

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Instituto de Ciencias Agrícolas**  
**Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE RTSAG18 DE TAENIA SAGINATA COMO  
PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO ANTEMORTEM  
PARA CISTICERCOSIS BOVINA**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**  
**SERGIO ARTURO CUETO GONZÁLEZ**

**Director de tesis**  
**FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO**

**Asesores**  
**GILBERTO LÓPEZ VALENCIA**  
**ROSA MARÍA BERMÚDEZ HURTADO**  
**LUIS TINOCO GRACIA**  
**TOMÁS BENJAMIN RENTERÍA EVANGELISTA**

**Mexicali, Baja California.**

**Mayo, 2015**

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para la obtención del grado de:

**Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular

---

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO  
DIRECTOR DE TESIS

---

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA  
ASESOR

---

DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ HURTADO  
ASESOR

---

DR. LUIS TINOCO GRACIA  
ASESOR

---

DR. TOMÁS BENJAMÍN RENTERÍA EVANGELISTA  
ASESOR

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
<i>Clasificación taxonómica del género Taenia</i> .....	11
<i>Morfología de las tenias</i> .....	13
<i>Estado adulto</i> .....	13
<i>Huevos</i> .....	15
<i>Cisticerco o metacéstodo</i> .....	16
<i>Ciclo de vida de la Taenia saginata</i> .....	16
<i>Importancia Zoonótica de Taenia saginata</i> .....	18
<i>Epidemiología de la Taenia saginata</i> .....	19
<i>Respuesta inmune humoral</i> .....	22
<i>Inmunidad Celular</i> .....	22
<i>Diagnóstico parasitológico de teniosis</i> .....	23
<i>Sistemas de diagnóstico serológico para cisticercosis</i> .....	24
<i>Diagnóstico molecular de teniasis/cisticercosis</i> .....	26
<i>Desarrollo de tecnología para el diagnóstico</i> <i>de cisticercosis bovina</i> .....	27
<i>Caracterización de la proteína recombinante rTsag18</i> .....	29
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	32
EXPERIMENTO I (Enviado a: <b>FOODBORNE PATHOGENS</b> <b>AND DISEASE</b> ).....	36
EXPERIMENTO I (Enviado a: <b>FOODBORNE PATHOGENS</b> <b>AND DISEASE</b> ).....	46

## RESUMEN

La cisticercosis bovina es una importante causa de pérdidas económicas para la industria ganadera debido al decomiso, retención o depreciación o de canales con lesiones sugestivas o infectadas con cisticercos. El diagnóstico de la cisticercosis bovina se fundamenta en la inspección post-mortem de las canales, procedimiento que ofrece una sensibilidad menor al 50% ya que solo detecta casos de animales altamente infestados. Las pruebas serológicas son una alternativa para la detección temprana de esta enfermedad, con niveles de sensibilidad y especificidad superiores al 90%, sin embargo; la producción de antígenos provenientes de extractos crudos de *Cisticercos bovis* es sumamente baja, limitando su aplicación en escala comercial. Como respuesta a la necesidad de contar con una prueba de diagnóstico serológico altamente sensible y específica para cisticercosis bovina, se desarrolló un antígeno de prueba basado en la proteína recombinante Tsag18 (rTsag18) como antígeno de prueba para la detección de anticuerpos contra oncosferas de *Taenia saginata*. Tsag18 es una proteína de fusión altamente antigénica, 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. rTsag18 fue expresada en un sistema de baculovirus en cultivo de células Sf9. La reactividad inmunológica de rTsag18 fue confirmada por western blot empleando sueros controles positivos de referencia. La proteína rTsag18 aquí desarrollada, significa una alternativa de diagnóstico que aplica la tecnología más moderna disponible para 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 las estrategias de tratamiento más adecuadas para cada caso, así como la opción para decidir el destino industrial y comercial de casos sugestivos o positivos a cisticercosis, protegiendo la continuidad de los mercados internacionales de la

carne producida en México en beneficio de la economía del sector ganadero regional y del país.

## ABSTRACT

Bovine cysticercosis is a major cause of economic losses to the livestock industry due to condemning, retention or depreciation of carcasses infected or showing lesions suggestive of cysticerci. The diagnosis of bovine cysticercosis is based on post-mortem inspection of the carcass, method that provides a sensitivity lower than 50% since only detected cases of heavily infested animals. Serological tests are an alternative for early detection of this disease, with levels of sensitivity and % specificity above 90% however; antigen production from crude extracts of *Cysticercus bovis* is extremely low, limiting its application on a commercial scale. In response to the need for high sensitive and specific tests for the serological diagnosis of bovine cysticercosis diagnosis, we developed a recombinant protein Tsag18 (rTsag18) as antigen test for the detection of antibodies to *Taenia saginata* oncospheres. Tsag18 is a highly antigenic fusion protein, necessary for coupling oncospheres with the intestinal villi of cattle to later migrate through the bloodstream to tissues and lead to the development of cysticerci. The rTsag18 protein was expressed in a baculovirus system using Sf9 cell cultures. Immunoreactivity of rTsag18 was confirmed by Western blot using a positive reference control sera. The expression and production platform of the protein rTsag18 developed here, represents a diagnostic alternative diagnostic that applies the latest technology available to detect the presence of *Cysticercus bovis* in early stages of infection, when the cattle are on pasture or corral, long before animals are finalized and sent to the slaughter, allowing the implementation of the most appropriate sanitary strategies for treatment for each case, and provide the option to decide the industrial and commercial destiny of suggestive or positive to cysticercosis cases, protecting the continuity of international markets for the meat produced in Mexico to benefit the regional economy and the country's livestock sector.

## INTRODUCCION

Las infecciones parasitarias ocasionadas por *Taenia saginata* (*T. saginata*) o *Taenia solium* (*T. solium*) tienen serias repercusiones en la salud pública y ocasionan grandes pérdidas económicas a la ganadería. El binomio teniasis/cisticercosis es producido por parásitos del género *Taenia* y es causada por la fase adulta de *T. saginata* o *T. solium*, siendo el humano es el único huésped definitivo; mientras que la cisticercosis se produce por la presencia de las fases larvianas de estos tenidos en hospedadores intermediarios, siendo los bovinos los hospederos intermediarios para *T. saginata* (*Cisticerco bovis*) y el cerdo para *T. solium* (*Cisticerco celuloso*). (Wanzala et al., 2003). En Latinoamérica el problema de las parasitosis por *T. saginata* y *T. solium* ha sido subestimado por la escasa utilización de métodos de diagnóstico avanzados, descuidándose incluso, el diagnóstico diferencial entre *T. saginata* y *T. solium*. Entre los factores que predisponen la existencia de esta parasitosis se incluyen el tipo de sistema de explotación animal, deficiencia en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias adecuadas y el desconocimiento de la presencia y la epidemiología de esta enfermedad.

En la industria de la carne, las pérdidas económicas están estrechamente asociadas con la condición de la infección. En México la inspección *post mortem* de las canales es el procedimiento a través del cual se detecta la cisticercosis y se fundamenta en la NOM-009-ZOO-1994. El procedimiento consiste en la inspección visual de las canales por personal entrenado y acreditado para tal fin, haciendo cortes finos en músculos y vísceras predeterminados; cuando se detecta una infestación con unos cuantos parásitos o la presencia generalizada de cisticercos en una canal, ésta es confiscada y destruida. En los casos donde la cisticercosis está localizada en una región anatómica específica, la canal es retenida y congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 semanas para inactivar los parásitos. Una limitante de la inspección *post mortem* como técnica de diagnóstico de la cisticercosis es su baja sensibilidad, calculada en alrededor del 50% ya que solo detecta casos en

animales altamente infestados con cisticercos muertos, degenerados o calcificados (Boa et al., 2002; Wanzala et al., 2003).

Actualmente, existen alternativas a la inspección visual *post mortem* para el diagnóstico de cisticercosis, tales como el ultrasonido y pruebas serológicas basadas en la detección de antígenos de *Cisticercos bovis* y anticuerpos contra el parásito. Las pruebas serológicas que detectan antígenos son poco utilizadas debido a que las proteínas de secreción y excreción del parásito tienen una vida muy corta dentro del huésped (Ferrer, 2007; Fleury et al., 2007). El diagnóstico de los tenidos sigue presentando importantes limitaciones que deben superarse para alcanzar niveles de sensibilidad y especificidad adecuados para establecer un diagnóstico. Dicha detección orientaría correctamente al clínico y al veterinario sobre las patologías que padecen los sujetos enfermos, ya sean humanos o animales, lo cual ayudarían al epidemiólogo a determinar las vías de contagio y permitiría establecer con mayor seguridad las medidas encaminadas a la interrupción de su transmisión.

