ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Giardia*, PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgG E IgY ANTI-*Giardia* Y DETECCIÓN DE *Giardia*

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se enmarca en el campo de la biotecnología, particularmente en productos y métodos para la detección específica de antígenos de *Giardia* en muestras biológicas, de tal manera que sea posible detectar la infección activa aun cuando no haya presencia del parásito completo o sus estadios (quistes y/o trofozoítos) en una muestra determinada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Giardiasis

Entre las parasitosis intestinales de mayor impacto en la salud pública a nivel mundial se encuentra la giardiasis, una enfermedad causada por la *Giardia*, un parásito (protozoario intestinal) que se transmite por agua (ya que es resistente a los diferentes agentes químicos empleados en la potabilización del agua (Yu Zhang. et. al, 2015), por alimentos contaminados o mediante persona a persona vía fecal-oral (Koehler et al., 2014).

La *Giardia* carece de ciertos orgánulos (mitocondrias y aparato de Golgi) y tiene dos formas de vida en su ciclo de vida, trofozoíto y quiste. Este protozoo es el principal agente de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en humanos, particularmente en los niños (Muhsen y Levine, 2012). La infección por este parásito se manifiesta con un espectro clínico que oscila desde la infección asintomática hasta la infección sintomática con diarrea crónica, síndrome de malabsorción y retardo en el crecimiento infantil (González y Cecchini, 2013), persistiendo por más tiempo y con más intensidad que la infección por otros parásitos intestinales y causando efectos adversos tanto en el crecimiento y desarrollo, como en el aprendizaje (Berkman et al., 2002).

La prevalencia de las parasitosis intestinales es muy alta en la población marginada o de alto grado de vulnerabilidad, concentrándose en la primera infancia, niños escolares, mujeres en embarazo, población campesina e indígena, y puede variar según el grupo de estudio y los factores de riesgo asociados con giardiasis. En países como Colombia, la prevalencia es de 21,1% en niños de menores de 5 años (Castro y Nicholls, 1998), del 65% en niños menores de 13 años alojados en asentamientos temporales (Torres et al., 2002) y del 15,4% en población escolar colombiana (Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal 2012-2014).

La identificación de quistes o trofozoítos de *Giardia* suele realizarse en muestras de materia fecal (una muestra o coprológico seriado) o con métodos invasivos como aspirado duodenal,

impronta y biopsia de intestino delgado (Goka et al., 1990; Wolfe, 1990) los cuales resultan incómodos y costosos. Sin embargo, dada la excreción intermitente del parásito en las heces, se pueden originar falsos negativos.

El propósito fundamental en el diagnóstico de las parasitosis es identificar el parásito. En la giardiasis, la identificación de quistes o trofozoítos de *Giardia* depende de varios factores como son: la experiencia del microscopista (Torabi et. al., 2014, Van den Bossche, 2015); la ingestión previa de sustancias que originan un resultado falso negativo tales como: antiprotozoarios no medicados, antibióticos, antiácidos, antidiarréicos, enemas, laxantes (Wolfe, 1978); el uso de bario como medio de contraste en examen radiológico intestinal (Sun, 1980) y el fenómeno de excreción intermitente de quistes de *Giardia* en heces que es inherente a la naturaleza biológica del parásito (Faubert y Belosevic, 1990; Torabi et. al., 2014).

El hospedero puede estar infectado con *Giardia* pero, por la naturaleza biológica del parásito, que no es posible modificar, se puede incurrir en falsos negativos (informar que no se observan quistes de *Giardia*) cuando se examina la muestra de materia fecal. Por ello, es indispensable recurrir a la detección del parásito en las heces mediante anticuerpos policlonales anti-*Giardia* que permitan determinar la presencia del parásito aun cuando este no se excrete en las heces.

Anticuerpos policlonales anti-Giardia

Anticuerpos monoclonales anti-*Giardia* se han desarrollado en ratón para conocer aspectos relacionados con el parásito. Así, entre 1999 y 2006 se realizaron estudios sobre la expresión simultánea de diferentes proteínas de superficie de trofozoíto de *Giardia* durante el enquistamiento (Carranza et al., 2002); la glutaminación y tirosinación pos-translacional en tubulina de *Giardia intestinalis* (Boggild et al., 2002); producción de hidrógeno por *Giardia* (Lloyd et al., 2002); detección de *Giardia* mediante inmunofluorescencia (El-Shewy y El-Hamshary, 1999), identificación del parásito en agua (Caccio et al., 2003; Bertrand et al., 2004; Gomez-Couso et al., 2005); viabilidad de quistes de *Giardia* en materia fecal humana y agua del medio ambiente (Lemos et al., 2005), la similitud de la proteína de pared del quiste de *Giardia* y el trofozoíto del parásito en enquistamiento (Abdul-Wahid y Faubert, 2004), los requerimientos de opsonización relacionados con la respiración de neutrófilos contra trofozoítos de *Giardia* (Arbo et al., 2006); detección de quiste de *Giardia* en materia fecal humana mediante el inmunoensayo enzimático ELISA ó mediante estuches inmunodiagnósticos, con sensibilidades entre 90% y 100% y especificidades entre 91% y 100%, utilizando el anticuerpo monoclonal como primer o segundo capturador (Chan, 2000) y para complementar la captura de antígeno de *Giardia* han continuado utilizando anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos policlonales desarrollados en conejo han sido utilizados para diagnóstico y en estudios para la generación de anticuerpos humanos terapéuticos (Rader et al., 2000). El uso de aves como la gallina para producir anticuerpos policlonales, en comparación con la de mamíferos, es una alternativa importante debido a que reduce el número de animales a inmunizar y elimina el método invasivo por sangría de los ejemplares (Dias y Tambourgi, 2010).

Anticuerpos policlonales anti-*Giardia* se continúan desarrollando para realizar estudios específicos relacionados con el parásito, tales como la determinación de las propiedades de unión e inmunolocalización de proteínas específicas del parásito (Hassan et al., 2005), la interacción de beta giardina con la proteína nuclear Bop1 (Kim et al., 2006), las isoformas de la proteina cinasa C de *Giardia duodenalis* (Bazan et al., 2007) y para detectar *Giardia* en materia fecal humana como se describió anteriormente.

Los anticuerpos policlonales tienen la ventaja sobre los anticuerpos monoclonales en que los primeros reconocen múltiples epítopes del antígeno blanco y se unen a epítopes inmunogénicos, lo cual, en algunos casos, se puede convertir en desventaja porque podría darse la posibilidad de unirse a epítopes similares de otras proteínas y originar falsos positivos (Mighell et al., 1998). Esta desventaja se puede obviar utilizando anticuerpos policlonales IgY, tal como los de la presente invención.

Se han desarrollado anticuerpos policlonales IgY contra antígenos específicos de virus (rotavirus, enterovirus, picornavirus, arbovirus, paramixovirus, potivirus y adenovirus), bacterias (*Escherichia coli* enterotoxigénica y enteropatógena, *Brucella abortus*), parásitos (*Sarcocystis gigantae*, *Toxoplasma gondii* y *Echinococcus granulosus*), péptidos y proteínas (Schade et al., 1996). Sin embargo, no se han identificado desarrollos de anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia* para diagnóstico, contra todo el estadio del trofozoíto parásito.

Moreno-González et al., 2013 obtuvieron y purificaron anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante proveniente de *Giardia* y que es central en el metabolismo del NAD+ pero con la finalidad de estudiar el metabolismo energético en organismos basales. García et al, 2005 desarrollaron en gallina anticuerpos policlonales IgY anti-trofozoíto de *Giardia* de aislaminetos colombianos del parásito. El trofozoíto de *Giardia* contiene los epítopes antigénicos del quiste y otros propios de su estadio que induce la patología y la respuesta inmune en el hospedero (Olmos et al., 2003; Hernández et al., 2003).

Purificación de anticuerpos policlonales

Los métodos de purificación de anticuerpos pueden dividirse en dos grandes grupos: separación por fraccionamiento y purificación por afinidad.
Entre los métodos de fraccionamiento se encuentran la precipitación con sulfato amónico, la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía de quelatos metálicos (IMAC).

Los métodos de purificación por afinidad pueden ser:

- Purificación clase-específica: consiste en la unión a fase sólida de una determinada clase de anticuerpos (por ejemplo, las IgG), mediante ligandos inmovilizados que presentan afinidad específica frente a esa clase de inmunoglobulinas. Purifica todas las inmunoglobulinas de una determinada clase, independientemente de su afinidad por el antígeno de interés.
- Purificación antígeno-específica: Separa las inmunoglobulinas que se unen específicamente a un antígeno inmovilizado. Purifica todos los anticuerpos específicos para ese antígeno, con independencia de su clase o isotipo.

Detección de Giardia

La detección de *Giardia duodenalis* en materia fecal utilizando anticuerpos policlonales presenta las siguientes ventajas: los anticuerpos policlonales pueden ser desarrollados más rápidamente, a menor costo y con menos requisitos técnicos y procedimentales que los requeridos para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales. La generación de anticuerpos monoclonales tarda hasta un año o más, en tanto que los anticuerpos policlonales se desarrollan en meses.

Los anticuerpos policlonales son heterogéneos y reconocen diferentes epítopes antigénicos. Así el efecto dado por un cambio o por un número pequeño de epítopes es menos crítico. Los anticuerpos policlonales son más estables a cambios de pH y concentraciones de sal que los anticuerpos monoclonales que son altamente susceptibles a cualquier cambio de los factores anteriormente mencionados (Lipman et al., 2005).

El antígeno de *Giardia* puede ser detectado en heces mediante los inmunoensayos: contrainmunoelectroforesis (CIE) (Craft y Nelson, 1982), ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Ungar et al, 1984) y dot-ELISA (Vinayak et al, 1991). La sensibilidad de los métodos varía desde 88% al 98% utilizando CIE, del 68% al 100% mediante ELISA y del 92% con el dot-ELISA. La especificidad de estas pruebas varía entre 90% y 97% para la CIE, entre 81% y 100% para ELISA y para Dot-ELISA es de 100%.

La ventaja de la detección de antígenos de excreción/secreción de *Giardia* en heces, utilizando anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia* sobre la identificación del parásito por microscopía, consiste en que éstos permiten determinar la infección por *Giardia* en el hospedero aun cuando no se liberen los quistes del parásito en las materias fecales (Nash et. al., 1987). Adicionalmente, siguiendo esta metodología, se pueden procesar un gran número de muestras (Geurden et. al., 2008).

Se han realizado estandarizaciones y evaluaciones preliminares del ELISA directo e indirecto y dot-ELISA para la detección de antígeno de *Giardia* en heces de gerbo (*Meriones unguiculatus*), modelo animal para estudios de giardiosis (Arévalo et al. 2005) y en heces humanas (Peralta et al, 2000; Gómez et al, 2002; Duque et al, 2002), con sensibilidades que oscilan entre 72% y 100% y especificidades entre 81% y 100%. Los inmunoensayos mencionados para la detección de *Giardia* en heces, han utilizado anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* desarrollados en conejo (Torres et al., 1997; Arévalo, 1999; Peralta, et. al, 2000; Serrano, 2001; Duque et al., 2002); cabra (Ungar et al., 1984; Nash et al., 1987; Knisley et al., 1989) y utilizando anticuerpos monoclonales anti-*Giardia* desarrollados en ratón (Chan, et. al., 2000).

Ensayos inmunoenzimáticos basados en ELISA directo o indirecto han sido comercializados en forma de estuches diagnósticos para la detección de antígeno de *Giardia* en eluídos de heces. Estos poseen una sensibilidad del 85% - 100% y una especificidad del 90% - 100% (Sloan et. al., 1989; Addiss et. al., 1991). Aldeen et. al., en 1998 compararon nueve estuches diagnósticos para la detección de *Giardia* en materia fecal demostrando que la sensibilidad de la prueba oscila entre 96% y 100% y la especificidad de la misma entre 99% y 100%. Existen varios estuches inmunodiagnósticos disponibles comercialmente para detectar antígeno de *Giardia* en materia fecal cuya sensibilidad varía entre 85% y 98% y su especificidad entre 90% y 100% (Addiss et al, 1991; Aldeen et al, 1995; Garcia y Shimizu, 1997; Rosenblatt et al, 1993; Rossoff et al, 1989; Stibbs et al, 1988). La sensibilidad y la especificidad de los métodos depende de la cepa de *Giardia* circulante en un área geográfica y de la variabilidad genética inherente al parásito (Torabi et. al., 2014).

No obstante, la existencia de varios métodos para la detección de *Giardia*, es necesario desarrollar nuevos métodos alternativos para la obtención y purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia*, así como pruebas diagnósticas *in vitro* para la detección de antígenos de *Giardia* en diferentes tipos de muestras. Se conoce muy poco, en la actualidad, de técnicas inmunodiagnósticas que utilicen anticuerpos policlonales de *Giardia*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una fase estacionaria reutilizable para la purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY, que comprende una mezcla de al menos dos de las proteínas antigénicas recombinantes CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3 incorporadas en un soporte sólido.

La invención también contempla un método para la purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY por cromatografía de afinidad con dicha fase estacionaria y a los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY purificados que se unen específicamente a las proteínas antigénicas CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de diagnóstico de giardiasis, por detección de antígenos de *Giardia* en una muestra biológica, que utiliza dichos anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY purificados. En un aspecto adicional, la invención contempla un kit para diagnóstico de giardiasis en muestras biológicas que comprende los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY purificados, junto con un conjugado de anticuerpo anti-*Giardia* unido a un reportero y un reactivo de detección.

La detección del parásito mediante los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY de la presente invención permite diagnosticar la infección aun cuando no se encuentren los quistes del parásito en la muestra, puesto que, a diferencia de los métodos convencionales, identifican selectivamente los antígenos específicos de quiste y trofozoito de *Giardia*: CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. PCR para la amplificación de genes de interés de cepas colombianas de *Giardia*: A. CWP1; B. Alfa giardina 7.3.

Figura 2. Detección de colonias portadoras del plásmido recombinante - PCR Colony: A. CWP1; B. Alfa giardina 7.3.

