



Efecto de las concentraciones del extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* sobre la producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus*

Effect of the concentrations of the *Bunostomum trigonocephalum* crude extract on the antibodies production in *Oryctolagus cuniculus*

Rebeca Paredes Pizan¹, Teresa Morillos Silva¹, María de Jesús Salinas Aranda¹,
Nicole Terrones Rodríguez¹, Kevin Tuanama Aquino¹ y Cesar A. Jara².

¹Alumnos de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. ²Departamento de Microbiología y Parasitología.
Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones de 50, 250, 500 y 1000 ug/mL de extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* (Nematoda) sobre la producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus*. El extracto se obtuvo por maceración, en condiciones de esterilidad, de 500 ejemplares hembras recolectados del intestino delgado de ovinos, *Ovis aries*, sacrificados en el Camal Municipal de Otuzco (La Libertad-Perú) y los anticuerpos específicos por inoculación los extractos, por la vía intraperitoneal, en cinco ejemplares de *O. cuniculus* raza Neozelandeza. El extracto tuvo, según el método de Bradford, una concentración proteica de 4850ug/mL. La cuantificación de anticuerpos se determinó mediante la prueba de ELISA indirecta. La mayor concentración de anticuerpos se produjo a 1000ug/mL de extracto y la menor a 50ug/mL ($p < 0,05$). En conclusión, a mayor concentración de extracto crudo de *B. trigonocephalum* inoculadas en *O. cuniculus*, mayor producción de anticuerpos detectados por la técnica de ELISA indirecta.

Palabras claves: *Bunostomum trigonocephalum*, extracto crudo, anticuerpos, *Oryctolagus cuniculus*, ELISA

ABSTRACT

Effect of concentrations 50, 250, 500, and 1000ug/mL of crude extract of *Bunostomum trigonocephalum* (Nematoda) on the production of antibodies in *Oryctolagus cuniculus* was determined. The extract was obtained by maceration, in sterile condition, of 500 female specimens collected of the small intestine of sheep, *Ovis aries*, slaughtered in the Municipal slaughterhouse of Otuzco (La Libertad-Peru) and the inoculation by intraperitoneal via was done in five specimens of *O. cuniculus* race Neozelandeza. The extract, according to the method of Bradford, had a protein concentration of 4850ug/mL and the antibodies quantification it was evaluated by the indirect ELISA test. The highest concentration of antibodies was produced by 1000ug/mL of extract and the lower by 50ug/ml ($p < 0,05$). In conclusion, a greater concentration of crude extract of *B. trigonocephalum* inoculated in *O. cuniculus*, increased production of antibodies detected by indirect ELISA technique.

Keywords: *Bunostomum trigonocephalum*, antigenic proteins, antibodies, *Oryctolagus cuniculus*, ELISA

INTRODUCCIÓN

La bunostomosis es una helmintiasis causada por el nematodo *Bunostomum trigonocephalum*, cuyos adultos habitan en el intestino delgado de ovinos a menudo con otros parásitos gastrointestinales en infecciones mixtas¹. Las helmintiasis intestinales se dan con frecuencia en comunidades donde la pobreza prevalece, la salubridad en la crianza de los animales es deficiente y la educación sanitaria no se practica; el efecto negativo de estos factores es una deficiencia inmunológica que conduce a una susceptibilidad a infecciones producidas por estos parásitos².

La prevalencia varía considerablemente según las condiciones climáticas y ecológicas; tiende a desarrollar y sobrevivir mejor en climas cálidos lo que les da mayor oportunidad y explica su distribución abundante en el país, y su estacionalidad en áreas templadas³.

Las infecciones por *B. trigonocephalum* son más frecuentemente diagnosticadas por el hallazgo de los típicos huevos en muestras de materia fecal⁴. Sin embargo, el diagnóstico específico y sensible de infecciones por nematodos gastrointestinales del ganado respalda el control eficaz de la enfermedad, que es de gran relevancia ya que la resistencia antihelmíntica es un problema importante⁵.