El presente trabajo pretende contribuir a la mejora en los niveles de sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico disponibles para detectar la presencia de cisticercosis en ganado bovino a partir del desarrollo de la proteína de fusión Tsag18 en forma recombinante (rTsag18) para ser utilizada como antígeno de prueba para el diagnóstico de cisticercosis bovina, facilitando las tareas de detección y diagnóstico de estas especies de céstodos en beneficio de las poblaciones humanas y animales. La proteína rTsag18 fue sub-clonada en un sistema de baculovirus y expresada a partir de cultivo celular de *Spodóptera frugiperda* (Sf9) para la producción de proteína recombinante (Possee, 1997). 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



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).

## OBJETIVO E HIPÓTESIS

### Objetivo General

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.

### Hipótesis

La proteína recombinante rTsag18 es reconocida por anticuerpos generados como resultado de la infección con *Cisticercos bovis* y puede ser utilizada como plataforma de diagnóstico serológico antemortem de cisticercosis bovina.

## REVISIÓN DE LITERATURA

*T. saginata* es un céstodo que parasita al hombre y bovino, conocido desde las culturas griega y egipcia. Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los llamaron “gusanos planos” por su parecido con las cintas o listones, mientras que los romanos, Celso, Plinio el Viejo y Galeno, los denominaban *Lumbricus latus*, que significa gusano ancho. Al principio de la era cristiana, algunos autores, como Serapio, consideraban que cada proglótido era un gusano diferente y lo llamaban cucurbitineos, no solamente por su parecido con las semillas de calabaza, sino porque estas semillas fueron uno de los remedios más antiguos contra la teniosis, que se sigue utilizando en la actualidad (Pawlowski y Schultz, 1972; Cox, 2002; Flisser, 2006).

La teniosis humana es una infección intestinal producida por la fase adulta de *T. solium* o *T. saginata* en el hombre, único hospedador definitivo. La cisticercosis ocurre como consecuencia de la infección por el estado larvario del parásito (cisticerco o metacéstodo) en los hospedadores intermediarios. El cisticerco de *T. saginata* (*Cysticercus bovis*) provoca la cisticercosis bovina y el cisticerco de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*) causa la cisticercosis porcina y humana, ya que el hombre también puede convertirse en su hospedador intermediario. El cisticerco de *T. solium* parasita también otros animales domésticos y silvestres entre los que podemos destacar al perro, gato, zorro y otros. (Okolo, 1986a; Okolo, 1986b; Buback *et al.*, 1996; Schwan *et al.*, 2002; Suja *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito otra tenia que afecta a humanos, *T. saginata asiática*, (Fan, 1988; Fan *et al.*, 1995), la cual utiliza como hospedadores intermediarios al cerdo, ganado vacuno, cerdos salvajes y monos, además de otros animales domésticos y silvestres típicos del Sudeste Asiático (Eom y Rim, 1993; Hoberg *et al.*, 2000, 2001; Hoberg, 2002).

### **Clasificación taxonómica del género *Taenia***

Los céstodos constituyen un importante grupo dentro del tronco de los platelmintos. Son los parásitos metazoarios con mayor grado de

especialización. Todos los miembros adultos de esta subclase son endoparásitos del aparato digestivo y conductos biliares de sus hospedadores definitivos.

Durante su ciclo biológico, requieren uno, dos o más hospedadores intermediarios, en cada uno de los cuales experimentan una fase de su desarrollo. Además, se caracterizan por ser vermes alargados y acintados, simétricos bilateralmente y aplastados dorso ventralmente. Carecen de sistema circulatorio, sistema respiratorio y aparato digestivo, por lo que su alimentación la realizan por intercambio de nutrientes a través del tegumento o envoltura externa.

La clasificación taxonómica según Cheng (1978) es Reino *Animal*, Phylum *Platyhelminthes*, metazoos planos con cavidad general que está rellena de parénquima. El cuerpo está recubierto por el tegumento, en el que se distinguen pequeñas microvellosidades, llamadas microtriquias o “microvilli”. Incluye además de la clase Cestoidea a la clase Trematoda con importantes parásitos en el hombre. La clase *Cestoidea*, con cuerpo cintiforme y segmentado, carecen de tubo digestivo y su nutrición se realiza a través del tegumento, se alimenta del contenido intestinal del hospedador, carece de aparato digestivo propio y la captación y asimilación del alimento se lleva a cabo en el sincitio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo, y probablemente también por endocitosis a través de moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Noble *et al.*, 1989). Son hermafroditas, por lo tanto cada proglotido tiene sistema reproductor femenino (ovarios, útero, vagina) y masculino (testículos, vaso deferente, vesícula seminal y cirro). Los proglótidos pueden fecundarse así mismos o cuando se adosan dos entre sí. Con respecto a *T. saginata asiática*, se debe indicar que hay autores que la definen como especie, *T. asiática*, si bien su situación taxonómica sigue siendo tema de controversia (Eom y Rim, 1993; Fan *et al.*, 1995; Simanjuntak *et al.*, 1997; Eom, 2006; Jeon y Eom, 2006; Kim *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2007).

## Morfología de las tenias

Con respecto a la morfología de los grandes tenidos del hombre, en el ciclo biológico se distinguen tres fases o estadios: el adulto, que vive adherido a la pared del intestino delgado, el huevo y el cisticerco o metacéstodo, que se encuentra usualmente en la musculatura del ganado porcino y bovino.

### Estado adulto

Presenta forma aplanada dorso ventralmente y de color blanquecino, de aproximadamente 2-4 metros de longitud para *T. solium* y para *T. saginata* presenta un tamaño medio de 5 -8 metros (Quiroz, 1999). Comprende tres partes: el escólex u órgano de fijación, el cuello o zona germinal y el estróbilo formado por una serie de segmentos o proglótidos inmaduros, maduros y grávidos, los cuales están repletas de huevos (Quiroz, 1999). Son hermafroditas por lo que en sus segmentos maduros se encuentran órganos masculinos y femeninos bien diferenciados (Schantz, 1996a).

Escólex. Es la porción anterior del cuerpo. Su morfología es esencial para la identificación del verme adulto, de forma piriforme y globular, mide de 1.5 a 2 mm de diámetro. En el caso de *T. solium*, el escólex posee un rostelo con una doble corona de ganchos. Están situadas en sus cuatro ángulos y actúan como órganos de fijación (Beaver *et al.*, 1986; Quiroz, 1999). *T. saginata* presenta un rostelo cuadrado en sección transversal no armado, también con cuatro ventosas. El adulto está perfectamente adaptado para unirse a la mucosa del intestino delgado del hombre y normalmente se encuentran localizados en el yeyuno (Beaver *et al.*, 1986).

Cuello. Situado inmediatamente detrás del escólex, es corto y delgado, mide de 5–10 mm de largo. Es un área no segmentada y poco diferenciada, más estrecha que el estróbilo. Es la región germinal de más alta actividad, ya que es la zona que da lugar a los proglótidos por un proceso conocido como estrobilación (Pawlowski 1989).

Cuerpo o estróbilo. Es la porción más grande del parásito. Está formada por una serie segmentos inmaduros de segmentos o anillos, llamados

proglótidos, que son fracciones independientes pero unidos entre si formando el adulto. Los proglótidos conforme se van alejando del escólex cambian de tamaño y presentan nuevas estructuras, por lo que se clasifican de la siguiente manera:

Proglotido. Son las estructuras más cercanas al cuello y no tienen órganos sexuales diferenciados, son más anchas que largas y en ellas se puede observar un aparato genital rudimentario.

Proglótidos maduros. De forma casi cuadrada, sexualmente maduros, donde se aprecian los órganos sexuales diferenciados. Cada proglotido puede considerarse como una unidad independiente puesto que posee órganos reproductores funcionales, tanto femeninos como masculinos. El ovario, situado en el tercio posterior del proglotido, es bilobulado en *T. saginata* y trilobulado en *T. solium*. Los testículos aparecen situados en el parénquima medular, están constituidos por folículos cuyo número varía entre 300 y 400 para *T. saginata*, mientras que *T. solium* posee la mitad. El resto de las partes del aparato reproductor de ambos tenidos son prácticamente iguales.