Figura 3. Purificación por afinidad de lisados de la proteína recombinante nativa en resina de Níquel (Ni+2): A. CWP1; B. Alfa giardina 7.3.

Figura 4. Concentración de la proteína recuperada.

Figura 5. Western Blot: reconocimiento especifico de una sola banda de 34.2 kDa para la Alfa giardina-7.3).

Figura 6. Amplificación por PCR del gen de Kinesina 3.

Figura 7. PCR colony de Kinesina 3.

Figura 8. Tamizaje de colonias mediante el uso de la enzima de restricción (PstI) para identificar los plásmidos que portan el fragmento del tamaño esperado para la Kinesina 3.

Figura 9. Esquema de purificación de la Kinesina 3.

Figura 10. Gel de SDS-PAGE: purificación de la Kinesina 3 mediante cromatografía de afinidad en resina cargada con Níquel.

Figura 11. Patrón de excreción de quistes y trofozoítos de aislamientos colombianos de *Giardia* durante la infección experimental en Gerbos (modelo animal para estudios de giardiosis).

Figura 12. Actividad biológica de los anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* e IgY anti-*Giardia* purificados por cromatografía de afinidad y demostrada mediante Western Blot.

Figura 13. Diagrama de la detección de antígeno de *Giardia* mediante ELISA utilizando los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY.

Figura 14. Dilución óptima de anticuerpos policlonales anti-*Giardia.*

Figura 15. Dilución óptima de conjugado anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina.

Figura 16. Densidades ópticas que indican positividad en gerbos infectados con el parásito desde el día cero de la infección hasta el día 30 cuando los animales resuelven por sí mismos la infección.

Figura 17. Discriminación diagnóstica del ELISA sándwich indirecto para la detección de antígeno de *Giardia* en eluído de heces de humano.

Figura 18. Estuche inmunodiagnóstico para detección de *Giardia* en heces.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) son moléculas de proteínas que se producen en el organismo como respuesta a microorganismos o moléculas (antígenos) y tienen la habilidad de unirse a éstos con un alto grado de afinidad y especificidad. En los mamíferos existen cinco clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) y en las aves tres clases (IgY,

IgM e IgA). Las inmunoglobulinas reconocen relativamente pequeños componentes de un antígeno y pueden reaccionar cruzadamente con epítopes similares de otros antígenos, pero éstos generalmente son de menor especificidad.

Los anticuerpos monoclonales son generados por un sólo clon de linfocitos B. Los anticuerpos monoclonales funcionan bien cuando los antígenos son homopoliméricos, en caso contrario, es necesario desarrollar un "pool" de anticuerpos monoclonales, cada uno con diferentes especificidades, lo cual requiere de mucho tiempo e inversión económica, pues se deben identificar los múltiples anticuerpos monoclonales que cumplan con la especificidad deseada.

Adicionalmente, cambios pequeños en la estructura de un epítope como consecuencia de un polimorfismo genético, glicosilación y desnaturalización pueden evidentemente afectar la función de los anticuerpos monoclonales. Aunque las principales ventajas de los anticuerpos monoclonales son su homogeneidad, consistencia y monoespecificidad, éstas pueden limitar su uso en la detección de *Giardia,* dado que ésta presenta variabilidad genética como un factor biológico inherente al parásito.

Los anticuerpos policlonales son generados por una mezcla de varios clones de linfocitos B y, por lo general, tienen mayor sensibilidad que los anticuerpos monoclonales. La especificidad de un anticuerpo se conoce como la habilidad de éste para reconocer un epítope específico en la presencia de otros epítopes. Por lo tanto, un anticuerpo con alta especificidad presentará un mínimo de reacciones cruzadas. En relación con antígenos proteicos, las uniones de afinidad de la mayoría de los anticuerpos están influenciadas por su estructura conformacional. Un cambio en la estructura conformacional es crítico cuando se usan anticuerpos monoclonales, y de menor impacto cuando se utilizan anticuerpos policlonales.

Antígenos de aislamientos de *Giardia* que contienen membrana y fracciones proteicas del parásito, pueden ser utilizados, mediante inmunización de conejos y gallinas, para obtener anticuerpos *anti-Giardia* que permitan detectar el parásito. Una vez identificados los antígenos proteicos pertinentes, es posible obtenerlos empleando técnicas de biología molecular y celular que incluyen la clonación de genes.

Los anticuerpos anti-Giardia IgY reconocen alrededor de 45 antígenos de quiste y de trofozoíto de aislamientos de *Giardia*. Treinta y tres de éstos se encuentran presentes en el quiste y los 12 restantes de 18, 20, 25, 40, 69, 74, 94, 105, 129, 200, 230 y 241 kDa son propios del trofozoíto de *Giardia.* El hecho de que los antígenos del quiste de *Giardia* se encuentran también en el trofozoíto del parásito, es una ventaja dado que el estadio de trofozoíto puede mantenerse axénico *in vitro* lo que facilita la obtención de grandes volúmenes de antígeno.

Acorde con la literatura científica de las proteínas reconocidas en quiste y trofozoíto de aislamientos de *Giardia* por IgY, anti-aislamientos de *Giardia* pueden corresponder a las proteínas que se relacionan en la Tabla 1:

Tabla 1. Proteínas reconocidas por IgY anti-aislamientos de *Giardia*

Antígeno (Proteína) kDa	Localización y/o función	Referencia bibliográfica
170	Flagelo	Rosales y Borjas, 1968
86	Membrana	Edson y col, 1986
82	Membrana	Einfeld y Stibbs, 1984
78	Regulador	Reiner y Gillin, 1992
74	Membrana	Clark y Holberton, 1986
67	Flagelo	Crossley y Hoberton, 1986
65	Excreción/Secreción	Rosoff Stibbs, 1986 Vinayak et al, 1993
64	Membrana	Einfeld y Stibbs, 1984
60	Citoesqueleto	Crossley y Holberton, 1985
56	Membrana	Vinayak y col, 1989
52	Membrana	Einfeld y Stibbs, 1984
49	Membrana	Das y col, 1991
35	Giardinas	Taylor y Wenman, 1987
24	Membrana	Einfeld y Stibbs, 1984

Algunas de las secuencias de aminoácidos de los antígenos de *Giardia* que pueden obtenerse mediante técnicas de biología molecular, se muestran a continuación:

CWP1 (SEQ ID NO: 1)

MRGSHHHHHHGSMMLAFLALAGSALALTCPATQREVLVEIYDATDGANWKTNN
WLSGDSICTWTGVTCEASNNYVIALDLSDMGLTGTIPENIGCLTYLKTLYLSNNSL
AGAIPEGLCQLTNLQYLQVNSAGLTGDIPECMCDLIHLMFWYMSDNALTGSIPTCI
NELQFLKELHLDCNQLSGTVPVGLMTLPYLMELYLNCNPDLTCPDATGVQFVFKC
GDVDCENCGTLPPTNCAQCFTDPDCGEYCLTQP.

La anterior secuencia tiene un 99% de identidad con la proteína codificada por el gen GL50803_5638.

Alfa-giardina 7.3 (SEQ ID NO: 2)

MRGSHHHHHHGSMAAAKATEIKALIDAKDMDGLARSVADFDDRQRAEIYAAFRA
ANGKTASEYLDALFKNGDYKDLMMIVLDDEIDVRCKLIKKAFKGGNDERCLTDA
LLTTTPEVYARVKDRYHQLFGDDFESTLRKEIGSKTVWARMVNSWLAFCRSARNN
AQGDAEALKAALIGVKHPDTDTVIRLLGTTVPSEWKQISEAFESIAKKTIEQALIEA

YKGDDELALCCCNATLHCPARGAAYLLSLACQKKGDTDRCCRITGMLYDQAEQC
KVLYAHYGNLAKDIRATMSKNLAEACCVLWHVM.

La anterior secuencia tiene un 99% de identidad con la proteína codificada por el gen GL50803_114119.

Por su parte, la proteína Kinesina 3 expresada es ortólogo del gen GL50803_112846, que codifica para la siguiente secuencia de aminoácidos **(SEQ ID NO: 3)**:

MRGSHHHHHHGSMPVTGVKVAVRVRPFNAREKREAARLCVDMPGGGKVVLRDA
DAKKPDAAFVYDHAYWSHDASRPCATQDTVYADIGPSVLDNAFEGYNYTLFAYG
QTGSGKSYSMMGAPASEADAGIIPRVGRELFRRAAASPAETQVSVSFLEIYNERLR
DLLVPAAGAQELRIRQDPAAGVFVQNLSHHAVADYDAIQRLIELGDRNRTVAATN
MNATSSRSHSVFAIEVVQTAVLRNDAGEEVGRHVKRARVSLVDLAGSERQGKTG
ATGDRLTEGISINKSLTTLGRVIEALAYNTTAEGRRKPQHVPYRDSQLTYLLQPALG
GNSMTCMIAAISPASTNYDESLSTLRYADRAHQIENTVTKNESAQEKYIRELEDRV
KELEALLAGGAPAGDAGAVEPGLSDAERLELEAKIAEYDRLLKEGNQSLEEKLAR
AEQNRQELQDKLKKMGLAAAFGSEITTPYISNLSSNASDNGQLIYTLCSENDLKDA
RPVTVVVGADDSGPTECQCRIALVSKLGVLGEHFIISLTGKVVDSTANPIFPKVTEA
TIRPLSAKGALYINGRQIAAGSTHQLRHGDRIKCGSAAQSSFYRYYDPPARAAAVK
QSLEQDYDYVEPEITYDLALREYTYYQSSGKDTAQRPIGDDPVSKENVSVTMDDA
FGITPGLDNVQTDINESFYADFGNDDERTTYEKKVHEVLRQLYPFICEANSIAEYFC
YDIRFAAQARTSISPTSLRQAARCQTIRNMSKNHPMTKDLRADQIDDDLSGILVEIL
VTATAAPSKTRDRKLIRQVWALEKFGLRLSGMRRMYGLAMTLGKEEAVRRAHES
ADRDLEDDDEFPFDLEADIYNQTLTHLIGVGRIPLSGLLETCETDVFSVPIYDYSGK
AATSIDVSLSLLGSGYSHHGAECLACDVANLVQNESPVTTIAAYFKKAYNVPTQCC
KKVHAVIHMPWFVNPDAGRPKGKRLSVYQENEFRRRLLDMGYTFQTASSSDLSPN
PALDSTIYMDLKTSYFKQDDVLEWLRTSGTGLEVSLYGYTSAYADSLVPEIKDSAL
PDPSKKKVAIVSTNIVRTQTKEDGFKEINGEQVLIIKKFIFVDQTKTDTGH.

Anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* desarrollados en conejo se pueden utilizar para capturar antígenos específicos de *Giardia* presentes en materia fecal mediante el ensayo inmunoenzimático ELISA, con sensibilidades y especificidades que oscilan entre 95% y 100%. Estos rangos pueden deberse a algunas características fisicoquímicas inherentes de la IgG de mamíferos.

Dado que los anticuerpos policlonales IgY anti-microorganismo disminuyen la probabilidad de falsos positivos en ensayos inmunológicos se han desarrollado anticuerpos policlonales IgY dirigidos contra parásitos como: *Echinococcus granulosus*, *Naegleria fowleri*, *Plasmodium falciparum*, *Sacorcystis gigantae*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma japonicum.*

La IgY tiene algunas características fisicoquímicas que la diferencian de la IgG de mamífero, de tal manera que la probabilidad de dar falsos positivos y falsos negativos en ensayos inmunodiagnósticos disminuye por la eliminación de uniones inespecíficas. Los mejores anticuerpos para detectar un microorganismo en muestras clínicas o ambientales utilizando inmunoensayos, son generalmente los anticuerpos desarrollados contra la membrana del microorganismo o contra fracciones proteicas asociadas a éste.

Purificación de anticuerpos anti-Giardia IgG e IgY

Los anticuerpos policlonales anti *Giardia*, se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad, la cual ofrece alta especificidad y selectividad para el aislamiento y purificación de biomoléculas. Esta técnica se basa en interacciones bio-específicas gracias a las cuales la columna absorbe únicamente de la muestra los componentes que presentan afinidad con los ligandos acoplados al soporte cromatográfico. Cuando el compuesto retenido es eluído, se consiguen altos niveles de pureza, gracias a la elevada selectividad de estas interacciones de afinidad.

Una modalidad de la presente invención corresponde a una fase estacionaria para purificar anticuerpos anti-*Giardia* IgG e IgY. La fase estacionaria de la invención comprende un soporte resistente, permeable y reactivo, de matrices de polisacáridos (v.g. agarosa, celulosa, dextrano) o matrices sintéticas (v.g. vidrio, poliacrilamida) estables, resistentes a ataques microbianos, estables a los cambios de pH y compatibles con varios disolventes orgánicos. Adicionalmente, la fase estacionaria de la invención comprende una mezcla de dos o más proteínas antigénicas recombinantes seleccionadas de CWP1, Alfa giardina 7.3 y Kinesina 3, incorporadas o disueltas en una solución reguladora o buffer. De manera opcional, la fase estacionaria de la invención puede comprender azida de sodio en solución (0,2% p/v) para impedir que se contamine y así pueda ser reutilizada varias veces.

La solución reguladora o buffer, para efectos de la presente invención, se define como una solución, con determinado pH, que permite resistir cambios de pH cuando hay adición de ácidos o álcali. Las soluciones reguladoras pueden incluir una, dos, o más sales fosfato, citrato, acetato (v.g. metafosfato de potasio, fosfato de potasio, acetato de sodio, citrato de sodio anhidro) y otras sales conocidas en el campo técnico para obtener este tipo de soluciones.

En una modalidad de la invención, la fase estacionaria se compone de un soporte que comprende esferas de agarosa con N-Hidroxi-succimida éster que se acoplan a ligandos acuosos o no acuosos en solución. Este soporte permite el acoplamiento, sin denaturación,

de dos 2 o más antígenos recombinantes de *Giardia* y garantizar su estabilidad a -20ºC por un año y a -70ºC por periodos de tiempo mayores a un año.