La utilización de las técnicas inmunológicas para apoyar el diagnóstico clínico de las parasitosis se justifica por la baja sensibilidad de los exámenes coproparasitológicos⁵. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una de las pruebas más usadas en la actualidad, siendo alta su sensibilidad y relativamente baja la especificidad, dependiendo fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados⁶. Diseñada para el diagnóstico de infecciones parasitarias y no parasitarias; dentro de las primeras se cuenta para prácticamente todas las zoonosis, en particular para aquellas que son causadas por larvas, como es el caso de ascariasis^{7,8}, hidatidosis⁹ y toxocarosis¹⁰; al mismo tiempo, para su ejecución se han utilizado diversos tipos de antígenos, entre los cuales están los somáticos, de excreción-secreción y totales.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación orientada a determinar la concentración de proteínas del extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* a 50, 250, 500 y 1000ug/mL que produce la mayor cantidad de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente, detectados por la técnica de ELISA indirecta, con la finalidad de que se constituya en un aporte dentro de las investigaciones respecto del diagnóstico de las helmintiasis en ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de formas adultas de *B. trigonocephalum*

Los ejemplares de *B. trigonocephalum* fueron recolectados vivos de ovinos, *Ovis aries*, sacrificados en el Camal Municipal de Otuzco (La Libertad-Perú) y trasladados al laboratorio de Helminología para su identificación mediante el estudio de sus características morfológicas con ayuda de descripciones morfológicas aceptadas⁷. Luego, los parásitos fueron lavados con solución salina fisiológica estéril (SSFE) tres veces por 10 min y la última de con adición de dos antibióticos: Gentamicina (0.5 ml/100 mL) y Penicilina G sódica (0.5 mL/100 mL de 1,000,000 UI).

Obtención del extracto crudo y determinación de concentración de proteínas.

El extracto crudo se obtuvo por machacado de 500 ejemplares hembras en mortero estéril y en condiciones de esterilidad; luego, se centrifugo a 3,000 rpm por 10 minutos, se realizó el filtrado del sobrenadante a fin de lograr la purificación de la muestra. Este producto fue conservado en viales a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford¹¹.

Obtención del suero anti-extracto crudo de *B. trigonocephalum* en *O. cuniculus*.

Se utilizaron cinco conejos raza Neozelandeza adquiridos, con la correspondiente certificación, de la veterinaria PetPoint (Trujillo, Perú). Uno de ellos fue utilizado como control, al cual se le inoculó, por vía subcutánea en la cara interna de la pata posterior derecha, 1mL de SSFE. A los otros cuatro conejos (grupo experimental) se les inoculó el extracto a las dosis de 50ug/mL, 250ug/mL, 500ug/mL y 1000ug/mL, respectivamente, en el mismo lugar y por la misma vía que al conejo control. Estos conejos del grupo experimental fueron inoculados en tres ocasiones, a intervalos de siete días entre una y otra: la primera, 1mL de extracto crudo de *B. trigonocephalum*, mezclado en partes iguales (v/v) con 1mL de coadyuvante de *Aloe vera* y las tres restantes con 0.5mL de coadyuvante. Antes de las

inoculaciones, de cada uno de los cinco conejos se obtuvo 5mL de sangre mediante punción cardiaca para la obtención del suero preinmune¹². A las cuatro semanas de la primera inmunización se obtuvo una muestra de sangre de los conejos por punción cardiaca, la cual fue centrifugada a 3000 rpm por 15 min para obtener el suero hiperinmune que fue conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Técnica de ELISA.

Se hizo la técnica de ELISA. IgG indirecta, del siguiente modo: (i) se fijó 100uL del extracto crudo de *B. trionocephalum* en la placa (ii) se incubo a 4°C por 18 horas, (iii) se lavó tres veces con 100uL de PBS+Tween, (iv) se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200uL de la solución de leche descremada, (v) se incubó a 37°C por una hora, (vi) se lavó de modo similar a como se hizo en el paso iii, (vii) se agregó el suero (1/500) en volumen de 100uL y se incubó a 37°C por una hora, (viii) se lavó de modo similar a las anteriores, (ix) se agregó el conjugado anti IgG rabbit (1/1000), (x) se incubó a 37°C por una hora, (xi) se lavó nuevamente y se agregó 100uL del sustrato, (xii) se incubó a 37°C por 10 minutos y (xiii) se detuvo la reacción enzimática con 50uL de ácido sulfúrico 2N, finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 492nm, mediante un lector de ELISA^{13,15}.