El sistema reproductor masculino consta de varios testículos y de cada uno surge un vaso eferente que se unen formando un vaso deferente común. Durante la copula, el cirro se introduce en la vagina, las células espermáticas se almacenan en el receptáculo seminal, desde donde penetran al ootipo para llevar a cabo la fecundación (Cheng, 1978). El sistema reproductor femenino está formado por un único ovario lobulado, situado en la base del útero en el extremo posterior del proglotido, del que parte el oviducto se dirige a una pequeña cámara, llamada ootipo, donde los distintos componentes del huevo son ensamblados. El útero se origina en la cara anterior del ootipo y se dirige hacia el borde anterior del proglotido, como un órgano ciego. (Beaver *et al.*, 1986; Quiroz, 1999).

Proglótidos grávidos. Son más largos que anchos, presentan el útero con 14 a 32 ramas uterinas laterales para *T. saginata* y de 8 a 14 ramas para *T. solium*. Se encuentran llenos de huevos dentro de las ramificaciones uterinas, la mayoría de los órganos genitales se atrofian por la presión que ejerce el útero

lleno de huevos. Cada proglotido grávido contiene aproximadamente 50,000 huevos en distintos grados de madurez (Heath, 1982). Se desprenden periódicamente del resto del cuerpo por apólisis, permitiendo así la salida de los huevos del hospedador en las heces. Los proglótidos grávidos de *T. saginata* pueden salir solos ya que presentan movimientos de contracción y alargamiento, lo que les permite desplazarse lentamente y salir por el ano. Los adultos de *T. saginata* tienen generalmente 1.000 a 2.000 proglótidos, mientras que *T. solium* presenta un promedio de 1.000 proglótidos.

## Huevos

El ootipo es el lugar de formación del huevo (Cheng, 1978). Los huevos contenidos en los proglótidos grávidos se encuentran en distintos grados de maduración, alrededor del 50% contienen oncósferas infectivas totalmente desarrolladas (Willms *et al.*, 2006). Los huevos de *T. saginata* son morfológicamente indistinguibles de los de *T. solium* y otros tenidos. Estos huevos al principio no son infectantes y requieren de dos eventos previos para que tengan capacidad de invadir al hospedador intermediario, la desintegración del embrióforo y la activación de la oncosfera (Topley y Wilson's, 1999). Los huevos se encuentran en los proglótidos que salen con las heces, generalmente en cadenas de 4 a 5 segmentos. Puede ocurrir la ingestión completa de los mismos por cerdos o perros coprófagos o tener lugar su destrucción por putrefacción de la envoltura, con la consiguiente liberación de los huevos al medio ambiente, donde contaminan el agua y los alimentos que ingieren los huéspedes intermediarios, en este caso el ganado vacuno. (Boone I., *et al.*, 2007). En el tracto digestivo las oncósferas son liberadas por acción digestiva; una vez libres atraviesan la pared del intestino por vía sanguínea o linfática se dispersan prácticamente por todo por el organismo en donde se transforman en cisticercos después de tres meses. Invaden en especial el tejido muscular estriado, particularmente los músculos maseteros, corazón, lengua, espalda, diafragma e intercostales. En menor grado ocupan el esófago, la grasa del hígado, pulmones, los ganglios linfáticos y el tejido celular subcutáneo, dando

origen a la cisticercosis bovina. A esta forma enquistada se la ha llamado tradicionalmente *Cysticercus bovis* o inermis.

### **Cisticerco o metacéstodo**

El cisticerco o metacéstodo es la fase larvaria de las tenias. Dichos cisticercos se encuentran principalmente invaginado como un gránulo sólido blanquecino con una pared translúcida y llena de líquido a través de la cual se puede observar el escólex (Escobar, 1983). La pared de la vesícula es una estructura membranosa compuesta de tres capas, cuticular o externa, celular o media y reticular o interna (Del Brutto *et al.*, 1993). Puesto que los céstodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumentaria. Los cisticercos utilizan rutas metabólicas aeróbicas y anaeróbicas, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el ambiente.

### **Ciclo de vida de la *Taenia saginata***

Las enfermedades humanas debidas a céstodos son generalmente poco patógenas, salvo casos de cestodiosis larvaria, como la cisticercosis producida por

*Taenia solium* y la hidatidosis ocasionada por *Echinococcus granulosus*. En esta sección se revisarán aspectos de interés de estos parásitos con especial mención a las características de *Taenia saginata*.

El ciclo vital de *T. saginata*, la tenia del ganado vacuno, es parecido al de *T. solium*, la infección es el resultado de la ingestión de cisticercos a partir de carne de vacuno poco cocida, tras salir del quiste, las larvas se desarrollan hacia el estado adulto en el intestino delgado e inician la producción de huevos en los proglótidos maduros. El gusano adulto puede parasitar el yeyuno y el intestino delgado del ser humano durante un período de hasta 25 años y llegar a medir 10 metros. Afecta el músculo estriado del ganado y es causado por el metacéstodo conocido como *Cysticercus bovis*, forma larvaria de la *T. saginata*



que se encuentra en el intestino delgado del humano (Abuseir *et al.*, 2007, Wanzala *et al.*, 2003b).

En contraste con las infecciones por *T. solium*, en el ser humano no se produce cisticercosis por *T. saginata*. El gusano adulto de *T. saginata* difiere también de *T. solium* como consecuencia de la ausencia de la corona de ganchos en el escólex y una estructura diferente de las ramas uterinas de los proglótidos. Estas características son importantes para diferenciar las dos formas básicas de infestación por céstodos. Como en todos los céstodos, la forma adulta es un gusano segmentado que nace del escólex o cabeza, fijada por 4 poderosas ventosas, del escólex sigue la porción germinal o cuello, a partir del cual se desarrolla el estróbilo o cadena de proglótidos, nombre con el que se designa a cada uno de los segmentos que la forman. A medida que estos proglótidos se alejan del escólex se desarrollan en cada uno de ellos ambos aparatos genitales, el masculino y el femenino, ya que son individuos hermafroditas. Pueden tener fecundación cruzada, más común la autofecundación son hermafroditas. Tras la autofecundación, el aparato genital masculino se atrofia y se desarrollan los huevos o embrióforos dentro del útero, que ocupa prácticamente todo el interior de los proglótidos, los que al desprenderse del estróbilo en pequeñas cadenas, salen al exterior junto con las heces del hospedador o a través de su propia acción motriz, lo que les permite atravesar el esfínter anal, característica que no tiene *T. solium*, que además es más corta y delgada. De esta manera, los segmentos de la tenia suelen ser vistos en la materia fecal o aparecer adheridos en la ropa interior. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Los huevos se encuentran en los proglótidos que salen con las heces, generalmente en cadenas de 4 a 5 segmentos. Puede ocurrir la ingestión completa de los mismos por cerdos o perros coprófagos o tener lugar su destrucción por putrefacción de la envoltura, con la consiguiente liberación de los huevos al medio ambiente, donde contaminan el agua y los alimentos que ingieren los huéspedes intermediarios, en este caso el ganado vacuno. (Boone *et al.*, 2007). En el tracto digestivo las oncósferas son liberadas por acción

digestiva; una vez libres atraviesan la pared del intestino por vía sanguínea o linfática se dispersan prácticamente por todo por el organismo, en donde se transforman en cisticercos después de tres meses. Invaden en especial el tejido muscular estriado, particularmente los músculos maseteros, corazón, lengua, espalda, diafragma e intercostales. En menor grado ocupan el esófago, la grasa del hígado, pulmones, los ganglios linfáticos y el tejido celular subcutáneo, dando origen a la cisticercosis bovina. A esta forma enquistada se la ha llamado tradicionalmente *Cysticercus bovis* o inermis.

Cuando los cisticercos viables, metacéstodos o formas larvales o intermedias son ingeridos por el ser humano con la carne u otros tejidos que se consumen crudos o mal cocidos, el protoscolex que contienen sale de su envoltura, evagina y se fija a la pared intestinal, dando origen al parásito adulto para después de un período de tres meses ocurra la eliminación de proglótidos grávidos o periodo prepatente (Quiroz, 2002).

### **Importancia Zoonótica de *Taenia saginata***

Desafortunadamente, la importancia zoonótica por la parasitosis de *Taenia saginata* no es considerada prioritaria por el Sector Salud de Baja California debido a su poca o casi nula manifestación en el humano que es el huésped definitivo y puede no presentar ningún signo o síntoma de esta parasitosis.