La presente invención también contempla un método para purificar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY, por cromatografía de afinidad, que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una fase estacionaria que comprende un soporte resistente, permeable y reactivo de matrices de polisacáridos (v.g. agarosa, celulosa, dextrano) o matrices sintéticas (v.g. vidrio, poliacrilamida) y una mezcla de dos o más proteínas antigénicas recombinantes seleccionadas de CWP1, Alfa giardina 7.3 y Kinesina 3;
b) bloquear los grupos amino-reactivos libres del soporte con una solución reguladora Tris HCl pH 8,0 luego de la unión de las proteínas al soporte, para evitar uniones inespecíficas adicionales;
c) transferir la fase estacionaria obtenida en la etapa a) a una columna y lavar con solución reguladora de bicarbonato;
d) adicionar anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* a la fase estacionaria hasta que se sature el gel, y de igual manera, pero independientemente, realizar el proceso con IgY anti-*Giardia*;
e) remover proteínas u otros solutos inespecíficos;
f) eluir con una solución reguladora de pH ácido los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia* específicos que se habían adicionado independientemente; y
g) neutralizar.

Una modalidad adicional de la presente invención corresponde a los anticuerpos policlonales anti-Giardia IgG e IgY, purificados por cromatografía de afinidad, que se unen específicamente a los antígenos CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3

Detección de antígenos de Giardia en muestras mediante ensayo inmunoenzimático

Una prueba diagnóstica se refiere a cualquier método para obtener información adicional del estado de salud de un paciente. El tipo de información adquirida mediante la utilización de un test diagnóstico no sólo incluye la presencia o ausencia de una determinada enfermedad, sino que también la etapificación de una enfermedad conocida o establecer la existencia de determinada condición, no necesariamente patológica (Bossuyt PM, et. al., 2003).

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es un método basado en reacciones antígeno-anticuerpo que incorporan una enzima a alguno de éstos para visualizar la unión antígeno-anticuerpo mediante el desarrollo de color como producto de la reacción enzima-sustrato. El

ensayo ELISA puede utilizarse bajo el fundamento de cualquiera de las siguientes tres modalidades: i) ELISA directo; ii) ELISA indirecto y iii) ELISA "*sandwich*" el cual a su vez puede ser directo o indirecto.

El ELISA directo se usa para sistemas de competición e inhibición, el ELISA indirecto tiene la ventaja de poder analizar un gran número de muestras. El ELISA *sándwich* directo no es recomendable cuando se espera detectar antígenos complejos y el ELISA *sándwich* indirecto tiene la ventaja de utilizar diferentes inmunoglobulinas provenientes de diferentes especies animales.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método o prueba diagnóstica *in vitro* para la detección de antígenos de *Giardia* en muestras biológicas (v.g. heces) o ambientales (v.g. agua), que comprende las siguientes etapas:

a) adicionar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia* IgY (anticuerpos de captura) en una matriz sólida plástica (v.g. tubos, perlas, placas u otros), en un material poroso de diferentes formas, tales como papel de nitrocelulosa, acetato de celulosa, celulosa regenerada, nylon, polifluoruro de vinilideno (pvdf), entre otros, o en materiales fibrosos tales como fibra de vidrio u otros ;
b) incubar la matriz y lavarla;
c) bloquear;
d) incubar y lavar;
e) adicionar una muestra biológica o ambiental en la matriz sólida que contiene los anticuerpos policlonales anti-*Giardia*, agitar e incubar;
f) retirar el exceso de muestra;
g) adicionar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia*IgY purificados;
h) agitar, incubar y retirar el exceso de anticuerpos;
i) adicionar un conjugado de anticuerpo-anti-IgG de conejo o anti-IgY de gallina unido a un reportero (enzima o molécula fluorescente o luminiscente o cromófora);
j) agitar, incubar y retirar el exceso de conjugado;
k) adicionar un reactivo de detección; e
l) incubar y detener la reacción cuando sea necesario.

El primer anticuerpo policlonal (de captura) en la etapa (a) es el que se une a la matriz sólida (como es el caso del anticuerpo policlonal IgY anti-*Giardia* desarrollada en gallina) y el que captura el antígeno a detectar (en este caso el antígeno de *Giardia*). El segundo anticuerpo policlonal (en este caso el anticuerpo policlonal IgG anti-*Giardia* desarrollado en conejo) se

une al antígeno capturado y permite que, con un conjugado (una inmunoglobulina anti-IgG de conejo unida a una enzima o molécula fluorescente o luminiscente o cromófora), se pueda visualizar (por el desarrollo de un color producto de la reacción) el antígeno de *Giardia* que fue capturado. La ausencia de color indica que la muestra no contiene antígenos de *Giardia.*

Para la detección de la reacción complejo antígeno-anticuerpo se utilizan moléculas conocidas como reporteros (marcadores) que pueden ser de naturaleza enzimática, fluorescentes, luminiscentes y cromóforos que se unen al complejo antígeno-anticuerpo, y un reactivo de detección que produce una señal detectable en presencia de este reportero.

Los componentes esenciales para realizar la prueba diagnóstica de la invención se pueden reunir en un solo paquete (kit) con el fin de facilitar su almacenamiento, transporte y comercialización.

Este ELISA *sándwich* indirecto se puede usar para la detección de antígeno de *Giardia* por las ventajas descritas anteriormente y adicionalmente porque:

i) los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY y anti-*Giardia* IgG no reaccionan entre ellos, evitando el reconocimiento idiotipo-antiidiotipo que genera falsos positivos cuando se utilizan anticuerpos policlonales desarrollados en una misma especie animal; y

ii) anticuerpos aviares IgY a diferencia de la IgG de mamíferos, no interactúa con factores reumatoideos, no activa el sistema del complemento humano, no se une a la proteína A estafilocócica, no se une a la proteína G ni tampoco a los receptores Fc de las células de mamífero, disminuyendo así la probabilidad de dar falsos positivos en ensayos inmunológicos.

En el ELISA, la matriz sólida es uno de los elementos importantes dado que actúa como soporte inmovilizando los anticuerpos. Esta matriz sólida es elaborada con diferentes materiales como: plástico en tubos, perlas, placas u otros; materiales porosos como nitrocelulosa, acetato de celulosa, celulosa regenerada, nylon, polifluoruro de vinilideno (pvdf) entre otros, que pueden tener diferente forma y materiales fibrosos como fibra de vidrio entre otros (Desphande, 1996).

Para la detección de la reacción complejo antígeno-anticuerpo se utilizan moléculas conocidas como reporteros (marcadores) que pueden ser de naturaleza enzimática, fluorescentes, luminiscentes y cromóforos que se unen al complejo antígeno-anticuerpo y un reactivo de detección que produce una señal detectable en presencia de este reportero.

En una modalidad adicional, la presente invención contempla un kit de diagnóstico que comprende una matriz sólida, anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG, anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, conjugado y un reactivo de detección.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos:

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Identificación de proteínas de *Giardia* reconocidas por los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY de aislamientos colombianos.

1.1 Aislamiento de *Giardia* a partir de materia fecal humana.

Identificación de quistes de *Giardia* en heces y aislamiento de quistes mediante purificación de éstos:

- Se realizó diagnóstico parasitológico en materia fecal humana para determinar la presencia o ausencia de quistes de *Giardia* y de otros parásitos intestinales mediante el método directo en solución salina y lugol (Melvin y Brooke, 1980) y el método de concentración formol-éter (Ridley y Hawgood, 1956). La purificación de los quistes de *Giardia* a partir de la materia fecal se realizó mediante gradientes de sacarosa y percoll (Sauch, 1984).

- Eluídos de materia fecal humana (coproantígeno): Se descongelaron eluídos de materia fecal almacenados en el Banco de muestras del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud. Se realizó la detección de antígeno de *Giardia* en eluídos de heces humanas mediante ELISA utilizando anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, desarrollados en conejo y gallina, respectivamente.

1.2 Gerbo - Modelo animal para estudios de giardiosis.

<u>Cuarentena y mantenimiento de Gerbos</u>: Se realizó cuarentena y mantenimiento a los Gerbos en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia), siguiendo los protocolos y procedimientos establecidos en el ABSL2 del INS, las normas establecidas en la Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio, 2010 y las del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1996.

Profilaxis e infección con quistes de *Giardia* a gerbos: A diez Gerbos se les suministró Secnidazol (Secnidal ®) en una dosis de 0,2 g/Gerbo en una sola toma. Se inocularon experimentalmente, vía oral, ocho gerbos con $5x10^3$ quistes de aislamientos colombianos de *Giardia* (controles positivos) mediante intubación con sonda naso gástrica, impregnada con lidocaína, garantizando que los ejemplares sólo estarían infectados con *Giardia*. No se infectaron con el parásito los dos gerbos restantes (controles negativos).

Diagnóstico de *Giardia* en heces de Gerbo: Se estableció la presencia o ausencia de quistes o trofozoítos de *Giardia* en la materia fecal de los gerbos infectados con el parásito, así como de los no infectados, mediante el método directo en solución salina y lugol (Melvin y Brooke, 1980) y el método de concentración formol-éter (Ridley y Hawgood, 1956).

Elaboración de eluído de materia fecal (coproantígeno) de Gerbos no infectados (controles negativos), infectados (controles positivos) y gerbos infectados naturalmente con *Trichomonas hominis* (reacción cruzada): Se recolectaron, independientemente, las heces de cada uno de los Gerbos infectados y no infectados con quistes de aislamientos colombianos de *Giardia*, diariamente y durante 30 días consecutivos (Arévalo et. al., 2005). Se homogenizó aproximadamente 1 gramo de materia fecal en 10 mililitros de solución salina reguladora de fosfatos (PBS) pH 7,2. Se filtró el homogenizado a través de gasa doble permitiendo la sedimentación de partículas grandes presentes en las heces durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se almacenó el coproantígeno a -20°C (Green, 1985) y se descongeló en el momento de detectar antígeno de *Giardia* mediante ELISA utilizando anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, desarrollados en conejo y gallina, respectivamente.

Aislamiento de trofozoítos de *Giardia* del intestino delgado de Gerbos infectados con el parásito: Se realizó eutanasia a los gerbos utilizando CO_2. Se reseccionó el intestino delgado de los ejemplares en condiciones de asepsia y de bioseguridad (Arévalo, 1999).

Mantenimiento *in vitro* de trofozoítos de *Giardia*: Se utilizó medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con bilis y antibióticos (TYI-S-33-B) y se incubaron los trofozoítos de Giardia a 35°C (Keister, 1983).

Preparación de antígeno de *Giardia*: Se congelaron los trofozoítos de *Giardia* aislados del intestino delgado de los gerbos a -196°C, se descongelaron a 4°C y se sonicaron a 20 kHz. Se centrifugó y conservó el sobrenadante (antígeno) y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

1.3 Identificación de antígenos de *Giardia* con potencial diagnostico a través de análisis in silico y revisión de literatura científica.

Se llevó a cabo una revisión de literatura científica para identificar publicaciones que usaran el modelo experimental *Giardia*, en los que se identifica o se proponen antígenos como candidatos para el inmunodiagnóstico de la giardiasis. De igual manera, se hizo un análisis bioinformático considerando criterios como masa molecular o proteínas de excreción/secreción.

Estos criterios fueron usados como primer filtro para buscar proteínas de interés en la base de datos del genoma de *Giardia* que se encuentra disponible en línea http://giardiadb.org/giardiadb, a continuación, se usaron criterios como: la selección de proteínas de superficie, la predicción de epítopes B inmunogénicos; ubicados en la superficie de la molécula en sitios accesibles para el anticuerpo libre.

Finalmente se seleccionaron dos proteínas con potencial utilidad para el inmunodiagnóstico; la proteína CWP1 de la pared del quiste (GL50803_5638) y la alfa giardina 7.3 (GL50803_114787). La secuencia de los respectivos genes fue descargada para las cepas de *Giardia* con genoma secuenciado y con estas se procedió a hacer alineamiento múltiple de secuencias en busca de regiones conservadas para diseñar iniciadores que permitieran la amplificación de estos genes en cepas colombianas de *Giardia*.

1.4 Amplificación de los genes de interés.

Para amplificar los genes de interés, se extrajo ADN de 3 cepas de *Giardia* de diferentes regiones geográficas de Colombia (MHOM/Co/99/GI-15 de Tarapacá Amazonas; MHOM/Co/99/GI-18 Garagoa Boyacá; MHOM/Co/99/GI-23 Popayán Cauca). La PCR se hizo usando el kit CloneAmp™ HiFi PCR Premix siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1%, TAE 1X, teñidos con GelRed™ 1/10.000 y visualizados con luz ultravioleta en un GelDoc™ XR + (Image Lab™ Software) (Figura 1). Los fragmentos del tamaño esperado fueron cortados del gel, purificados usando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y cuantificados en un NanoDrop 2000.

Los fragmentos fueron clonados directamente en un plásmido de expresión usando el kit In-Fusion® HD Cloning siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con estos plásmidos, se transformaron células *E. coli* XL1-Blue que fueron plaqueadas en cajas de agar Luria Bertani (LB) con tetraciclina/ampicilina. Para detectar las colonias portadoras de plásmido

recombinante, se desarrolló una PCR colony usando iniciadores que alinean sobre el plásmido de expresión (Figura 2).

A las colonias portadoras del plásmido recombinante, se les hizo extracción de ADN plasmídico y éste se secuenció en el Laboratorio de secuenciación de ADN de la Universidad de los Andes (Bogotá, Colombia). Las secuencias fueron visualizadas y editadas usando el programa BioEdit. Para confirmar la identidad de las secuencias, se hizo un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

1.5 Obtención de las proteínas recombinantes

Una vez confirmada la identidad del gen de interés dentro del plásmido de expresión, se transformaron células M15 de *E. coli* con cada plásmido y se procedió a realizar pruebas de inducción, en condiciones óptimas de densidad óptica del cultivo no inducido, concentración de IPTG y temperatura de inducción (Tabla 2). Se procedió a escalonar, en condiciones adecuadas, el cultivo bacteriano para producir masivamente las proteínas de interés.

