diameters < than 10mm; 4, <1 distinctive macroscopic lesion with < than 10mm of diameter; 5, coalescence macroscopic lesions. Individual lobe scores were added to calculate a pulmonary score (Lyashchenko et al., 2004).

Lymph nodes. The macroscopic severity of the disease observed in lymph nodes was evaluated under the following score system: 0, no necrosis or visible lesion; 1, small focal lesion (1–2mm in diameter); 2, several small focal lesion or necrotic areas, at least 5 x 5mm in diameter; 3, multiple necrotic areas at least 5 x 5mm in diameter distributed along the node, or necrotic areas affecting 5% of the node. The individual score of lymph nodes was added to calculate a lymphatic nodes score. Lymphatic node score and pulmonary score were considered to determine a complete pathological score per animal. The score was established by the same personnel in the slaughterhouse for all animals in the study to insure consistency (Lyashchenko et al., 2004).

Statistical assay

The statistical difference between humoral and cellular immune responses was estimated with MINITAB software, where statistical significance was determined at $p < 0.05$. Correlations between immune response and lesions scale grade were estimated by non-parametric analysis (Spearman Rank Test).

RESULTS

L. lactis NZ9000 was used to construct “*L. lactis*/pVElepr” (Figure 1), and was analyzed to determine Hsp65 expression by a Western blot (Figure 2), showing Hsp65 expression as a band of 70kDa, not present on the *L. lactis*/pSEC/E7 strain. Also, the expression capacity and antigenic character of the Hsp65 protein expressed on *L. lactis*/pVElepr strain was probed.

An immune enzymatic assay (ELISA) to measure specific antibodies (anti-Hsp65) by spectrophotometry at 450nm was made, which showed no significant statistical difference between the control group and vaccinated group without challenge ($p > 0.05$), with standard deviations of 0.045 and 0.079, respectively. The results for the control group “*L. lactis* pSEC/E7”, and the vaccinated group “*L. lactis*/pVElepr” were both challenged by *M. bovis* strain 138 and showed no significant statistical difference ($p > 0.05$), with standard deviations of 0.101 and 0.093, respectively. Although, this could appreciate a small activation of a humoral immune response against Hsp65 antigens at the end of the study (sampling 7 and 8).

The gamma interferon assay, used to measure cellular immune response during the study, showed no statistical difference between vaccinated and control groups ($p > 0.05$), with a standard deviation of 0.159. The same tendency was observed in Control + R and V + R groups, although comparing those vaccinated with those challenged showed a tendency to maintain a cellular immune response superior to those vaccinated non-challenged (sampling 6, 7 and 8).

The analysis of macro and microscopic lesions compatible with (TBB) during slaughter inspection TIF did not show visible lesions. Of the animals in the study, 100% were classified as both pulmonary and lymphatic nodes with a score of 0. Similarly, a microscopic evaluation of tissues did not show any suggestion of an inflammatory process.

DISCUSSION

The results obtained in the present study are not as strong as those in which Hsp65-DNA was used as an inductor of innate and acquired immune response on immunized mice and challenged later using 10⁵ CFU *M. tuberculosis* H37Rv intramuscularly. In that study, a statistically significant stimulation of both immune responses ($p < 0.01$) and a reduction of CFU quantity ($p < 0.001$) were determined when compared with those where it was not used (Lima et al., 2003, Lowrie et al., 1999). This finding may be due to an interrupted expression on several organs of the host when the DNA vaccine was applied, which can be determined to activate a strong immune response. Similarly, the study differs from the results obtained by Bermúdez-Humaran et al. (2011), because they reported that a *L. lactis* strain expressing an antigen against HPV-16 on a mouse model showed an activation of the humoral immune response, and concluded that vaccine result to be prophylactic and therapeutically acceptable. This may be due to specific IgA production induced by the exposition of the mucosae to antigens produced by *L. lactis* resulting in protection against HPV-16 infection, in contrast to the cellular immune response needed to protect against infections such as TBB. In this study, expression of the antigenic Hsp65 protein using *L. lactis*/pVElepr as the vector proved to be antigenic by the recognition of specific antibodies anti-Hsp65 (Biotechnologies, Stressgen), (Figure 2). Nevertheless, activation of immune response after nasal and intramuscularly administration of *L. lactis*/pVElepr was not sufficient to observe a significant statistical difference between *L. lactis*/pVElepr and *L. lactis*/pSEC/E7 groups. It was also shown that expression or exposition of immune system cells to Hsp65 was also insufficient. An unexpected finding was that *L. lactis* NZ9000 strain administration induces a humoral and cellular immune response, and, due to this, it could not be possible establish an immunogenical differentiation between study groups. This may be due to the presence of similar chaperonin to Hsp65 on *L. lactis*, as groEL of 60kDa is expressed on its surface (Bolontin et al., 2001).

An important aspect in relation to infective dose is that it could appreciate the establishment of infection after performing the tuberculin double comparative test at the end of the study, where all groups were challenged with the field strain *M. bovis* 138.