La importancia que tiene su presencia en el humano es que se convierte en su reservorio natural, manteniendo la expulsión de los proglótidos grávidos por vía rectal y la liberación de huevos fértiles de la tenia, favoreciendo con esto la dispersión del parásito con el riesgo de ser consumido por el ganado bovino, cerrando el ciclo biológico de la Tenia. La importancia real de la parasitosis por *T. saginata* es en el sector económico ya que la presencia de su fase larvaria el *Cisticercus bovis* causa pérdidas en el sector ganadero mundial, que pueden alcanzar de los mil a dos mil millones de dólares anuales. (Wanzala et al., 2003).

### **Epidemiología de la *Taenia saginata***

La *Taenia saginata* es un parásito platelminto de la clase *céstodo*, cuyas formas adultas viven en las primeras porciones del Intestino delgado del ser humano, donde alcanzan normalmente de 2 a 5 m y pueden llegar hasta los 10 - 12 m de longitud aunque se tienen reportes de parásitos de hasta 25 metros, en donde producen la enfermedad llamada teniosis y cuya fase intermedia, la cisticercosis, transcurre en el ganado vacuno en la que produce una infección generalmente asintomática localizada en la musculatura del animal (OPS/OMS, 2003).

En su fase adulta viven en las primeras porciones del intestino delgado a más de 40-50 cm de la unión duodeno-yeyunal del humano. La localización en el huésped intermediario es principalmente la musculatura estriada, particularmente miocardio, músculos pterigoideos, intercostales, la lengua y los músculos maseteros. Presenta una cabeza llamada escólex, de forma cuadrangular con cuatro ventosas inermes sin ganchos (róstelo). El adulto puede llegar a tener unos 2,000 proglótidos. Los proglótidos grávidos son más largos que anchos y con el doble de testículos que él de *T. solium* y un ovario bilobulado. Pueden existir hasta 100,000 huevos por anillo. Algunos proglótidos grávidos pueden migrar al ano durante el día, cuando el hospedero está más activo. Su forma larvaria es un cisticerco llamado *Cysticercus bovis*. Los huevos son redondos o ligeramente ovalados de 31 a 43  $\mu\text{m}$  de color amarillo parduzco; presentan un embrión hexácanto con seis ganchos, no se diferencian de los de *T. solium*. Los huevos de la *T. saginata* pueden mantenerse viables por varias semanas o meses en el ambiente (Ilsoe *et al.*, 1990), de 5 a 6 meses en los campos de pastoreo en verano y en los inviernos crudos a  $-30^{\circ}\text{C}$  viven hasta 16 días. En el heno mueren en unas 10 semanas, resisten en el ensilado de 70-90 días y a temperaturas de 40 a  $50^{\circ}\text{C}$  a los 37 días dejan de ser infectantes (Boch & Supperer 1988). Los huevos pueden permanecer viables durante algunas semanas en aguas residuales, en ríos o en el pasto (Abunna *et al.*, 2008, Scandrett *et al.*, 2009). Pueden vivir en ambientes extremos húmedos pero no resisten altas temperaturas (Barriga, 2002).

Los proglotis grávidos repletos de huevos son expulsados y llegan al suelo, donde son ingeridos por el huésped intermediario, generalmente un bovino, el huevo llega al estómago y los jugos gástricos del estómago del animal rompen la sustancia cementante. Ya en el intestino, las oncósferas se activan y emergen presentando vesículas secretoras de sustancias líticas que le ayudan a atravesar la pared intestinal, diseminándose así por vía sanguínea para dar origen al estadio de postoncósfera. A través del torrente circulatorio llegará a los órganos internos mejor irrigados corazón y a los músculos. Los sitios de elección son los maseteros, patas y lomos.

Una vez en la musculatura, pasarán entre 7 y 10 semanas hasta el desarrollo del cisticerco, que es una forma larvaria vesicular con un escólex invaginado. Los bovinos se pueden infectar de distintas maneras. En los terneros la infección puede ocurrir cuando son manejados por personal que aloja *T. saginata* en su intestino o bien, por huevecillos dispersados huevos por el pasto. En Gran Bretaña y Australia se han descrito brotes de cisticercosis bovina, lo que se ha asociado con el uso de aguas residuales humanas para el abonado de campos (Urquhart *et al.*, 2001). En los Estados Unidos se han registrado brotes de cisticercosis en corrales de engorda debido a que los trabajadores infectados defecaban en los silos, canales de irrigación y campos de pastoreo (Soulsby, 1987).

Una vez ingeridos, 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 maseteros, corazón, diafragma y lengua, aunque los cisticercos normalmente 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).

En general la longevidad de los cisticercos depende del grado de infección y de la edad del animal en el momento de la infección. Una parte de

los cisticercos pueden mantener su viabilidad por un periodo prolongado, quizás el tiempo de vida del hospedador. El control de las cestodiosis larvales debe incluir acciones que intervengan sobre varios puntos del ciclo de vida de la *T. saginata*. Esto requiere un acercamiento coordinado entre todos los interesados, tales como consumidores, ganaderos, médicos veterinarios inspectores, médicos humanos, farmacéuticos, directores de plantas de tratamientos de aguas residuales y médicos veterinarios de campo, para buscar reducir las pérdidas económicas por decomisos y la infección humana (Barriga, 2002; Kyvsgaard & Murrell, 2005).

Según la Organización Mundial de Salud (OPS/OMS, 2003), la prevención y el control de la infección por la *T. saginata* deben estar basados en tres puntos principales: control veterinario y médico, educación higiénico-sanitaria de la población y control y mejora de las redes de saneamiento (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El control veterinario y médico de la salud pública exige la más estricta inspección sanitaria en los mataderos. Son esenciales las medidas higiénicas, controlando las explotaciones y en las que se detecten cisticercos, realizar diagnóstico de la infección en el hombre. La inspección veterinaria es una importante medida profiláctica y junto con la esterilización por frío ofrece un excelente medio de control a nivel de matadero. Las canales deberán mantenerse a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 10-15 días, tiempo suficiente para destruir los cisticercos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999, Urquhart *et al.*, 2001, Barriga, 2002).

La educación higiénico-sanitaria en las poblaciones es indispensable para evitar la infección de los bovinos y que las personas tengan el hábito de no dispersar sus heces y de utilizar letrinas. Un buen medio de educación higiénico-sanitaria es la escuela y el desarrollo de cursos para ganaderos y personal de plantas de sacrificio (Boch & Supperer, 1988, Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Los contenidos específicos a impartir deben incluir el conocimiento de la enfermedad, el conocimiento de que se transmite por consumo de carne infectada con cisticercos y el conocimiento de las acciones de prevención que puede efectuar uno mismo, como la cocción de la carne a  $70^{\circ}\text{C}$  (Barriga, 2002).

Otras medidas higiénico-sanitarias incluyen el control y mejora de las redes de saneamiento, mediante la mejora de las redes de alcantarillado. El tratamiento de aguas residuales inactiva la mayoría de los huevos de las tenias (Cabaret *et al.*, 2002) y posteriormente estas aguas pueden ser aplicadas sobre las pasturas, reduciendo el riesgo de infección del ganado. Por otra parte, los sistemas de tratamiento de aguas residuales incrementan el uso de detergentes que interfieren con la sedimentación, descomposición y procesos de oxidación, que permiten que los huevos pasen libremente a través de la corriente de desagüe (Kyvsgaard & Murrell, 2005; Scandrett *et al.*, 2009). La protección de las zonas de pastoreo, del agua potable y los tratamientos preventivos administrando tenífugos al hombre son medidas profilácticas adecuadas (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Cabe destacar, por último, que los enfermos con teniosis son el origen de la cisticercosis bovina (*T. saginata*), porcina y humana (*T. solium*) (Topley y Wilson's, 1999).

### **Respuesta inmune humoral**

Las inmunoglobulinas presentes en concentraciones apropiadas son suficientemente eficaces para proporcionar protección contra los parásitos transportados por sangre. Una cualidad sólida de la respuesta inmunitaria contra las infecciones helmínticas es la eosinofilia y el nivel elevado de IgE generados. En seres humanos pueden verse elevaciones séricas considerables en la concentración de IgE. Estos cambios tienen todas las características distintivas de una respuesta ante las citocinas tipo Th2 y es notable que en los animales infectados por helmintos, la inyección de anti IL-4 disminuye en gran medida la producción de IgE y la de anti IL-5 suprime la eosinofilia. Un aumento considerable de IgE indica que esta inmunoglobulina representa una línea importante de defensa contra este tipo de parásitos (Kyngdon *et al.*, 2006).