Tabla 2. Condiciones de inducción de cada una de las proteínas recombinantes

Proteína **Condiciones**	**CWP1**	**Alfa Giardina 7.3**	**Kinesina**
Densidad Óptica	0,3	0,3	0,8
Concentración IPTG	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
Temperatura de Incubación	25º C	18º C	18º C
Tiempo	18 horas	18 horas	18 horas

La extracción de la proteína recombinante en su forma nativa, se realizó utilizando un amortiguador de lisis que contenía PBS 0.1X y tritón X-100 al 0,1%, sonicando en Ultrasonic processor GEX 130 con amplitud del 65% y en 3 ciclos de 20 segundos. Los lisados de la proteína recombinante nativa, se purificaron por afinidad en resina de Níquel (Ni+2) (columnas de resina Ni2+-NTA-Agarose (QIAGEN, Inc., Hilden, Germany), Figura 3.

La proteína recombinante purificada por afinidad fue separada por SDS-PAGE. Para obtener una proteína libre de sales o compuestos que pudieran interferir con las metodologías subsecuentes, el siguiente paso fue dializar la proteína en amortiguador PBS 1X con 1% de glicerol a 4º C por 4 horas. Una vez concluido el proceso de diálisis, la proteína fue cuantificada en gel de SDS-PAGE utilizado una curva patrón de concentraciones conocidas de Albúmina Sérica Bovina (BSA), la imagen documentada de este gel fue usada para desarrollar un análisis densitométrico que permitió conocer la concentración de la proteína recuperada (Figura 4).

Para corroborar que la proteína recuperada es reconocida por los anticuerpos IgG policlonales anti aislamientos colombianos de *Giardia*, se hizo un Western Blot, el cual reveló el reconocimiento especifico de una sola banda del tamaño esperado (27.5 kDa para la proteína CWP1 y 34.2 kDa para la giardina alfa-7.3) (Figura 5).

1.6 Detección *in vitro* de antígenos de *Giardia* con potencial para el inmunodiagnóstico, a través de inmunoprecipitación y espectrometría de masas, metodologías universales.

Los anticuerpos desarrollados en conejo contra un pool 25 aislamientos colombianos de *Giardia*, se unieron a micro perlas magnéticas recubiertas de proteína A/G y este complejo fue usado para capturar proteínas presentes en el lisado de trofozoítos de *Giardia* mediante la técnica universal de inmunoprecipitación (IP).

Paralelamente, se desarrolló el mismo proceso usando anticuerpo pre-inmune, el cual fue tomado como el control de inespecificidad. Tras varios lavados, se eluyó la proteína retenida y se realizó análisis de espectrometría de masas LC/MS/MS (metodología universal). De esta forma se logró identificar 30 proteínas de *Giardia*, de las cuales al eliminar las que aparecieron en la elución del suero preinmune, solo quedaron 7 proteínas. Al hacer un análisis funcional de las proteínas restantes, se seleccionó una proteína estructural, que fue la Kinesina 3 (GL50803_112846). El diseño de iniciadores, la amplificación por PCR, la clonación y la expresión de esta proteína se hizo de igual forma que para las dos proteínas anteriores (Figuras 6 - 10).

EJEMPLO 2. Purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY.

2.1 Fase estacionaria

El Affigel 10® es una fase estacionaria comercial de BIO-RAD® compuesta de esferas de agarosa con N-Hidroxi-succimida ester que se acoplan a ligandos acuosos o no acuosos en solución. Se acoplaron al Affigel, sin denaturación, los antígenos de *Giardia* recombinantes desarrollados en el Instituto Nacional de Salud obtenidos de acuerdo al Ejemplo 1.

Se homogenizó uniformemente el affi-gel 10®, se retiró un mililitro de éste y se lavó con cinco volúmenes de isopropanol refrigerado a 4°C. Se adicionaron 0,5 ml de una solución que puede contener la combinación de dos o tres antígenos recombinantes o antígenos totales del parásito disueltos en buffer de fosfatos en concentración final de 30 mg, se agitó a 18°C durante una hora para obtener una suspensión uniforme, se bloquearon los grupos activos adicionando 0,1 ml de etanolamina HCl 1M (pH 8,0) durante una hora, y se transfirió a una

columna Econo-Pack de Biorad® de capacidad de 10ml. Finalmente se lavó con solución reguladora de bicarbonato hasta que el gel obtenido se encuentra libre de reactivos, lo cual se detectó por densidad óptica a una longitud de onda de 280nm.

2.2 Anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG desarrollados en conejo y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY desarrollados en gallina

Los anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia* presentes en yemas de huevo fueron desarrollados en gallinas inmunizadas con trofozoítos del parásito, en estudios anteriores, y las yemas de huevo almacenadas a -20°C. Se descongelaron a 4°C las yemas de huevo y se mezclaron con agua destilada estéril en proporción 1:9 v/v. Se filtró a través de gasa doble estéril y el filtrado se ajustó a pH 7,0 con NaOH 0,1N (García et al., 2005). Los anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* presentes en suero fueron desarrollados en conejo y previamente purificados mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio, en estudios anteriores, y posteriormente almacenados a -20°C (Duque et al., 2002). Se descongelaron a 4ºC y se purificaron mediante cromatografía de afinidad.

2.3 Purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y de anticuerpos policlonales anti-Giardia IgY, por cromatografía de afinidad.

Se adicionaron los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia*, independientemente, en la parte superior de la columna hasta saturar el gel, se removieron proteínas u otros solutos inespecíficos con cloruro de sodio (NaCl) 1M, se eluyeron los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia*, independientemente, con ácido propiónico 1M y se neutralizaron con una base (Bio-Rad®).

2.4 Determinación de la actividad biológica de los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia.*

Se determinó la actividad biológica de los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia*, independientemente, mediante Western Blot. Se realizó el reconocimiento de antígenos de trofozoíto de *Giardia* mediante el procedimiento descrito por Laemmli, 1970 y Towbin et al., 1979.

Se separaron las proteínas de trofozoítos de *Giardia* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes utilizando un gel separador de poliacrilamida del 12,5%. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (MNC) a 4°C/200 mA/130 voltios/26 vatios por 2 horas y se verificó la transferencia de las proteínas coloreando la MNC con rojo Ponceau S.

Se bloqueó la MNC con 4% de leche descremada disuelta en PBS-Tween 20 al 0,1% (PBS-T) a 18°C durante una hora, y se lavó tres veces con PBS-T, durante cinco minutos cada vez. Se agregó a la MNC anticuerpo policlonal IgG e IgY anti-*Giardia*, independientemente, en dilución 1:400, se incubó a 18°C por 18 horas y se lavó como se describió anteriormente. Se incubó la MNC a 18°C por 1 hora con una dilución 1:10.000, independientemente, de anti-IgG (Biorad®) y anti-IgY (Promega®) ambas unidas a fosfatasa alcalina. Se lavó la MNC dos veces con PBS-T y una vez con solución reguladora Tris-NaCl-MgCl. Se reveló la reacción con 5-bromo 4-cloro 3-indol fosfato (BCIP) y azul de nitrotetrazolio (NBT). La reacción se detuvo empleando una solución reguladora de la reacción enzimática (cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA).

EJEMPLO 3. Desarrollo del ELISA sándwich indirecto para detección de antígeno de *Giardia* en eluído de heces de gerbo, modelo animal para estudios de giardiosis.

3.1 Inmunoensayo enzimático ELISA sándwich indirecto:

Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG desarrollados en conejo, como primer capturador de antígeno de *Giardia* y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, desarrollados en gallina, como segundo capturador para la detección del parásito en materia fecal de gerbo. De igual manera, anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, desarrollados en gallina, como primer capturador de antígeno de *Giardia* y anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG, desarrollados en conejo, como segundo capturador para la detección del parásito en materia fecal de Gerbo.

Se determinaron las concentraciones óptimas de los biológicos para el ELISA como la concentración óptima de coproantígeno, anticuerpo policlonal anti-*Giardia* IgG, anticuerpo policlonal anti-*Giardia* IgY y conjugados comerciales (anti-IgG de conejo y anti-IgY de gallina ambos unidos a un reportero) siguiendo los lineamientos establecidos por Voller et al., 1976 y McLaren et al., 1981).

3.2 Estandarización de las concentraciones óptimas de los biológicos

Se utilizaron placas de poliestireno (Ref:95029380 Combiplate 12 x 25 flat bottom universal 250/crt, Labsystem®). Se realizaron diluciones de anticuerpo policlonal anti-*Giardia* IgG y anticuerpo policlonal anti-*Giardia* IgY, independientemente, en concentración final de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ml en solución reguladora 0,05M de carbonato/bicarbonato pH 9,6, se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones por triplicado en los pozos de las placas y se agitaron una vez durante cinco minutos o como

alternativa a tres rpm durante dos minutos utilizando un mezclador de placas (Titer plate Shaker. Lab Line Instruments. Inc.) con el fin de optimizar la adsorción de los anticuerpos policlonales a las placas. Se incubaron éstas en cámara húmeda a 4ºC durante 18 horas.
Se lavaron las placas tres veces consecutivas con solución reguladora de fosfatos 0,15M, pH 7,4 más 0,05% de Tween 20 (PBS-T) durante cinco minutos cada vez y como alternativa utilizando el lavador de placas automático (Wellwash 4 MK 2 Thermo labsystems®) cuatro veces durante dos minutos cada vez. Se bloquearon las placas con albúmina sérica bovina al 1% agregando 100µl en cada pozo y se agitaron una vez durante cinco minutos y como alternativa a tres rpm durante dos minutos. Se incubaron las placas en cámara húmeda a 18ºC durante una hora. Se retiró el exceso de albúmina sérica bovina lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y como alternativa utilizando el lavador de placas automático cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se realizó una dilución 1:1 de albúmina sérica bovina al 1% y de eluídos de materia fecal, independientemente, sin presencia de *Giardia* (muestras negativas), con presencia de *Giardia*, coproantígeno, (muestras positivas) y con presencia de *Trichomonas hominis*, parásito intestinal diferente a *Giardia*, (muestras de reacción cruzada) y se adicionaron 100µl de éste en cada uno de los pozos que contienen los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgY, independientemente, adsorbidos en las placas y éstas se agitan una vez durante cinco minutos y como alternativa a tres rpm durante dos minutos.

Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de eluído de materia fecal lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y como alternativa utilizando el lavador de placas automático cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se realizaron diluciones de anticuerpo policlonal anti-*Giardia* IgG e IgY, independientemente, en concentración final de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ml en PBS-T y se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones por triplicado en los pozos de las placas. Se agitaron las placas una vez durante cinco minutos o, como alternativa, a tres rpm durante dos minutos con la finalidad de homogenizar la reacción. Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de anticuerpos policlonales tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y, como alternativa, utilizando el lavador de placas cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se prepararon, independientemente, diluciones en PBS-T del conjugado IgG anti-conejo desarrollado en cabra (Biorad®) y del conjugado IgG anti-gallina desarrollado en cabra (Promega®) ambos unidos a la enzima fosfatasa alcalina en diluciones con concentración final de 1:500, 1:1000; 1:2000; 1:5000 y 1:10,000. Se adicionaron 100 µl en cada pozo de

las placas, se agitaron éstas una vez durante cinco minutos y, como alternativa, a tres rpm durante dos minutos con la finalidad de homogenizar la reacción.

Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de conjugado lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y, como alternativa, utilizando el lavador de placas cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se adicionaron 100µl de sustrato (p-nitrofenilfosfato) en concentración 1mg/ml de solución reguladora de dietanolamina 0,1M, pH 9,8.

Se incubaron las placas a 18 ºC durante 30 minutos. Se detuvo la reacción enzima-sustrato con 25 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 3N. Se determinó el valor de densidad óptica a una longitud de onda de 405nm en un Multiscan EX®.

3.3 Validación (determinación de la discriminación diagnóstica) del ELISA sándwich indirecto para la detección de antígeno de *Giardia* en eluídos de materia fecal de gerbo, modelo animal para estudios de giardiosis.

Muestras de heces (Eluídos de materia fecal) de Gerbo:

Se calculó el tamaño de muestra mínimo necesario en Epidat 2 con base en los siguientes supuestos: Un nivel de confianza del 95%, una diferencia de las medias muestrales que no excede la diferencia de medias verdaderas en un porcentaje mayor del 12%, una desviación estándar de la densidad óptica de la población de gerbos infectados de 0,40 y una desviación estándar de la densidad óptica de la población de gerbos no infectados de 0,10.

De acuerdo con lo anterior, el tamaño de muestra total de heces para la evaluación de la prueba inmunoenzimática para detección de antígeno en materia fecal fue de 92 muestras (46 materias fecales sin y 46 con presencia de *Giardia*, muestras positivas y negativas, respectivamente). Adicionalmente se evaluaron 13 muestras de materia fecal de Gerbo infectados naturalmente con *Trichomonas hominis* (Reacción cruzada).

3.4 Discriminación diagnóstica

Una vez se hubo determinado las concentraciones de los biológicos para realizar el ELISA, se procedió a detectar antígeno de *Giardia* en los eluídos de las heces de los Gerbos infectados y no infectados mediante ELISA para establecer el valor de absorbancia que permitió discriminar entre presencia y ausencia de antígeno de Giardia (Kurstak, 1985). Se evaluó el ELISA determinando los parámetros de: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) y concordancia (índice Kappa), con sus intervalos de confianza del 95% utilizando una tabla de contingencia de 2 x 2 (Griner et al., 1981).

EJEMPLO 4. Detección de antígeno de *Giardia* en eluídos de heces humanas utilizando el ELISA desarrollado en Gerbo.

4.1 Muestra de heces humanas (eluídos de materia fecal):

Se utilizaron eluídos de materia fecal humana con presencia de *Giardia* (muestras positivas), ausencia del parásito (muestras negativas) y presencia de otros parásitos intestinales (reacción cruzada), almacenados en el Banco de Muestras del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (Bogotá, Colombia).

El tamaño de muestra mínimo necesario se calculó en Epidat 2 con base en los siguientes supuestos: Un nivel de confianza del 95%, una diferencia de las medias muestrales que no excediese la diferencia de medias verdaderas en un porcentaje mayor del 12%, una desviación estándar de la densidad óptica de la población humana infectada con *Giardia* de 0,40 y una desviación estandar de la densidad óptica de la población humana no infectada con el parásito de 0,20.