RESULTADOS

El extracto crudo de *B. trionocephalum* tenía una concentración de proteínas de 4850 ug/mL. Las placas en el lector de ELISA, a una absorbancia de 492nm, mostraron reactividad a las cuatro concentraciones de extractos antígenos evaluada: 50, 250, 500 y 1000ug/mL, con una mayor coloración en aquellas donde el extracto estuvo más concentrado (Fig. 1); es decir, hubo una relación directa, a mayor concentración del extracto, mayor coloración, lo que se interpreta como mayor cantidad de anticuerpos anti extracto crudo de *B. trionocephalum*. La mayor diferencia, sin embargo se apreció entre las concentraciones de 50 y las demás (p<0,05)

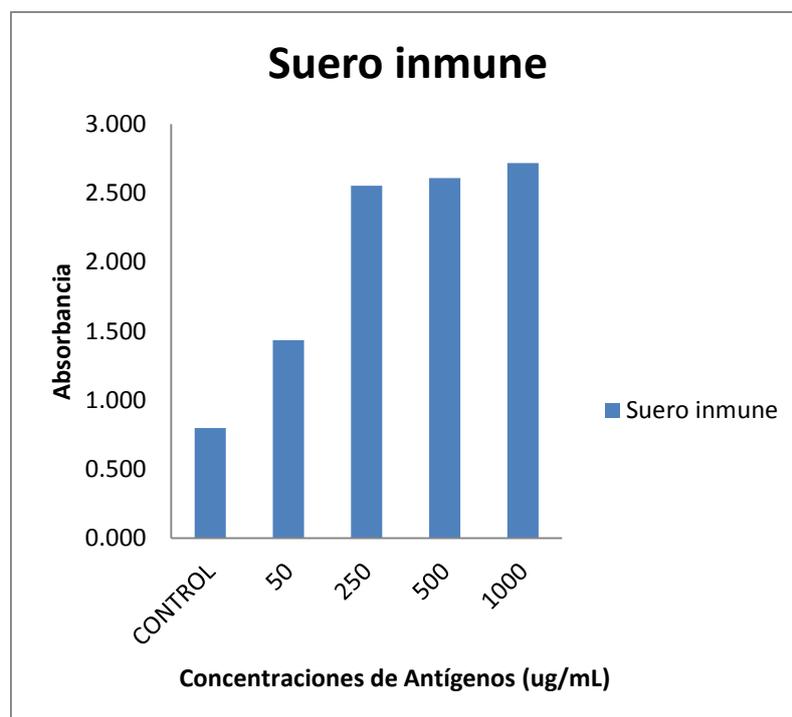


Fig. 1: Absorbancias de Sueros inmunes diluido a 1/500 enfrentado a diferentes concentraciones del antígeno de extracto crudo de *Bunostomum trionocephalum*

DISCUSIÓN

Las parasitosis son consideradas como uno de los principales problemas que afectan la producción bovina a nivel mundial, debido al impacto negativo ejercido sobre parámetros productivos y reproductivos. Estos problemas son más evidentes en los países tropicales y subtropicales, donde los pastos constituyen la base alimenticia de los rumiantes, y donde estos contienen una gran cantidad de formas parasitarias¹⁴. Entonces, los métodos parasitológicos tradicionalmente utilizados permiten demostrar la presencia del parásito, por la detección de sus huevos; sin embargo, presentan algunas limitaciones en dos circunstancias, por lo menos: (i) cuando el parásito aun no produce huevos¹⁰, y (ii) cuando el parasitismo es causado sólo por ejemplares machos¹⁵, es por esa razón que se propone una técnica serológica que permite el diagnóstico de la bunostomosis, tanto en ovinos como en bovinos, en todas sus etapas, incluso cuando la carga parasitaria es baja.