### **Inmunidad Celular**

Muchos parásitos se han adaptado a la vida dentro del macrófago a pesar de los poderosos componentes microbicidas propios de esta célula

inmunitaria, entre los que se incluye el óxido nítrico. De lo anterior, el sistema inmunitario debe acudir finalmente a los linfocitos T productores de citocinas que desempeñan un papel crucial para estimular a los macrófagos para ejercer su potencial como primera línea de destrucción de agentes extraños y así eliminar al parásito no deseado. Los antígenos de los helmintos estimulan de manera preferente la activación de los linfocitos de tipo Th2. Esto determina entonces un patrón de secreción de citoquinas IL4, IL5 e IL10, entre otras, que estimulan la proliferación de células B y la secreción de inmunoglobulinas. Si bien los anticuerpos de los isotipos IgM, IgG e IgA se producen en respuesta a los antígenos de los helmintos, el isotipo IgE es el que participa con mayor intensidad. La combinación de los antígenos helmínticos con la IgE produce la degranulación de los mastocitos con liberación de agentes vasoactivos, produciendo aumento de permeabilidad vascular y estímulo de la contracción del músculo liso, favoreciendo los mecanismos de expulsión (Lightowlers, 2010).

Además de los macrófagos, las plaquetas y los eosinófilos tienen receptores que permiten su unión a las IgE unidas a los parásitos. Estas células se activan aumentando sus niveles de enzimas líticas, metabolitos reactivos del oxígeno, leucotrienos y prostaglandinas produciendo un efecto que aumenta la destrucción de los parásitos. Los eosinófilos son atraídos hacia los sitios invadidos por helmintos a través de la acción de agentes quimiotácticos. Estas sustancias también estimulan la liberación de eosinófilos a la circulación sistémica. Por ello las infecciones por helmintos se relacionan con los signos característicos de hipersensibilidad de tipo I: eosinofilia, edema, asma y urticaria. Los antígenos de los helmintos, estimulan de manera preferente la activación de linfocitos de tipo Th2 (Lightowlers, 2003).

### **Diagnóstico parasitológico de teniosis**

Debido a la baja sensibilidad de los métodos de detección de teniosis que se emplean habitualmente, se deben utilizar varios criterios diagnósticos conjuntamente para tratar de conseguir un diagnóstico certero. El diagnóstico

de las teniosis se fundamenta en el hallazgo y diferenciación de proglotidos grávidos. Con respecto al hallazgo, éste se puede hacer mediante tamizaje de heces, método de Graham o por encuentro casual de proglotidos en las heces del paciente, o por su presencia en ropa interior o de cama en el caso de *T. saginata* (movimiento activo). En relación con la diferenciación de los dos grandes ténidos del hombre, los proglotidos con menos de 15 ramas uterinas corresponden a *T. solium*, mientras que las de *T. saginata* presentan más de 15 ramas. Se han empleado diferentes métodos de tinción, tinta china, hematoxilina-eosina y otros, pero muchas veces los proglotidos están en mal estado por lo que la identificación morfológica específica es difícil (Mayta *et al.*, 2000; González *et al.*, 2000).

En ocasiones, después del tratamiento, los pacientes eliminan el escólex del adulto, el cual es fácilmente identificable por la presencia o ausencia de ganchos, además, las propiedades distintas de los proglotidos maduros pueden ayudar al diagnóstico por especie, en caso de que se aislen. Por otra parte, la observación microscópica de huevos, tras examen directo de heces, de Kato o previa concentración, ya sea por sedimentación o flotación, para separar las formas parasitarias de la materia fecal por medio de sus densidades específicas, sólo puede indicar teniosis, pero no sirve para determinar si la enfermedad está producida por *T. solium* o *T. saginata*, dado que morfológicamente los huevos son indistinguibles. Todos estos métodos parasitológicos que solamente detectan huevos se caracterizan por exhibir baja sensibilidad y especificidad (Allan *et al.*, 2003).

### **Sistemas de diagnóstico serológico para cisticercosis**

Las pruebas serológicas son ampliamente utilizadas para detectar la exposición o presencia de un agente patógeno a través de la medición y evaluación de respuesta inmune de un individuo. El valor de una prueba serológica se mide en función de su sensibilidad y especificidad; donde la sensibilidad, es la proporción de sujetos con un resultado positivo en la prueba que realmente están infectados y la especificidad, es la proporción de sujetos



con un resultado negativo en la prueba que no están infectados (Crump et al., 2004).

Desde hace décadas, se cuenta con distintas plataformas de diagnóstico serológico para cisticercosis humana basadas en sistemas que detectan anticuerpos producidos contra las proteínas nativas o antígenos circulantes del parásito. La eficiencia de los sistemas ELISA para la detección de anticuerpos empleando antígenos frescos provenientes del fluido de cisticercos ha mostrado niveles de sensibilidad del 100% y especificidad de 96.7% (Bueno *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2000). Asimismo, existen sistemas ELISA basados en la captura de antígeno circulante utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las glucoproteínas de superficie de cisticercos de *T. saginata*. Este sistema reconoce una región común para *Taenia solium* y *Taenia saginata* y ha sido detectado en muestras de pacientes humanos con neurocisticercosis. Esta prueba ha sido exitosamente evaluada en muestras de suero y de líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con neurocisticercosis, mostrando niveles de sensibilidad de 84.8% y especificidad del 94% (Fleury *et al.*, 2007).

Es importante resaltar que los estudios sobre el uso de sistemas ELISA para el diagnóstico de cisticercosis en animales domésticos son muy limitados y en su mayoría están enfocados al desarrollo de pruebas de diagnóstico para detectar la presencia de *Cysticercus cellulosae* en cerdos. Los reportes disponibles se han realizado en su mayoría en áreas endémicas de cisticercosis porcina, donde las técnicas de diagnóstico serológico para detectar anticuerpos o antígenos circulantes son utilizadas únicamente con fines de investigación más que para el diagnóstico, análisis y control de la enfermedad (Sato et al., 2003; Aluja y Villalobos 2000). En algunos de esos estudios se reporta la utilización de antígenos desarrollados a partir de extractos crudos de cisticercos vesiculares, escólex larvarios o fluido vesicular, con resultados variables en su habilidad para detectar animales infestados y discriminar de animales con otros parásitos relacionados, pero que significan una alternativa para el diagnóstico temprano de cisticercosis en sistemas de producción porcina de áreas endémicas. (Soares *et al.*, 2006).

La mayoría de los sistemas ELISA que detectan anticuerpos IgG para el diagnóstico de cisticercosis porcina, utilizan como antígeno de prueba fluido vesicular de cisticerco o extracto crudo homogenizado de *Taenia solium* o *Taenia crassiceps* (Nunez *et al.*, 2000). Cuando se utilizan antígenos de productos de excreción/secreción para el diagnóstico de cisticercosis, las pruebas muestran un 87.5% de sensibilidad y un 100% de especificidad en sueros de cerdos infectados naturalmente (Soares *et al.*, 2006). Asimismo, la detección de cisticercos viables en un animal se puede lograr a partir del uso de sistemas ELISA que capturan antígenos circulantes utilizando anticuerpos monoclonales tipo IgM, siendo capaz de detectar *Cisticerco celuloso* viable a partir de muestras de suero (Espíndola *et al.*, 2005).

No obstante la disponibilidad de plataformas y reactivos para el diagnóstico de cisticercosis en humanos, son muy pocas las aplicaciones prácticas de las pruebas de diagnóstico serológico para cisticercosis en especies animales, debido principalmente al costo inherente de los reactivos como resultado de la dificultad de producir antígenos provenientes de parásitos frescos o la disponibilidad de anticuerpos monoclonales capaces de ser adaptados a sistemas de captura de antígenos circulantes para grandes números de muestras.

### **Diagnóstico molecular de teniasis/cisticercosis**

Para el diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata* se han utilizado técnicas de biología molecular tales como sondas de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la década de 1990, se logró la clonación de dos sondas de DNA no codificante llamadas HDP1 y HDP2 producidas a partir de una biblioteca genómica de *T. saginata*, permitiendo la identificación diferencial de los dos grandes tenidos del hombre (Harrison *et al.*, 1990). Para 1995, se clonaron las sondas pTsol-9 y pTsag-16, específicas de *T. solium* y *T. saginata* respectivamente y que lograron distinguir los dos tenidos (Chapman *et al.*, 1995). Posteriormente otros grupos optimizaron sistemas PCR que

diferenciaban *T. saginata* de *T. saginata asiática* (Zarlenga *et al.*, 1991; Bowles y McManus, 1994).