De acuerdo con lo anterior, el tamaño de muestra total de heces para la evaluación de la prueba inmunoenzimática para detección de antígeno en materia fecal humana fue de 92 muestras: 46 materias fecales con presencia de *Giardia* (muestras positivas) y 46 heces con ausencia del parásito (muestras negativas). Adicionalmente, se evaluaron 39 muestras de materia fecal humana infectadas con otros parásitos intestinales diferentes a *Giardia* (Reacción cruzada).

Tabla 3. **Parásitos intestinales identificados en materia fecal humana**

Identificación de parásitos intestinales	**Número de heces humanas**
Ausencia de *Giardia duodenalis* y de otros parásitos intestinales	46
Giardia duodenalis	46
Parásitos intestinales diferentes a *Giardia duodenalis*:	39
Complejo *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar*	1
Entamoeba coli	7
Endolimax nana	1
Chilomastix mesnili	1
Trichomonas hominis	1
Blastocystis hominis	1
Strongyloides stercoralis	1
Uncinaria	1
Entamoeba coli, Chilomastix mesnili	6

Identificación de parásitos intestinales	Número de heces humanas
Endolimax nana, Chilomastix mesniii	2
Entamoeba coli, Endolimax nana	2
Entamoeba coli, Chilomastix mesnili	1
Chilomastix mesnili, Blastocystis hominis	1
Chilomastix mesnili, Trichuris trichiura	1
Entamoeba coli, Trichuris trichiura	1
Entamoeba coli, Uncinaria,	1
Trichuris trichiura, Hymenolepis diminuta	1
Entamoeba coli, Endolimax nana, Chilomastix mesnilii	6
Entamoeba coli, Iodamoeba bustchlii, Blastocystis hominis	1
Entamoeba coli, Endolimax nana, Chilomastix mesnili, Blastocystis hominis	2

4.2 Discriminación diagnóstica para la detección de *Giardia* en eluídos de materia fecal humana mediante ELISA sándwich indirecto:

Se utilizaron las concentraciones óptimas de los biológicos determinadas para la detección de antígeno de *Giardia* en heces de gerbo, modelo animal para estudios de giardiosis. Se emplearon placas de poliestireno (Ref:95029380 Combiplate 12 x 25 flat bottom universal 250/crt, Labsystem®).

Se realizaron diluciones de anticuerpo policlonal IgG e IgY anti-Giardia, independientemente, en concentración final de 10 µg/ml en solución reguladora 0,05M de carbonato/bicarbonato pH 9,6, se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones por triplicado en los pozos de las placas y se agitaron una vez durante cinco minutos y como alternativa a tres rpm durante dos minutos utilizando un mezclador de placas (Titer plate Shaker. Lab Line Instruments. Inc.) con el fin de optimizar la adsorción de los anticuerpos policlonales a las placas.

Se incubaron éstas en cámara húmeda a 4ºC durante 18 horas. Se lavaron las placas tres veces consecutivas con solución reguladora de fosfatos 0,15M, pH:7,4 más 0,05% de Tween 20 (PBS-T) durante cinco minutos cada vez y, como alternativa, utilizando el lavador de placas automático (Wellwash 4 MK 2 Thermo labsystems®) cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se bloquearon las placas con albúmina sérica bovina al 1% agregando 100µl en cada pozo y se agitaron una vez durante cinco minutos y, como alternativa, a tres rpm durante dos minutos. Se incubaron las placas en cámara húmeda a 18ºC durante una hora. Se retiró el

exceso de albúmina sérica bovina lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y como alternativa utilizando el lavador de placas automático cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se realizó una dilución 1:1 de albúmina sérica bovina al 1% y de eluídos de materia fecal, independientemente, sin presencia de *Giardia* (muestras negativas), con presencia de *Giardia*, coproantígeno, (muestras positivas) y con presencia de otros parásitos intestinales diferentes a *Giardia*, (muestras de reacción cruzada) y se adicionaron 100µl de éste en cada uno de los pozos que contienen los anticuerpos policlonales IgG o IgY anti-Giardia, independientemente, adsorbidos en las placas y éstas se agitaron una vez durante cinco minutos y, como alternativa, a 3 rpm durante dos minutos.

Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de eluído de materia fecal lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y, como alternativa, utilizando el lavador de placas automático cuatro veces durante dos minutos cada vez. Se realizaron diluciones de anticuerpo policlonal IgG e IgY anti-*Giardia* en concentración final de 10 µg/ml en PBS-T y se adicionaron 100 µl de cada una de las diluciones por triplicado en los pozos de las placas.

Se agitaron las placas una vez durante cinco minutos y como alternativa a tres rpm durante dos minutos con la finalidad de homogenizar la reacción. Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de anticuerpos policlonales tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez y, como alternativa, utilizando el lavador de placas cuatro veces durante dos minutos cada vez.

Se prepararon diluciones, en PBS-T, del conjugado IgG anti-conejo desarrollado en cabra (Biorad®) unido a la enzima fosfatasa alcalina en dilución con concentración final de 1:1000. Se adicionaron 100 µl en cada pozo de las placas, se agitan éstas una vez durante cinco minutos y, como alternativa, a 3 rpm durante dos minutos con la finalidad de homogenizar la reacción.

Se incubaron las placas en cámara húmeda a 37ºC durante una hora. Se retiró el exceso de conjugado lavando tres veces consecutivas con PBS-T durante cinco minutos cada vez o, como alternativa, utilizando el lavador de placas cuatro veces durante dos minutos cada vez. Se adicionaron 100µl de sustrato (p-nitrofenilfosfato) en concentración 1mg/ml de solución reguladora de dietanolamina 0,1M, pH 9,8. Se incubaron las placas a 18ºC durante 30 minutos y se detuvo la reacción enzima-sustrato con 25 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 3N. Se determinó el valor de densidad óptica a una longitud de onda de 405nm en un MultiscanEX®.

EJEMPLO 5. Resultados de la infección a gerbos con quistes de aislamientos colombianos de *Giardia*.

Infección a gerbos con quistes de aislamientos colombianos de Giardia

La infección de los ejemplares se logró con la inoculación de 5 x 10^3 quistes de *Giardia*/ml y el curso de la infección corroborada, diariamente, durante 30 días consecutivos mediante el diagnóstico parasitológico permitió identificar la presencia de quistes o trofozoítos de *Giardia* en las heces de los Gerbos. Así, aunque no se observaron quistes del parásito en algunas heces de gerbos infectados se sabía con exactitud que existía antígeno del parásito en sus materias fecales por la infección experimental con *Giardia* que se había realizado a los gerbos.

El curso de la infección presentó un patrón intermitente de excreción de quistes del parásito con ausencia de éstos en los días 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19 y a partir del día 21 al 30 pos-infección y con presencia constante de quistes de *Giardia* durante los días 5, 6, 9, 14, 17 y 20 pos-infección (Figura (11). Durante este periodo, el promedio de la concentración de quistes del parásito varió dentro del rango de 2 (log10: 0,30) a 17 (log10: 1,23) quistes liberados durante dos horas de recolección.

Debido a la gran diferencia en los órdenes de magnitud entre el número de quistes y el de trofozoítos obtenidos en la recolección, y para poder visualizar gráficamente el comportamiento de liberación de éstos, se recurrió a la transformación logarítmica de los datos. El número de trofozoítos de *Giardia* recuperados del intestino delgado fue diferente en cada una de las observaciones realizadas con un rango entre 15.000 (log10: 4,2) y 6.577.778 (log10: 6,8) trofozoítos/ml.

Aislamiento de trofozoítos de Giardia del intestino delgado de gerbos y mantenimiento in vitro de los trofozoítos del parásito

Los trofozoítos de *Giardia* se obtuvieron a los 7, 14, 21, 28 y 30 días pos-infección de cada uno de los intestinos delgados resecados de cada uno de los gerbos que habían sido previamente infectados con el parásito. La resección del intestino delgado de gerbos infectados con *Giardia* permitió aislar trofozoítos del parásito, mantenerlos *in vitro*, obtener cultivo en masa de éstos y preparar antígeno de trofozoíto de *Giardia* en una concentración de 30 mg/ml. Los trofozoítos de *Giardia* obtenidos de los intestinos resecados de los gerbos infectados con el parásito se mantuvieron *in vitro* lográndose incrementar la población del parásito hasta un número de 1 x 10^6 trofozoítos/ml.

Utilidad de IgY anti-Giardia de aislamientos colombianos para detectar antígeno del parásito en materia fecal humana y de gerbo (modelo animal para estudios de giardiosis)

Preparación de antígeno de trofozoíto de *Giardia*: El antígeno de *Giardia* se elaboró acorde con la metodología propuesta y la concentración de proteína determinada por el método de Bradford fue de 1,2 mg/ml.

EJEMPLO 6. Anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY

*Purificación por cromatografía de afinidad, de anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-Giardia***.** Se obtuvieron concentraciones de IgG e IgY anti-*Giardia* de 5 mg/ml y 25 mg/ml, respectivamente.

Determinación de la actividad biológica de los anticuerpos policlonales IgG anti-Giardia desarrollados en conejo y de los anticuerpos policlonales IgY anti-Giardia desarrollados en gallina

Western Blot: La actividad biológica de los anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* desarrollados en conejo y los anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia* desarrollados en gallina, ambos purificados independientemente por cromatografía de afinidad, fue demostrada por la presencia de bandas que indican la unión de antígeno (trofozoíto de *Giardia*) y anticuerpo (anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia*) o la unión de antígeno (trofozoíto de *Giardia*) y anticuerpo (anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia*) (Figura 12).

Los antígenos específicos de trofozoíto de *Giardia* reconocidos por los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia* mediante Western Blot oscilaron entre 24 y 125 kDa y purificados mediante cromatografía de afinidad corresponden a pesos moleculares de 94, 78, 64, 31 y 30 kDa y de 86, 72, 60, 30 y 27 kDa, respectivamente.

EJEMPLO 7. ELISA sándwich indirecto para la detección de antígeno de *Giardia* utilizando IgY anti-*Giardia*, (primer capturador) e IgG anti-*Giardia* (segundo capturador) ambos purificados por cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos policlonales IgG e IgY anti-*Giardia* fueron purificados por cromatografía de afinidad utilizando en una columna antígeno total de *Giardia*. El policlonal IgY anti-*Giardia* se utiliza directamente en el ELISA como primer capturador. El anticuerpo policlonal IgG anti-*Giardia* fue repurificado utilizando una matriz que contiene los tres antígenos recombinantes de *Giardia* y es el que actúa como segundo capturador y al cual se une el conjugado anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Lo anterior permite mayor

sensibilidad y especificidad del ELISA en la detección de *Giardia* en eluídos de materia fecal.

Estandarización de las concentraciones óptimas de los biológicos para el ELISA

La utilización de este esquema para la captura de antígeno del parásito en los eluídos de heces del gerbo permitió establecer concentraciones óptimas de los anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* e IgY anti-*Giardia* de 10 µg/ml (figura 14) y de una dilución de 1:1000 de conjugado anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (figura 15).

Discriminación diagnóstica

Los parámetros del ELISA sándwich indirecto para la detección de antígeno de *Giardia* en eluído de heces de gerbo, modelo animal para estudios de giardiosis utilizando IgY anti-*Giardia*, (primer capturador) e IgG anti-*Giardia* (segundo capturador) ambos purificados por cromatografía de afinidad fueron: sensibilidad (S): 100%, especificidad (E): 100%, valor predictivo positivo (VPP): 100% y valor predictivo negativo (VPN): 100%.

Estos parámetros son confiables, aunque en el curso de la infección no se hayan observado en las heces quistes del parásito en los días 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19 y a partir del día 21 al 30 pos-infección y sólo presencia constante de quistes de *Giardia* durante los días 5, 6, 9, 14, 17 y 20 pos-infección.

Este es el fenómeno natural de excreción intermitente de quistes, inherente a la biología del parásito e independiente del hospedero. Por ello las densidades ópticas que indican positividad, aunque haya ausencia de quistes en el parásito, son confiables porque se conocía con exactitud que las heces provenían de gerbos infectados con el parásito desde el día cero de la infección hasta el día 30 cuando los animales resuelven por sí mismos la infección (Figura 16).

Detección de antígeno de *Giardia* en eluídos de heces humanas utilizando el ELISA sándwich indirecto desarrollado para detectar antígeno de *Giardia* en gerbo modelo animal para estudios de giardiasis.

Discriminación diagnóstica

Los parámetros del ELISA para la detección de *Giardia* en eluídos de materia fecal humana utilizando IgY anti-*Giardia* como primer capturador e IgG anti-*Giardia* como segundo capturador y ambas purificadas por cromatografía de afinidad, fueron: sensibilidad (S):

100%, especificidad (E): 100%, valor predictivo positivo (VPP): 100% y valor predictivo negativo (VPN): 100%.

EJEMPLO 8. Kit diagnóstico para detectar antígenos de *Giardia* por la metodología del dot-ELISA

Se realizó una dilución de 148 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-quiste y anti-trofozoito de *Giardia* en solución reguladora de fosfatos (PBS). Se adicionó 1 µl de anticuerpo policlonal a un círculo de membrana de nitrocelulosa (MNC) de un centímetro de diámetro.

Se incubó a 37°C durante 36 segundos por cada muestra de anticuerpo policlonal a secar. Se bloqueó cada círculo de MNC, individualmente, con 4% de leche descremada disuelta en PBS más 1% Tween 20 (PBS-T) a 18ºC durante una hora. Se retiró el exceso de solución bloqueadora mediante inversión. Se adicionaron 500 µl de cada una de las siguientes muestras, independientemente:

- Eluído de materia fecal sin presencia de *Giardia* diagnosticada parasitológicamente (control negativo).
- Eluído de muestra fecal con presencia de *Giardia* diagnosticada parasitológicamente (control positivo).
- Eluído de materia fecal para detectar la presencia de antígeno de *Giardia* o no.

Se incubaron las muestras a 18ºC durante 30 minutos. Se retiró el eluído de heces mediante inversión. Se adicionaron 500 µl de PBS-T a cada círculo de MNC, individualmente. Se eliminó éste mediante inversión y se repitió el procedimiento cinco veces consecutivas.