Groups had a positive result after infection and were kept in this immunologic status until the end of the study, as compared with non-challenged animals that had a negative result to the same test (data not shown). This suggests that the infective dose used was not sufficient to induce macroscopic or microscopic lesions on analyzed organs, or that the NZ9000 strain can (by itself) protect against the development of lesions at least at the infective doses used and at the time of post infection in which the experiment was conducted. Finally, we observe the need for a new experiment using the constructed strain in this study, a large number of experimental units, a control group without *L. lactis* NZ900 strain, a superior infective dose and a long-term experimentation interval to evaluate (with higher precision) the protective effectiveness of *L. lactis* NZ9000/pVElepr.

Acknowledgement

The present study was financially supported by the Universidad Autónoma de Baja California, PRODUCE Foundation of Baja California A. C, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. CONACyT scholarship graduate students: José Carlomán Herrera and Alejandra Chávez de la Mora. Thanks to researchers from the Universidad Autónoma de Nuevo León, Odila Saucedo and Roberto Montes de Oca for facility plasmids and the NZ9000 strain of *L. lactis*. Thanks also to the veterinarian student, Aidé Ocegüera, for the contribution to the experimental construction of the plasmids in this study.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests. We gave assurance that neither the submitted materials nor portions at the article have been published previously or are under consideration for publication elsewhere.

REFERENCES

- Asociación Médica Mundial. 2009. "Medical Ethics Manual".
- Azevedo MS, Rocha CS, Electo N, Pontes DS, Molfetta JB, Goncalves ED, Azevedo V, Silva CL, Miyoshi A. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *J. Genet. Mol. Res.* 2012, 11(2), 1146-1157.
- Bahey-El-Din M, Gahan CG, Griffin BT. *Lactococcus lactis* as a cell factor for delivery of therapeutic proteins. *J. Current Gene Therapy* 2010, 10, 34-45.
- Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss A, Guerra RT, Montes de Oca-Luna R, Le Loir Y. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *J. Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68(2), 917-922.
- Bermúdez-Humarán LG, Pascale K, Chatel JM, Langella P. Lactococci and Lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *J. Microbial Cell Factories* 2011, 10(Suppl 1), S4.
- Bolontin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. *J. Genome Res.* 2001, 11, 731-753.
- Buddle BM, De Lisle GW, Pfeiffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *J. Vaccine* 1995, 13, 1123-1130.
- Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LA, De Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *J. Infection and Immunity* 2003, 71, 6411-6419.
- Cortes-Perez NG, Bermudez-Humaran LG, Le Loir Y, Rodriguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cardenas O, Langella P, Montes-de-Oca-Luna R (2003). Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:37-42.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC (2001). Design of a Protein-Targeting System for Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology.* 183(14):4157-4166.

Fine PE (1995). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 346:1339-1345.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lei H, Sheng Z, Ding Q, Chen J, Wei X, Lam DMK, Xu Y (2011). Evaluation of oral immunization with recombinant avian influenza virus HA1 displayed on the *Lactococcus lactis* surface and combined with the mucosal adjuvant cholera toxin subunit B. *J. Clin. Vaccine Immunol.* 18(7):1046.

Lima KM, Dos Santos SA, Santos RR, Brandão IT, Rodrigues JM, Silva CL (2003). Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *J. Vaccine.* 22(1):49-56.

Lopez-Valencia G, Renteria-Evangelista T, Williams JdeJ, Licea-Navarro A, Mora-Valle A, Medina-Basulto G (2009). Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *J. Research in Veterinary Science.* 88(1):44-49.

Lowrie DB (2006). DNA vaccines for therapy of tuberculosis: where are we now? *J. Vaccine.* 24:1983-1989.

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stravropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL (1999). Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *J. Nature.* 400:269-271.

Lyashchenko K, Whelan O, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM (2004). Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and Infected with *M. bovis*. *J. Infection and Immunity.* 72(5):2462-2467.

Martínez-Vidal C, Hori S, De la Mora A, Bermúdez RM, Rentería TB, López G, Galván LJ, Medina GE (2011). VNTR for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle slaughtered in Baja California, Mexico. *J. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2(4):393-401.

MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). 27 de Agosto de 1998.

NORMA, Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995). Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).

Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *J. Genetics and Molecular Research*. 2(1):102-111.

Pan American Health Association. 2007. Health in the Americas. Volume II – Countries.

Pontes DS, Azevedo MSP, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A (2011). *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *J. Protein Expression and Purification*. 79:165-175.

Secretaria de Salud. 2001. Programa de Acción: Tuberculosis. México, D. F.

Secretaria Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2012.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *J. Proc. Natl. Acad. Sci*. 76(9):4350-4354.

Thoen, C. O., J. H. Steele and M. J. Gilsdorf. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Blackwell Publishing, 2nd Ed.

World Health Organization. 2010. Tuberculosis.