Posteriormente, a partir de la secuencia de la sonda HDP2 (Harrison *et al.*, 1990), se diseñó un sistema PCR múltiple que permitió la realización de un procedimiento de diagnóstico diferencial específico para *T. solium* y *T. saginata*. (González *et al.*, 2000; González *et al.*, 2002a). Este sistema PCR fue utilizado para la identificación de aislados de tenidos procedentes de distintas zonas geográficas (González *et al.*, 2002b). De igual forma, se desarrolló un sistema para diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata* mediante un sistema de restricción de la longitud del fragmento polimórfico (PCR-RFLP) de ambos parásitos, basada en la amplificación del gen 5.8S ribosomal. En ese período se desarrolló también un sistema PCR-RFLP que amplifica la secuencia 12S ribosomal del DNA mitocondrial que distingue *T. solium* de *T. saginata* (Rodríguez-Hidalgo *et al.*, 2002).

Durante los últimos años, la técnica PCR no sólo ha sido empleada en la detección de infecciones producidas por *T. saginata* y *T. solium* sino también en el estudio de la variabilidad génica inter-especie e intra-especie en distintos aislados de ambos parásitos procedentes de diferentes zonas geográficas. En este sentido, se han realizado estudios filogenéticos utilizando distintas técnicas moleculares que además de identificar los tenidos por especie, han demostrado a través del análisis de los genes mitocondriales, que *T. solium* y *T. saginata* forman dos grupos filogenéticos distintos, uno constituido por los aislados americanos y africanos y otro por los asiáticos (Nakao *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2003; Yamasaki *et al.*, 2004).

### **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

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

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  $2.5 \times 10^8$  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 control positivo 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 (IIB-UNAM). 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

- A Chapman, V Vallejo, K G Mossie, D Ortiz, N Agabian and A Flisser Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J. Clin. Microbiol.* May 1995 vol. 33 no. 5 1283-1288.
- A Ito, Wandra, T., Yamasaki, H., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., & Lightowlers, M. W. (2004). Cysticercosis/taeniasis in Asia and the Pacific. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(2), 95-107.
- Abunna F, G Tilahun, B Megersa, A Regassa, B Kumsa. 2008. Bovine cysticercosis in cattle slaughtered at Awassa municipal abattoir, Ethiopia: prevalence, cyst viability, distribution and its public health implication. *Zoon Public Health* 55, 82-88.
- Abuseir S, M Kühne, T Schnieder, G Klein, C Epe Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples *Parasitology research* Volume 101, Issue 1, pp 131-137, 2007.
- Adalid-Peralta L, A. Fleury\*, T. Garcia, M. Hernandez, M. Parkhouse, J.C. Crispin, Boone, E. Thys, T. Marcotty, J. de Borchgrave, E. Ducheyne, P.Dorny. Distribution and risk factors of bovine cysticercosis in Belgian dairy and mixed herds *Preventive Veterinary Medicine* Volume 82 November 2007: 1–11.
- C del Campillo, RV Miguel, F Antonio *Parasitología veterinaria*, Madrid, Ed. McGraw-Hill Interamericana. 1999.
- Cerebral cysticercosis mimicking rabies in a dog *Veterinary Record* 2003; 153:10 304-305doi:10.1136/vr.153.10.304.
- Cheng T. *Parasitología general*. 2da ed. Editorial A. C. Madrid, España. pp 963 1978.
- Del Brutto OH, NEUROCISTICERCOSIS *Revista Hondureña de Neurociencia*, 1999.

- E. C Bueno, Snege, M., Vaz, A. J., and Leser, P. G. (2001): Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 1140-4.
- Fan P.C, C.Y. Lin, C.C. Chen and W.C. Chung. Morphological description of *Taenia saginata asiatica*\_(*Cyclophyllidea: Taeniidae*) from man in Asia *Journal of Helminthology* Volume 69 / Issue 04 / December 1995, pp 299-303.
- Flisser A, R. Rodriguez-Canul, A. Willingham III., Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments *Veterinary Parasitology* 139 (2006) 283–292.
- Flütsch F, Heinzmann D, Mathis A, Hertzberg H, Stephan R, Deplazez P. 2008. Case control study to identify risk factors for bovine cysticercosis on farms in Switzerland. *Parasitol.* 135(5): 641-646.
- Heath DD. The chemical removal of embryonic blocks from eggs of *Taenia ovis* and *Taenia hydatigena*. *Advances in Parasitology*, 21 (1982), pp. 229–296
- Hoberg E. ***Taenia*** tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection*, 4: 859-866.E, 2002.
- J Bowles, McManus DP Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1994, 50(1):33-44.
- J. Voltaire, G. Cardenas, G. Fragoso, and E. Sciutto. Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory t Cells and their recruitment in the central nervous system. *J. Parasitol.*, 98(1), 2012, pp. 142-148.
- Jeon HK, Kim KH, Eom KS. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Taenia saginata*: comparison with *T. solium* and *T. asiatica*. *Parasitol Int.* 2007;56: 243–246.
- Kyngdon, C.T. G. Gauci, a. E. Gonzalez, a. Flisser, a. Zoli, a. J. Read, j. Martínez-Ocaña, A. Strugnell and W. Lightowlers. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A Issue *Parasite Immunology* Volume 28, Issue 5, pages 191–199, 2006.



- L. M. Gonzalez, Montero, E., Harrison, L. J., Parkhouse, R. M., and Garate, T. (2000): differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 38, 737-44.
- M W Lightowlers, Erradication of *Taenia solium* cysticercosis: A role for vaccination of pigs *International Journal for Parasitology* Volume 40, Issue 10, 15 August 2010: 1183–1192.
- M.W Lightowlers, C.G Gauci, C Chow, D.R Drew, S.M Gauci, D.D Heath, D.C Jackson, D.L Dudley-Moore, A.J Read. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites *International Journal for Parasitology* Volume 33, Issue 11, 2003: 1207–1217.
- N. M.Espindola, Iha, A. H., Fernandes, I., Takayanagui, O. M., Machado Ldos, R., Livramento, J. A., Mendes Maia, A. A., Peralta, J. M., and Vaz, A. J. (2005): Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J Clin Microbiol* 43, 3178-84.
- O Barriga, 2002. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Santiago, Chile: Ed. Germinal. 260 p.
- OIE. (2003). Manual OIE sobre animales terrestres. Sección 2.10. Enfermedades no consideradas en la lista A y B1. Capítulo 2.10.1. Cisticercosis.
- Pawlowski Z.S. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bull. WHO*, 67 (1989), pp. 401–407.
- Protein expression in insect and mammalian cells *Nature Biotechnology* 23, 567 - 575 (2005) Published online: 5 May 2005 | doi: 10.1038/nbt1095.
- Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos Ed. Limusa 1999. Mexico.
- R.Rodriguez-Hidalgo, Allan, J. C., Fletes, C., Sutisna, I. P., Kapti, I. N., and Craig, P. S. (1997): Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and

crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 4, 579-82.

Suja M. S, A. Mahadevan, S. N. Madhusudana, S. K. Vijayasarathy, S. K Shankar, T. A Kost, J P. Condreay, Donald L Jarvis. Baculovirus as versatile vectors for Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, 9th ed., vol. 5. Arnold, London, United Kingdom, 1999.

Soares, V.E., M A De Andrade Belo, P C B Rezende, V T Soccol, R T Fukuda, A J Da Costa Distribution of *Taenia saginata* metacestodes: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection results in experimentally infected calves Volume 105, Issue 5 (July 2011), pp. 393-401.

Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, 2010; 137:335-346.

Zaccone, O. Burton, and A. Cooke. 2008. Interplay of parasite driven immune responses and autoimmunity. *Trends in Parasitology*. 24: 35–42.

## EXPERIMENTO I

Artículo:

Prevalence of *Taenia saginata* Larvae (*Cysticercus bovis*) in Feedlot Cattle Slaughtered in a Federal Inspection Type Abattoir in Northwest México

Sergio Arturo Cueto González, José Luis Rodríguez Castillo, Gilberto López Valencia, Rosa María Bermúdez Hurtado, Erika Selene Hernández Robles and Francisco Javier Monge Navarro(1)

(1) Corresponding Author

Artículo enviado a: **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**

Fecha de publicación: May 2015, 12(5): 462-465.



**Prevalence of *Taenia saginata* Larvae (*Cysticercus bovis*) in Feedlot Cattle Slaughtered in a Federal Inspection Type Abattoir in Northwest México**

Cueto González Sergio Arturo, Rodríguez Castillo José Luis, López Valencia Gilberto, Bermúdez Hurtado Rosa María, Hernández Robles Erika Selene, and Monge Navarro Francisco Javier. *Foodborne Pathogens and Disease*. May 2015, 12(5): 462-465. doi:10.1089/fpd.2014.1899.