Se adicionaron 500 µl de anticuerpo policlonal anti-quiste y anti-trofozoito de *Giardia* en una concentración de de 148 µg/ml de PBS. Se incubó a 18ºC durante 30 minutos. Se retiró el anticuerpo policlonal mediante inversión. Se adicionaron 500 µl de PBS-T a cada círculo de MNC, individualmente. Se eliminó éste mediante inversión y se repitió el procedimiento cinco veces consecutivas. Se adicionaron 500 µl de anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (conjugado). Se incubó durante 30 minutos. Se eliminó el conjugado mediante inversión.

Se adicionaron 500 µl de PBS-T a cada círculo de MNC, individualmente. Se eliminó éste mediante inversión y se repitió el procedimiento cuatro veces consecutivas. Se lavó cada círculo de MNC una vez con solución reguladora de fosfato específica para la enzima fosfatasa alcalina (solución reguladora AP). Se descartó la solución AP mediante inversión.

Se agregaron 50 µl de bromo-cloro-indolil-fosfato, 50 µl de azul de nitro-tetrazolium y 400 µl de solución AP. Se permitió el desarrollo de la reacción enzima-sustrato a 18ºC durante 10 minutos. Se detuvo la reacción con 500 µl de PBS más 20mM de EDTA.

La reacción de color púrpura indicó la unión de antígeno-anticuerpo reacción positiva, y la ausencia de color reacción negativa (Figura 18).

REIVINDICACIONES

1) Una fase estacionaria para purificar anticuerpos anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia* IgY, que comprende:

a) un soporte resistente, permeable y reactivo de matriz de polisacáridos o de matriz sintética; y
b) una mezcla de dos o más proteínas antigénicas recombinantes, seleccionadas de CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3, incorporadas en un buffer.

2) La fase estacionaria de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el soporte. resistente, permeable y reactivo de matrices de polisacáridos se selecciona entre agarosa, celulosa, y dextrano, y la matriz sintética se selecciona entre vidrio y poliacrilamida.

3) La fase estacionaria de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, donde las dos o más proteínas antigénicas recombinantes están unidas al soporte mediante N-hidroxi-succimida éster y resuspendidas en un buffer de fosfato, citrato o acetato con pH entre 6,0 y 8,0.

4) Un método para purificar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y/o anti-*Giardia* IgY, por cromatografía de afinidad, que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una fase estacionaria de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3;
b) bloquear los grupos activos;
c) transferir la fase estacionaria a una columna y lavar con solución reguladora de bicarbonato;
d) adicionar anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* a la fase estacionaria hasta que se sature el gel y de igual manera, pero independientemente, realizar el proceso con IgY anti-*Giardia*;
e) remover proteínas u otros solutos inespecíficos;
f) eluir los anticuerpos policlonales IgG anti-*Giardia* o anti-*Giardia* IgY específicos que se habían adicionado independientemente; y
g) neutralizar.

5) Anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG y/o anti-*Giardia* IgY, purificados según el método de la Reivindicación 4, que se unen específicamente a los antígenos recombinantes CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3.

6) Una prueba diagnóstica *in vitro* para la detección de antígenos de *Giardia* en muestras biológicas o ambientales que comprende las siguientes etapas:

a) adicionar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia* IgY, de acuerdo con la Reivindicación 5 (anticuerpos de captura), en una fase sólida o matriz;
b) incubar la matriz y lavarla;
c) bloquear;
d) incubar y lavar;
e) poner en contacto la muestra biológica o ambiental con la matriz que contiene los anticuerpos policlonales anti-*Giardia*, e incubar;
f) retirar el exceso de muestra;
g) adicionar anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia* IgY purificados;
h) agitar, incubar, retirar el exceso de anticuerpos;
i) adicionar un conjugado de anticuerpo-anti-IgG de conejo o anti-IgY de gallina unido a un reportero;
j) agitar, incubar, retirar el exceso de conjugado;
k) realizar la detección;
l) incubar, detener la reacción cuando sea necesario.

7) La prueba diagnóstica de acuerdo con la Reivindicación 6, donde la muestra ambiental es agua.

8) Un kit diagnóstico para detectar antígenos de *Giardia* que comprende los siguientes componentes:

a) una matriz sólida;
b) anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG o anti-*Giardia* IgY de acuerdo con la Reivindicación 5;
c) un conjugado de anticuerpo anti-*Giardia* unido a un reportero;
d) un reactivo de detección cuando sea necesario.

9) El kit de acuerdo con la Reivindicación 8, donde la matriz sólida se selecciona de una matriz sólida plástica como tubos, perlas, placas u otros; de material poroso como papel de nitrocelulosa, acetato de celulosa, celulosa regenerada, nylon, polifluoruro de vinilideno (PVDF) entre otros que pueden tener diferente forma, y materiales fibrosos como fibra de vidrio entre otros.

10) El kit de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 o 9, donde el reportero de detección puede ser de naturaleza enzimática, fluorescente, luminiscente o cromóforo que se une al complejo antígeno-anticuerpo y que produce una señal detectable en presencia de este reportero.

****

RESUMEN

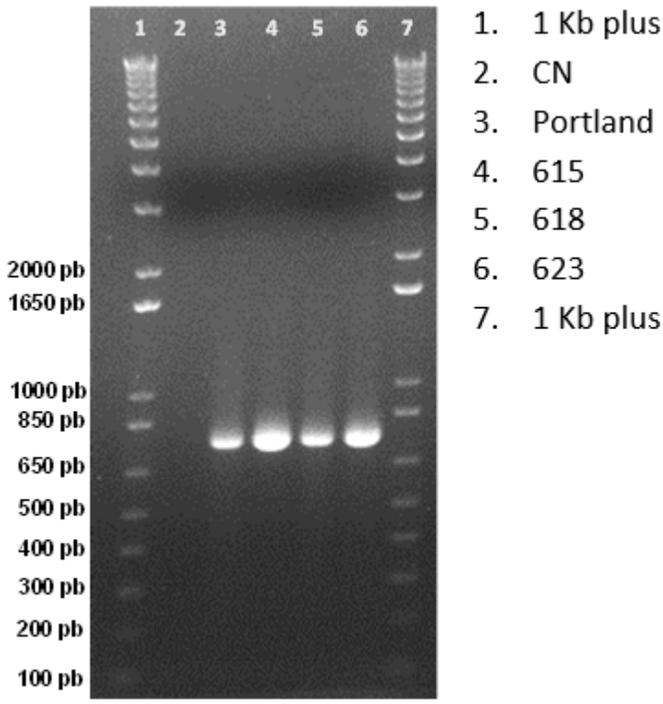
La presente invención se refiere a una fase estacionaria para la purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY, así como a un método para la purificación de anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY por cromatografía de afinidad . La invención también se refiere a los anticuerpos policlonales anti-*Giardia* IgG e IgY purificados mediante cromatografía de afinidad, que se unen específicamente a las proteínas antigénicas CWP1, alfa giardina 7.3 y Kinesina 3.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de diagnóstico de giardiasis, por detección de antígenos de *Giardia* en una muestra determinada, y a un kit para diagnóstico de giardiasis en muestras biológicas y ambientales.

FIGURAS

Figura 1.

A.



B.

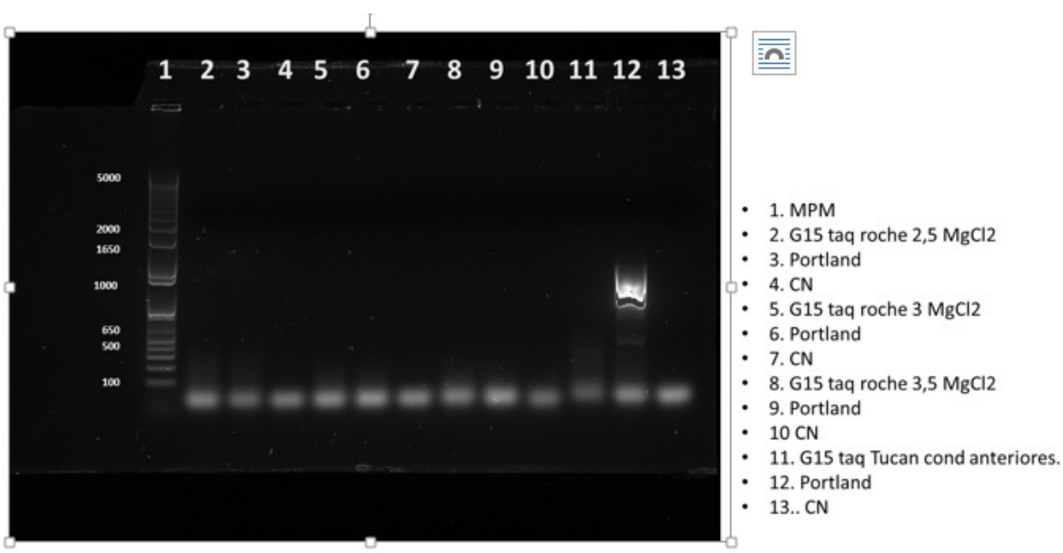
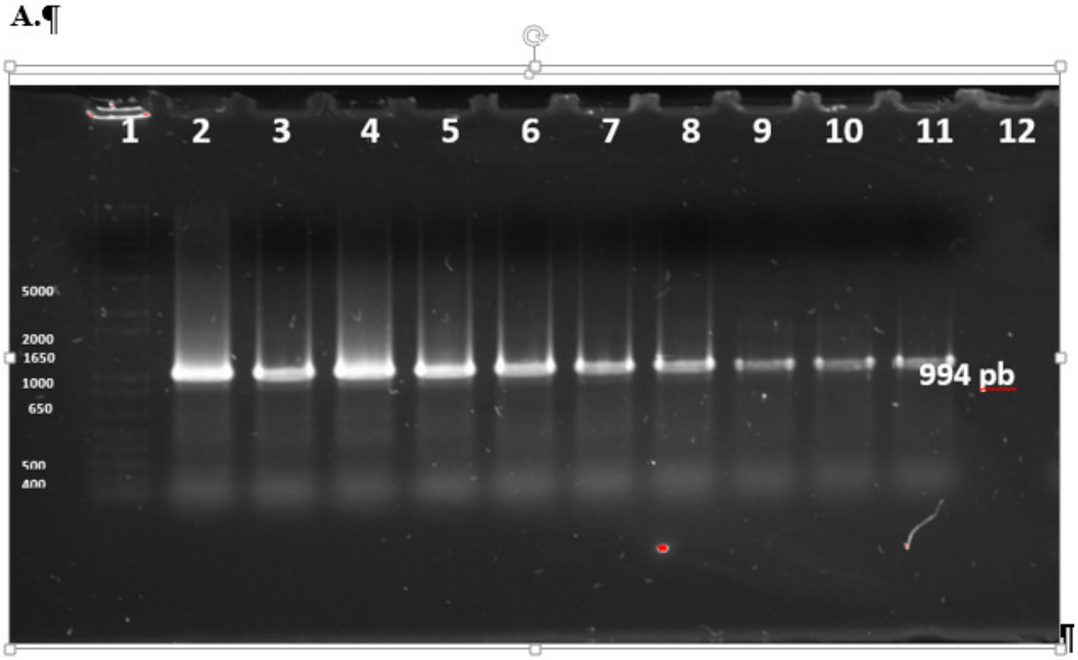


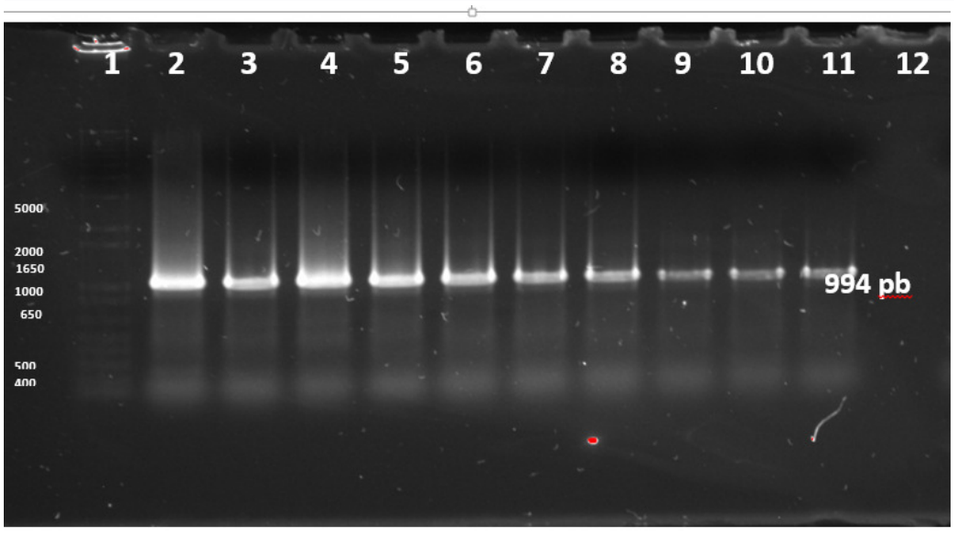
Figura 2.

~~A.~~

A.