El presente estudio demuestra que los anticuerpos generados debido a la infección por el parásito, fueron específicos contra los antígenos del Extracto crudo de *B. trigonocephalum*. Se tiene en cuenta que podría ser posible usar como fuente de antígenos al extracto crudo, porque (i) son más fáciles de obtener ya que el volumen del antígeno depende del tamaño y de la cantidad de parásitos; (ii) se adquieren en menor tiempo, (iii) se obtienen en buenas cantidades de vivas y muertas y (iv) presentan elevadas concentraciones de proteínas (4850ug/mL) y se ha demostrado ser altamente antigénicas.

Para lograr una buena respuesta inmune en el conejo se necesita una concentración entre 50 y 1000 ug/MI¹⁶. Las concentraciones entre 50 y 1000ug/mL de Extracto crudo de *B. trigonocephalum* inoculadas a los animales en experimentación (*Oryctolagus cuniculus*) logran una buena respuesta inmune; dando como resultado que a 1000ug/mL de antígeno se produce mayor cantidad de anticuerpos, resultado medido bajo la absorbancia leída en el Lector de ELISA empleado. Se tiene en cuenta trabajar en este rango específico, pues un exceso de antígeno puede producir una tolerancia inmunitaria.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la concentración de 1000ug/mL de proteínas del extracto crudo de *B. trigonocephalum* induce una mayor producción de anticuerpos en *O. cuniculus* detectados mediante la técnica de ELISA indirecto que las concentraciones menores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sykes AR. The effect of subclinical parasitism in sheep. Vet Rec. 1978; 102: 32-34.
2. Pullan RL, Brooker SJ. The global limits and populations at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. Parasites & Vectors 2012; 5: 81.
3. Romero JR, Boero CA. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la argentina. Argentina. Analecta Veterinaria 2001; 21(1): 21-37.
4. Sánchez J. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina. Mundo ganadero. 2002; 145: 42-48.
5. Florian Roeber, Aaron R. Jex, Robin B. Gasser. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. Biotech Adv. 2013; 31: 1135-1152.
6. Escalante, H., Davelois K., Ortiz P., Rodriguez H., Diaz E., Jara C. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. Rev. perú. med. exp. salud pública. 2011; 28(3)
7. Vlamincck J, Geldhof P. Diagnosis and Control of Ascariasis in Pigs. Elsevier. 2013. 295-425. doi:10.1017/S0031182014000328.
8. Arteaga M., Jara C. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown. Perú, Trujillo. Rev. Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas 2013; 1(2): 58-64.
9. Manterola C, Viala M, Schneebergera P, Peña JL, Hinojosa J, Sanhueza A. Precision of ELISA-IgE and ELISA-IgG determination in the postoperative follow-up of patients with hepatic echinococcosis. Cirugia Española. 2007; 81(1); 23-27.
10. Savigny D, Voller A, Woodruff A. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J Clin Pathol. 1979; 32:284-288 doi:10.1136/jcp.32.3.284.
11. Rios A. Ultrastructure of the adults of *Bunostomum phlebotomum* (Nematoda: Ancylostomatidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; 87(1). <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761992000500025>.

12. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
13. Espinoza Y, Huapaya P, Suarez R, Chávez V, Sevilla C, Dávila E et al. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. *An Fac Med.* 2003; 64(1): 7-12.
14. Rodríguez C, Cely Y, Gómez D. Efecto in vitro del extracto de *Lotus corniculatus* L. sobre nematodos gastrointestinales de bovinos. *Rev Cubana Plantas Med.* 2016; 21(2): 145-156.
15. Gálvez R, Alvarado E, Casana W, Quiroz J, Ríos M, Jara C. La técnica de ELISA con antígenos del fluidoseudocelómico de *Ascaris suum* en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar experimental. *REBIOLEST.* 2014; 2(2): 34-38.
16. Colina J, Leiva D, Escalante H, Jara C. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Toxocara canis* identificados mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *REBIOLEST.* 2011; 31(2).