**Published in** Volume: 12 Issue 5: April 30, 2015

**Online Ahead of Print:** March 24, 2015

Cuerpo Académico en Diagnóstico de Enfermedades, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México.

Address correspondence to:

*Francisco Javier Monge Navarro, PhD*

*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, C.P. 21386,*

*México*

*E-mail: [fmonge@uabc.edu.mx](mailto:fmonge@uabc.edu.mx)*

Prevalence of *Taenia saginata* larvae (*Cysticercus bovis*) in feedlot cattle slaughtered in a federal inspection type abattoir in northwest México

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

(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 prevalence of bovine cysticercosis was established using routine post-mortem inspection of 52,322 feedlot cattle slaughtered at one Federal Inspection Type abattoir (TIF 301) located in the Mexicali Valley in Baja California, Mexico. The study included 31,393 animals (60.0%) purchased and transported to Baja California from stocker operations located in 17 states of Mexico and 20,929 animals (40.0%) native to Baja California. A total of 208 carcasses showed lesions suggestive of cysticercosis and 109 were confirmed as positive for the parasite with a prevalence of 0.21%, equivalent to 2.1 cases/1000 carcasses inspected, 2.8 cases/1000 carcasses for cattle purchased in other states and 1.0 cases/1000 carcasses for cattle native from Baja California. The post mortem inspection at TIF 301 produced a sensitivity of 52.40%, specificity of 50%, with positive predictive value of 52.4% and negative predictive value of 50%. Prevalence of cysticercosis was 2.8 times higher in cattle from other states compared with those native

from Baja California. Cysticerci were most frequently found in the heart, followed by liver and masseter muscles. In cattle from other states, 96.6% of cysticerci were classified as calcified and <4% as viable; in cattle native from Baja California, 29% of cysticerci were classified as calcified and 71% as viable. The prevalence of bovine cysticercosis established at TIF 301 resulted 28% lower than a previous report for Baja California, however; given the sensitivity of the post-mortem inspection calculated between 10 and 50%, it is possible that an undetermined number of carcasses pass as being free of cysticerci and the meat reached both domestic and international wholesale markets, increasing the possibility of human infection and causes substantial economic loss through condemnation of infected meat and trade restrictions for endemic regions.

**Key words:** *Taenia saginata*, bovine cysticercosis, post-mortem inspection, prevalence, feedlot cattle.

## **Introduction**

Bovine cysticercosis is caused by *Cysticercus bovis* (*C. bovis*), the larval stage of *Taenia saginata*. Cattle become infected by consuming food or water contaminated with eggs from adult parasites infecting the small intestine of humans. Humans become infected by ingesting raw or undercooked meat from cattle infected with viable cysticerci (Abuseir et al., 2007; Ogunremi and Benjamin, 2010). Bovine cysticercosis is also a cause of major economic losses to the livestock industry due to the condemnation of infected carcasses (Regassa et al., 2009; Wanzala et al., 2003). Worldwide, diagnosis of bovine cysticercosis is made through post-mortem inspection of carcasses. In Mexico, inspection of meat is regulated by federal code NOM-009-ZOO-1994, which consists of a series of partial cuts in the heart, masseters, tongue, liver and diaphragm, sites where cysticerci is more often localized (Wanzala et al., 2003). The northwest economical region of Mexico includes the states of Baja California, Baja California Sur, Sonora and Chihuahua. During 2010, these four states sent to slaughter a total of 997,800 heads of cattle, from which Baja California contributes with 337,560 animals (34%). Approximately 320,000 heads of cattle are purchased each year and transported by trucking companies to Baja California from yearling/stocker operations in the states of

Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas. The cattle are housed in the Mexicali Valley among 32 intensive animal feeding operation feedlots, where they were fed for an average of 120 days with high energy rations. After feedlot, finished cattle are sent to slaughter, cut and pack at any of four certified Mexican Federal Inspection Type (TIF) and United States Department of Agriculture (USDA) approved slaughterhouses named TIF 54, TIF 120, TIF 301 and TIF 511. In 2009, meat production in the Mexicali Valley was 98,000 tons, accounting 95% of the total production for the state of Baja California. The same year, slaughterhouse TIF 301 sent to slaughter 82,800 animals, contributing with 28% of Baja California's total meat production in that period. The objective of this study was to establish the prevalence of *C. bovis* through post-mortem inspection of carcasses in feedlot cattle slaughtered in TIF 301, a Federal Inspection Type abattoir located in the Mexicali Valley in the state of Baja California, northwest México.

### **Materials and methods**

The study was conducted in the Mexicali Valley, state of Baja California in northwest Mexico, between October 2008 and July 2009, in a Federal Inspection Type (TIF 305) slaughterhouse. The post-mortem inspection of carcasses was performed in all animals sent to slaughter during the study period by federal certified veterinarians (FCV). A total of 52,322 carcasses were inspected by post-mortem examination seeking to identify any cyst lesion found in the heart, tongue, masseters, liver, lungs or muscular mass. Those lesions were considered as suggestive to cysticercosis according to federal code NOM-009-ZOO-1994. Tissue sections of 3 to 6 cubic centimeters (1 to 2 cubic inches) containing lesions suggestive of cysticercosis were identified and sent to the laboratory for diagnostic confirmation. The identification of *C. bovis* was performed using stereoscopic microscopy by qualified personnel from the Laboratory of Parasitology at the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) at Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Viable (live) cysticerci were classified as immature when cysts lacked an evident protoscolex and as mature when the cyst presented an evident protoscolex. Cysticerci were also classified as calcified when cysts

appear as a colloid, caseous or as a solid mass, depending on the degree of mineralization (Abuseir et al., 2006; Minozzo et al., 2002). The prevalence of cysticercosis was calculated by dividing the total number of carcasses with a positive diagnosis of cysticercosis by the total number of carcasses inspected. Odds Ratio (OR) was calculated with a confidence interval (CI) of 95%. Also,  $\chi^2$  was calculated to establish statistical association between positive cases of carcasses of cattle introduced from other states of Mexico and cattle native to Baja California.

## Results

A total of 52,322 cattle were slaughtered and inspected at slaughterhouse TIF 301 located in the municipality of Mexicali, Baja California, México, including 31,393 (60%) animals purchased from 17 states of Mexico and 20,929 (40%) cattle native to Baja California. FCV detected 208 carcasses with lesions suggestive of cysticercosis from which 109 were found to be positive for cysticercosis after morphological identification of the parasite using stereoscopic microscopy. The overall prevalence of bovine cysticercosis was established in 0.21% (109/52,322) equivalent to 2.1 carcasses positive per 1,000 animals. The post mortem inspection performed at TIF 301 in this study produced a sensitivity of 52.40% (95% CI: 45.38% to 59.35%), specificity of 50% (95% CI: 42.83% to 57.17%), positive predictive value of 52.40 (95% CI: 45.38% to 59.35%), negative predictive value of 50.0% (95% CI: 42.83% to 57.17%). The prevalence obtained in this study is 28% lower than the only available survey of bovine cysticercosis for the state of Baja California, reporting a prevalence of 0.29% in Tijuana (Quiróz-Romero, 2005). Our results are also comparable with those reported for bovine cysticercosis in some European countries such as Spain, with a prevalence range of 0.007 to 0.1%, Belgium, 0.03 to 0.2%; Italy, 0.02 to 2.4%; Denmark, 0.1 to 0.7%; Germany, 0.4 to 0.8% and The Netherlands, with 1.8 to 2.2% (Eichenberger, Stephan, and Deplazes, 2011). For cattle purchased from other states of México, the prevalence was 0.28% (88/31,384), equivalent to 2.8 carcasses positive per 1,000 animals. For cattle native to Baja California, the prevalence was 0.10 (21/20,929), equivalent to 1.0 carcass positive per 1,000 animals. The results show 2.8 times more cases positive for bovine cysticercosis in cattle purchased from other states of México compared to positive cases



of cattle native to Baja California (OR = 2.8, 95%; CI 1.71 - 4.66; P <0.0001) (Table 1.). The organ with the most frequent finding of *C. bovis* was the heart with 93 cases, from which 14 were viable and 74 were calcified cysticerci, followed by the liver with 8 cases, with 2 viable and 6 calcified cysticerci, and masseter muscles with 8 cases, with 2 viable and 6 calcified cysticerci. No cysticerci, viable or calcified, were detected in the tongue.