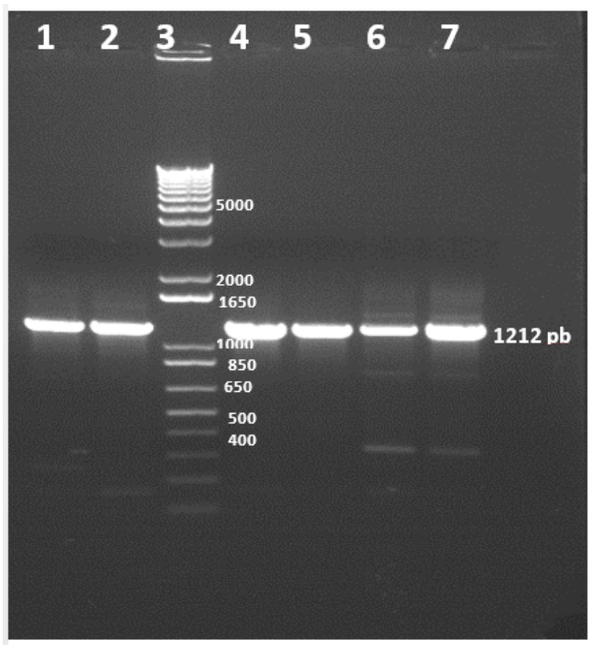
1. → PM Kb
2. → Colonia 1
3. → Colonia 2
4. → Colonia 3
5. → Colonia 4
6. → Colonia 5
7. → Colonia 6
8. → Colonia 7
9. → Colonia 8
10. → Colonia 9
11. → Colonia 10
12. → Control negativo



~~1. PM Kb~~
~~2. Colonia 1~~
~~3. Colonia 2~~

~~4. Colonia 3~~
~~5. Colonia 4~~
~~6. Colonia 5~~
~~7. Colonia 6~~
~~8. Colonia 7~~
~~9. Colonia 8~~
~~10. Colonia 9~~
~~11. Colonia 10~~
~~12. Control negativo~~

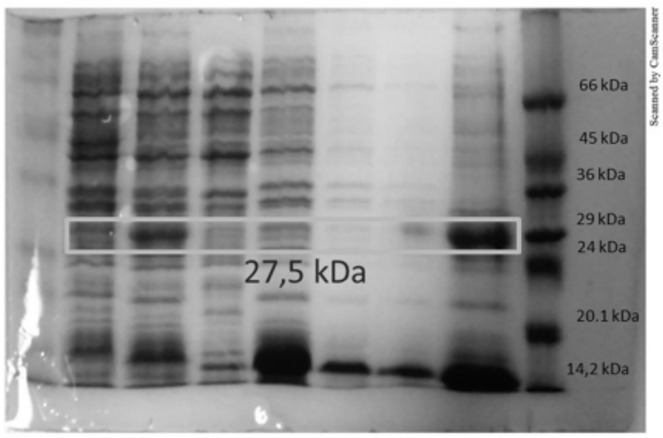
B.



1. Colonia 5
2. Colonia 11
3. 1 Kb plus de Invitrogen®
4. Colonia 30
5. Colonia 34
6. Colonia 44
7. Colonia 51

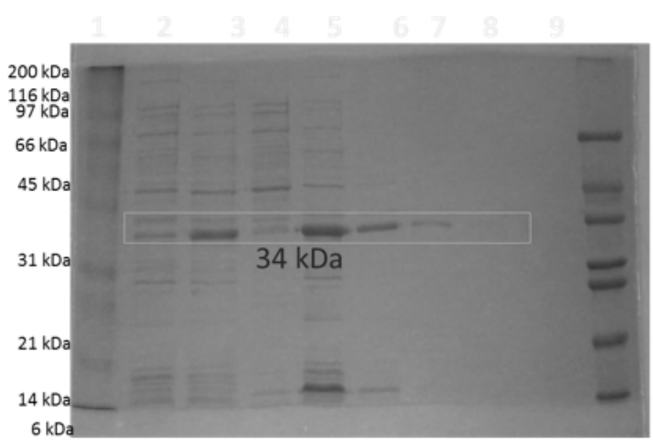
Figura 3.

A.



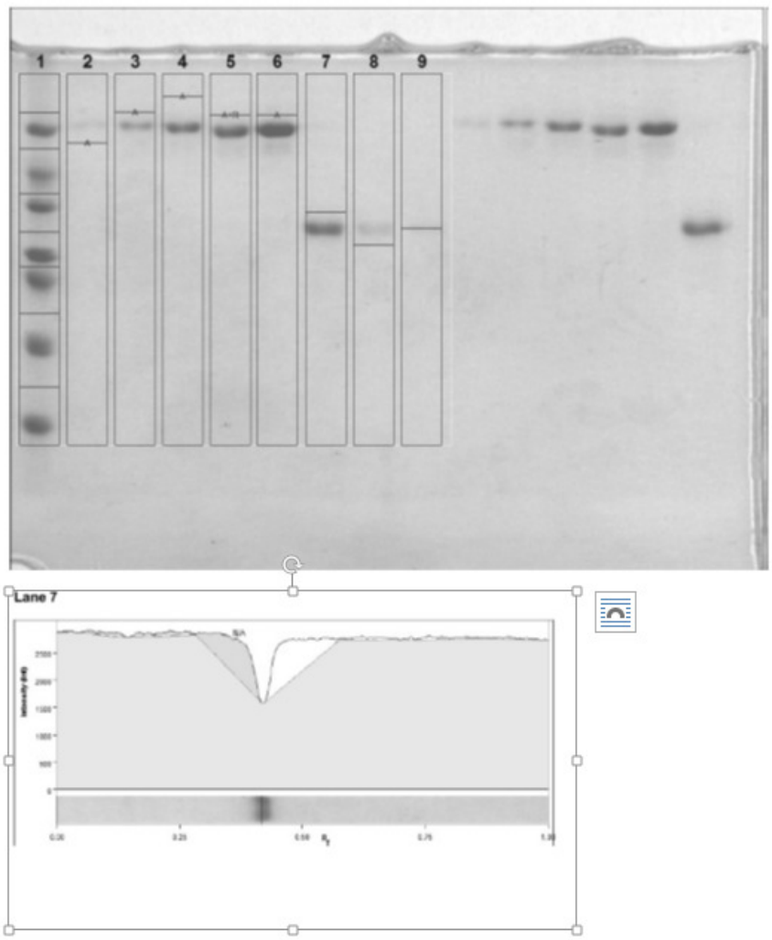
1. PM
2. Proteína No Inducida
3. Proteína Inducida
4. Lisis nativa 1
5. Lisis nativa 2
6. Lisis nativa 3
7. Lisis nativa 4
8. Lisis denaturante
9. PM

B.



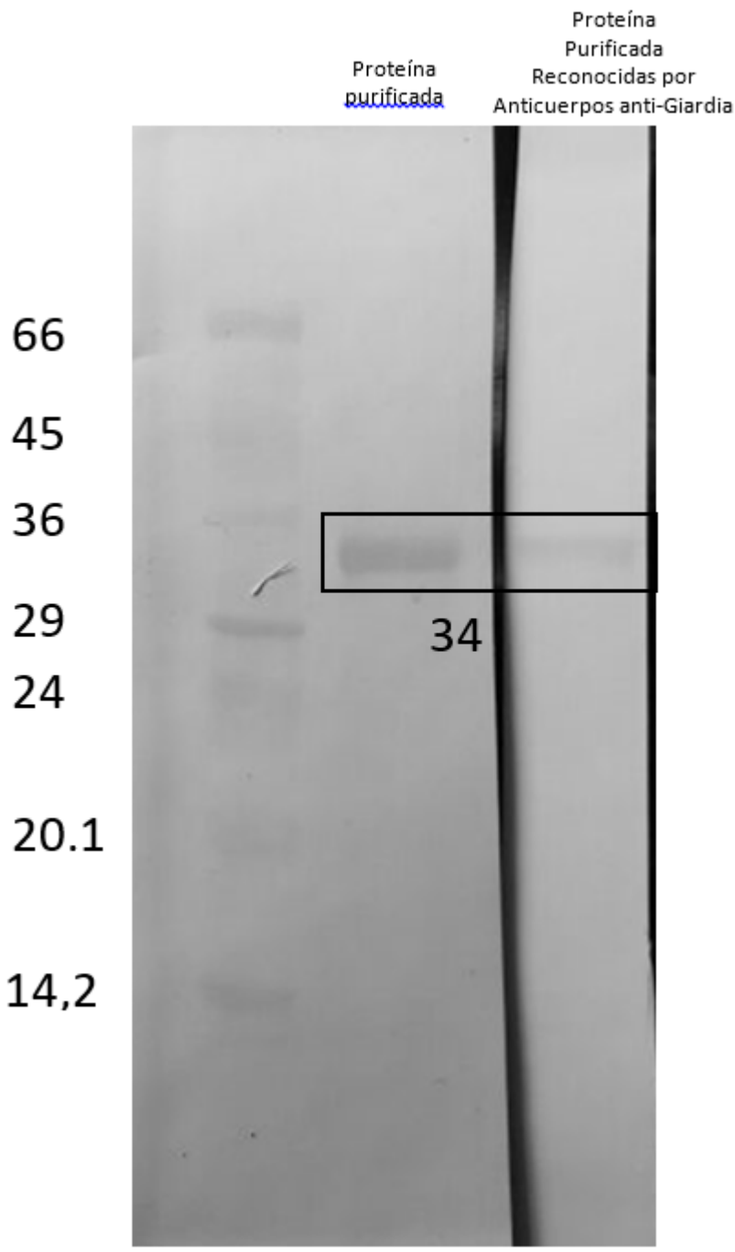
1. PM
2. Proteína Inducida
3. Proteína No Inducida
4. Lisis nativa 1
5. Lisis nativa 2
6. Lisis nativa 3
7. Lisis nativa 4
8. Lisis nativa 5
9. Lisis denaturante

Figura 4.



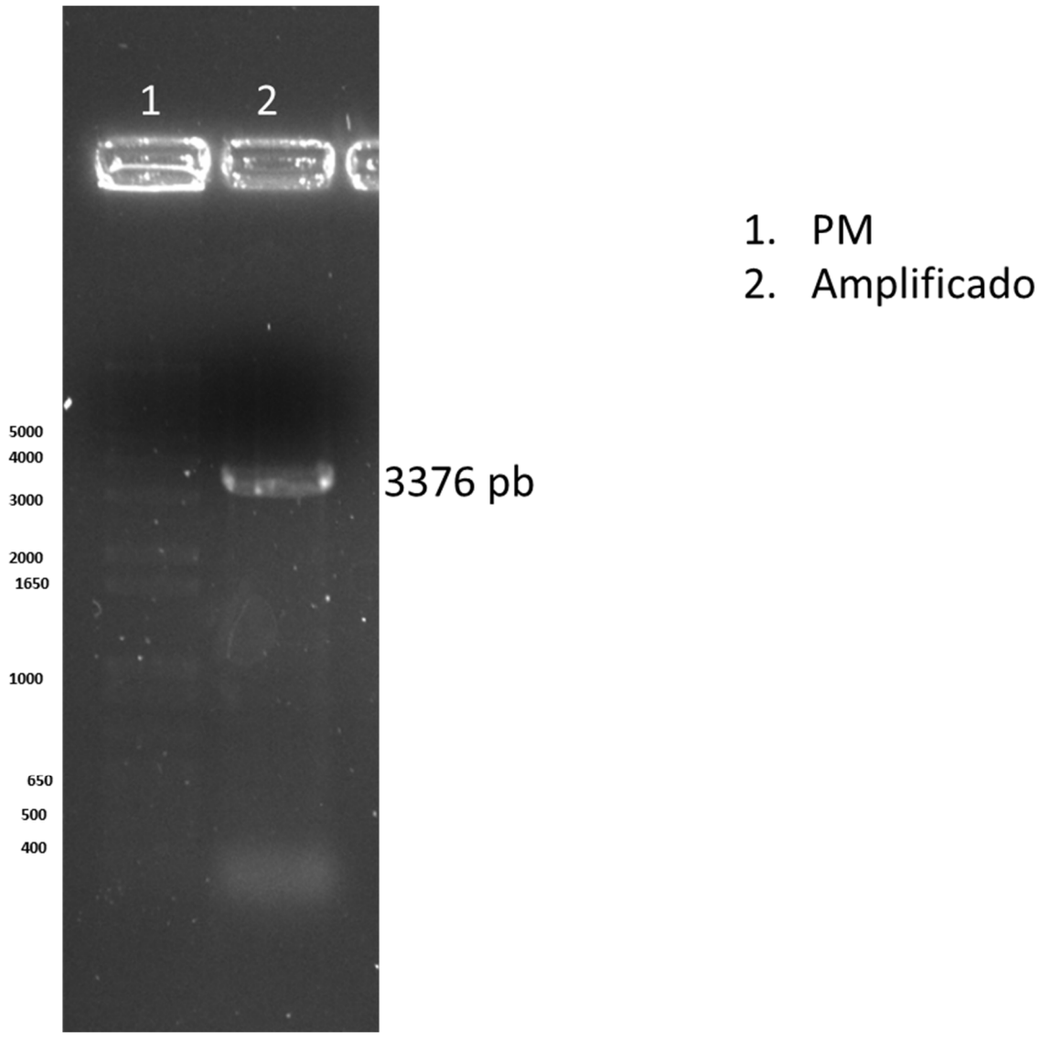
Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (mg)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0,373	3.601.136	91,8	1,04	100,0	45,6

Figura 5.


Proteína purificada
Proteína Purificada Reconocidas por Anticuerpos anti-Giardia
66
45
36
29
24
20.1
14,2
34

5

Figura 6.

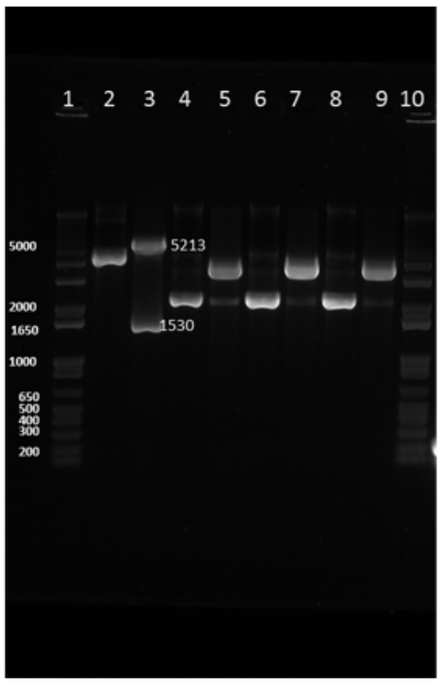

1
2
5000
4000
3000
2000
1650
1000
650
500
400
3376 pb
1. PM
2. Amplificado

5

Figura 7.