## **Discussion**

Our findings suggest the presence of *Taenia saginata* in the human population working in the feedlot cattle production systems of the Mexicali Valley, which implies a public health problem that needs to be addressed by local health and sanitary authorities. Open-air *fecalism* is a common practice in rural areas where feedlot operations are located. We have knowledge of the occurrence of *Taenia saginata* infection in feedlot workers detected by state health authorities. Bovine cysticercosis results by consuming food or water contaminated with eggs from adult parasites infecting humans. Mature tapeworm proglottids containing thousands of eggs are commonly passed in the feces of infected individuals and can contaminate water, forage, grain and other ingredients used to prepare feeding rations, favoring infection of cattle (Lees et al., 2002; Ogunremi et al., 2004). Given the low sensitivity of post-mortem examination (Eichenberger, Stephan, and Deplazes, 2011; Scandrett et al., 2009), the actual prevalence of bovine cysticercosis can be up to ten times higher than that reported in this study (Dorny and Praet, 2007), resulting in an underestimation of the magnitude of the problem of *Taenia saginata* infection in the human population, especially in regions characterized by intensive cattle production. The findings of cysticerci by anatomical location show that the heart was the site where the presence of the parasite was more frequently found and confirmed, followed by the liver and masseter muscles; this is consistent with the reports of cattle naturally and experimentally infected with *Taenia saginata* eggs, demonstrating a similar anatomical distribution of parasites as that reported in this study (Minozzo et al., 2002; Wanzala et al., 2003). It is important to emphasize that the majority of cysticerci (71.4%) found in cattle native to the state of Baja California were detected in the vesicular state, which is fully viable and capable of producing tapeworm infection if

consumed. The prevalence of bovine cysticercosis established in this study is at slaughterhouse TIF 301 is lower than the only previous report for Baja California (Quiróz-Romero, 2005) and comparable with the prevalence of countries reporting light infections with low numbers of cysticerci found during post mortem inspection. However; given that the sensitivity of the post-mortem inspection has been calculated as low as 16.5% (Eichenberger et al., 2013), it is possible that an undetermined number of carcasses pass as being free of cysticerci and the meat reached both domestic and international wholesale markets increasing the possibility of human infection and causes substantial economic loss through condemnation of infected meat and trade restrictions for endemic regions.

## References

- Abuseir, S., Epe, C., Schnieder, T., Klein, G., and Kuhne, M. (2006). Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal. *Parasitol Res* **99**(4), 405-9.
- 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.
- Dorny, P., and Praet, N. (2007). *Taenia saginata* in Europe. *Vet Parasitol* **149**(1-2), 22-4.
- Eichenberger, R. M., Lewis, F., Gabriel, S., Dorny, P., Torgerson, P. R., and Deplazes, P. (2013). Multi-test analysis and model-based estimation of the prevalence of *Taenia saginata* cysticercus infection in naturally infected dairy cows in the absence of a 'gold standard' reference test. *Int J Parasitol* **43**(10), 853-9.
- 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.
- Lees, W., Nightingale, J., Brown, D., Scandrett, B., and Gajadhar, A. (2002). Outbreak of *Cysticercus bovis* (*Taenia saginata*) in feedlot cattle in Alberta. *Can Vet J* **43**(3), 227-8.

- Minozzo, J. C., Gusso, R. L. F., Castro, E. A. d., Lago, O., and 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.
- 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.
- Ogunremi, O., MacDonald, G., Scandrett, B., Geerts, S., and Brandt, J. (2004). Bovine cysticercosis: preliminary observations on the immunohistochemical detection of *Taenia saginata* antigens in lymph nodes of an experimentally infected calf. *Can Vet J* **45**(10), 852-5.
- Quiróz-Romero, H. (2005). "Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos." Editorial LIMUSA, México D.F.
- Regassa, A., Abunna, F., Mulugeta, A., and Megersa, B. (2009). Major metacestodes in cattle slaughtered at Wolaita Soddo Municipal abattoir, Southern Ethiopia: prevalence, cyst viability, organ distribution and socioeconomic implications. *Trop Anim Health Prod* **41**(7), 1495-502.
- Scandrett, B., Parker, S., Forbes, L., Gajadhar, A., Dekumyoy, P., Waikagul, J., and Haines, D. (2009). Distribution of *Taenia saginata* cysticerci in tissues of experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* **164**(2-4), 223-31.
- Wanzala, W., Onyango-Abuje, J. A., Kang'ethe, E. K., Zessin, K. H., Kyule, N. M., Baumann, M. P., Ochanda, H., and Harrison, L. J. (2003). Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. *Afr Health Sci* **3**(2), 68-76.

Table 1. Origin of cattle and cases of cysticercosis.

Origin	Slaughter	Suggestive lesions	Positive diagnosis	Negative diagnosis	Prevalence (x 1000)
Introduced*	31,393 (60.0%)	172	88	84	2.80
Baja California	20,929 (40.0%)	36	21	15	1.00
Total	52,322 (100%)	208	109	99	2.08

\*Odds Ratio 2.81 (P <0.0001); Confidence Interval (95%) 1.71-4.66

Table 2. Anatomic localization and condition of *Cysticercus bovis*

Localization	Introduced		Baja California		Total
	Viable	Calcified	Viable	Calcified	
Hearth	1	74	13	5	93
Liver	0	6	2	0	8
Masseters	2	5	0	1	8
Tongue	0	0	0	0	0
Total (%)	3 (3.4%)	85 (96.6%)	15 (71.4%)	6 (28.6%)	109 (100%)

Table 3. Association between *Cysticercus bovis* viability and origin of cattle

Origin	Viable	Calcified	Total	Odd Ratio P<0.0001	Confidence Interval (95%)
Baja California	15	6	21	70.83	15.95-314.51
Introduced	3	85	88		
Total	18	91	109		

## EXPERIMENTO II

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

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

(1) Corresponding Author

Artículo enviado a: **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**

# Foodborne Pathogens and Disease

## Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Foodborne Pathogens and Disease*.

Manuscript ID: FPD-2015-2014

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

Authors: Monge-Navarro, Francisco  
Cueto-Gonzalez, Sergio  
Rodríguez Gardea, Abelardo  
Trasviña Muñoz, Enrique  
Rodríguez Castillo, Jose  
Hernández-Gómez, Erika  
Lopez-Valencia, Gilberto  
Bermudez-Hurtado, Rosa

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

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)\*

(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](mailto: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 SDS-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 (Lightowers 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 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 extraction using a lysis buffer containing a mix of ionic and non-ionic detergents and protease inhibitors. A first lot of fifty 150 cm<sup>2</sup> 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 (Figure 1.). 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 (rTsa18) 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 rTsa18 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 feedlot and herds with history of *T. saginata* to determine which animals could be choose to 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.

## References

- 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., 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.

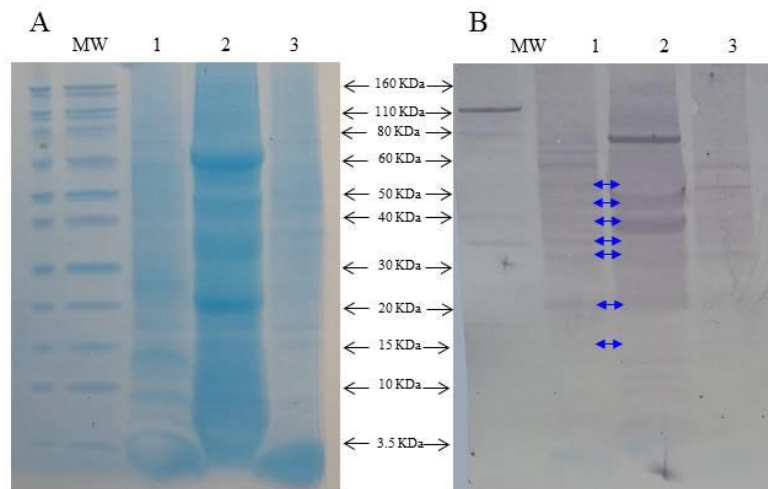


Fig. 1. A, Coomassie blue-stained SDS-PAGE in 4-12% polyacrylamide gel (Novex, Life Technologies) analysis of cleared lysates. B, Western blotting of rTsag18 (lane 1), *C. bovis* (lane 2) and Sf9 cell culture (lane 3) cleared lysates with anti-*C. bovis* reference sera. Lane MW Novex Sharp Protein Standard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