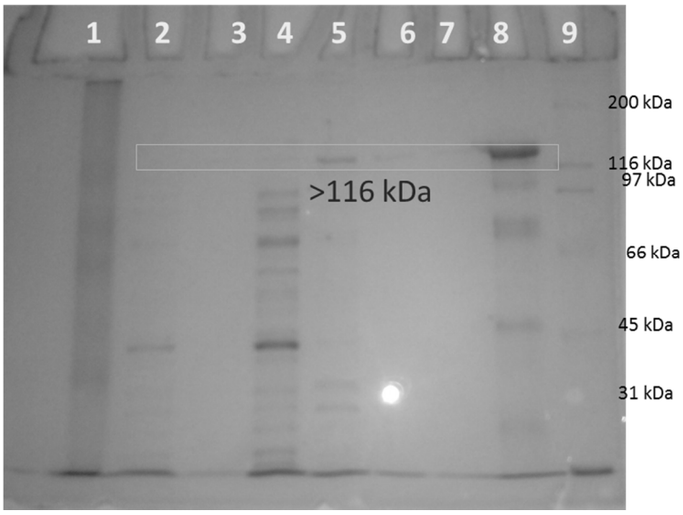
1. PM
2. Colonia 1
3. Colonia 2
4. Colonia 3
5. Colonia 4
6. Colonia 6
7. Colonia 7
8. Control

Figura 8.



1. PM
2. Plasmido no digerido Colonia 1
3. Plasmido digerido Colonia 1
4. Plasmido no digerido Colonia 2
5. Plasmido digerido Colonia 2
6. Plasmido no digerido Colonia 3
7. Plasmido digerido Colonia 3
8. Plasmido no digerido Colonia 4
9. Plasmido digerido Colonia 4
10. PM

Figura 9.



1. PM
2. Proteína No Inducida
3. Proteína Inducida
4. Lisis nativa 1
5. Lisis nativa 2
6. Lisis nativa 3
7. Lisis nativa 4
8. Lisis denaturante
9. PM

Figura 10.

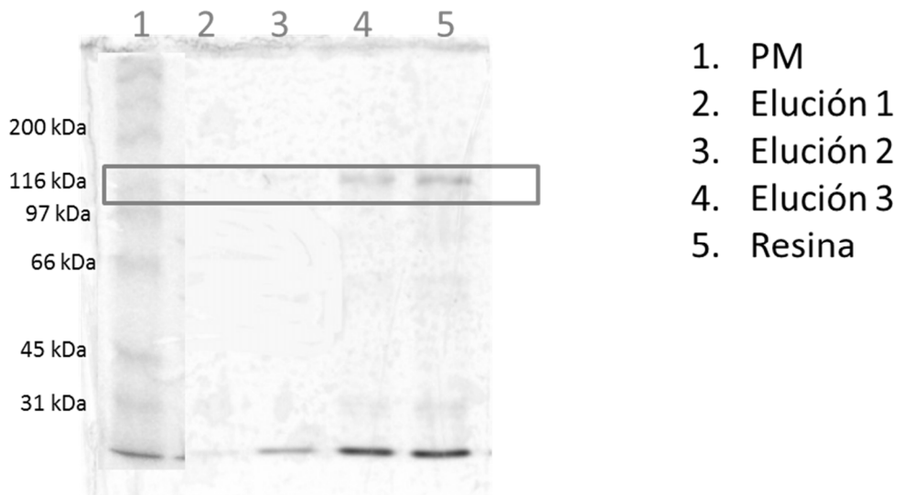

1 2 3 4 5
200 kDa
116 kDa
97 kDa
66 kDa
45 kDa
31 kDa
1. PM
2. Elución 1
3. Elución 2
4. Elución 3
5. Resina

Figura 11.

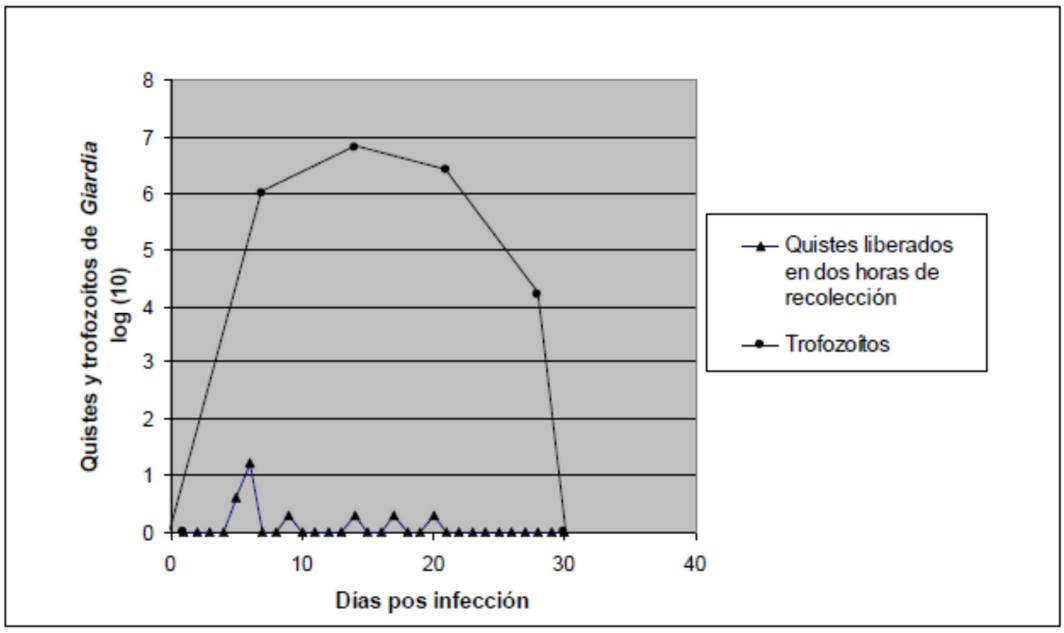
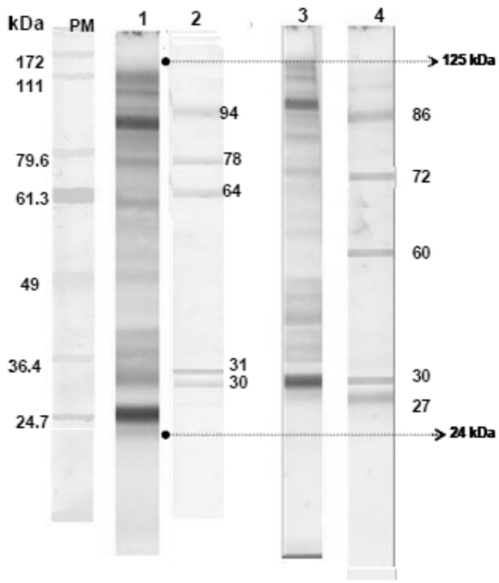
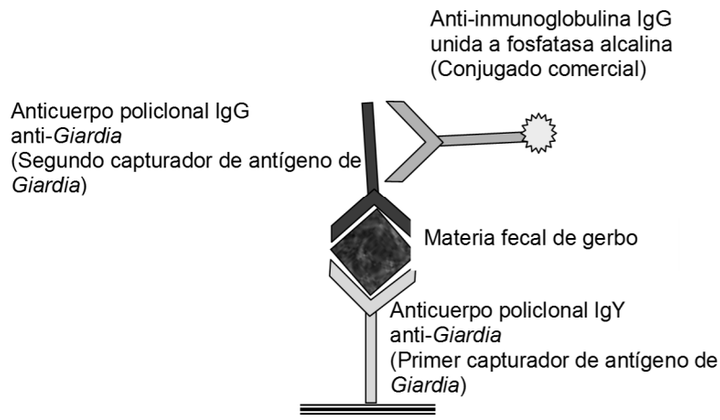

Quistes y trofozoítos de *Giardia* log (10)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
10
20
30
40
Días pos infección
Quistes liberados en dos horas de recolección
Trofozoítos

Figura 12.



1. Reconocimiento de antígenos de trofozoíto de *Giardia* por Ig Y total
2. Reconocimiento de antígenos de *Giardia* por IgY purificada por cromatografía de afinidad.
3. Reconocimiento de antígenos de trofozoíto de *Giardia* por Ig G total.
4. Reconocimiento de antígenos de *Giardia* por IgG purificada por cromatografía de afinidad

Figura 13.


Anti-inmunoglobulina IgG
unida a fosfatasa alcalina
(Conjugado comercial)
Anticuerpo policlonal IgG
anti-*Giardia*
(Segundo capturador de antígeno de
Giardia)
Materia fecal de gerbo
Anticuerpo policlonal IgY
anti-*Giardia*
(Primer capturador de antígeno de
Giardia)

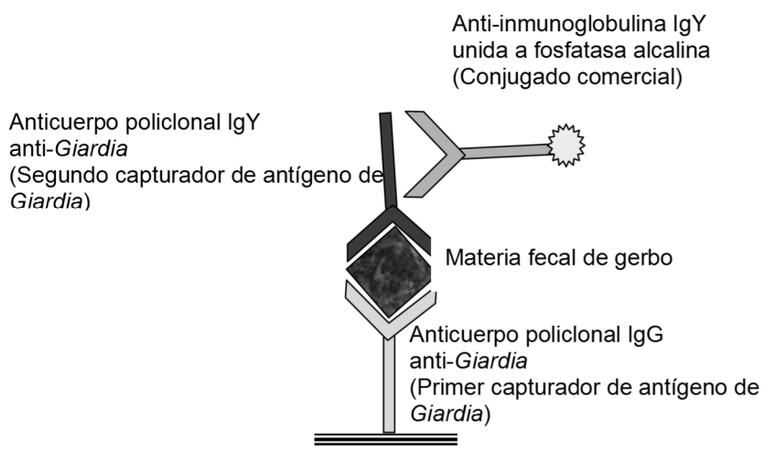
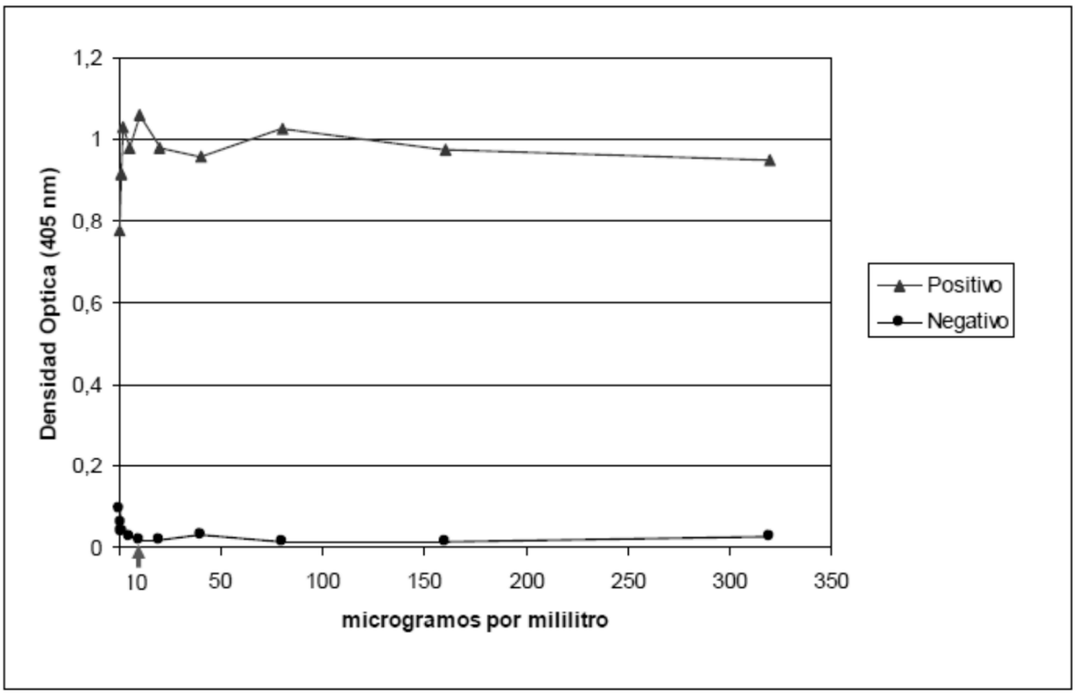
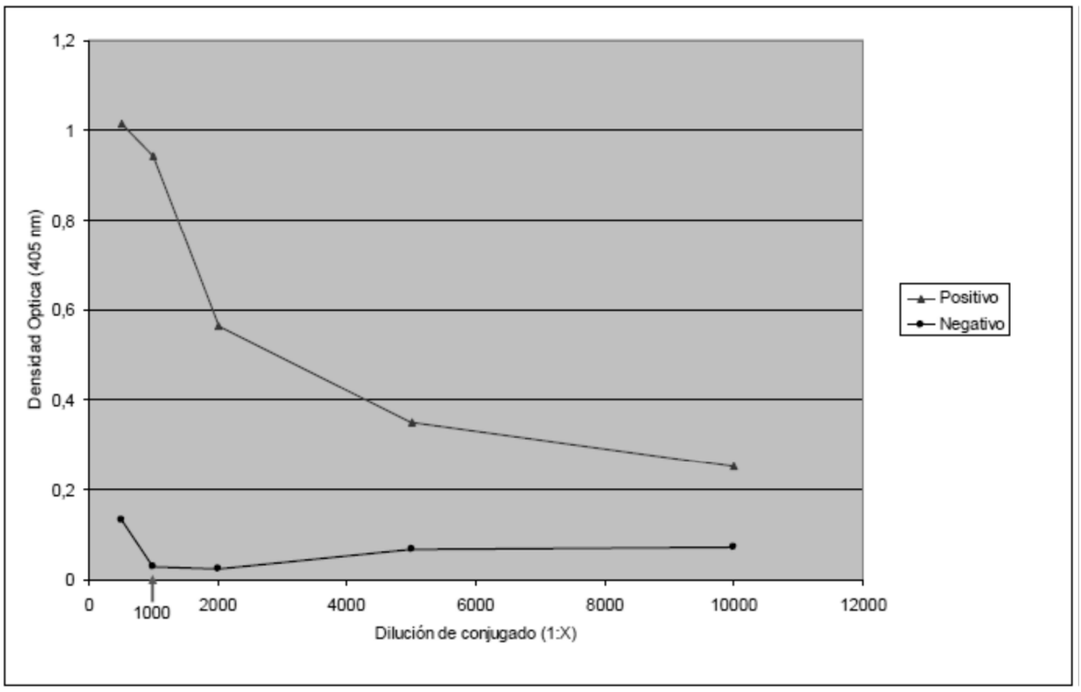

Anti-inmunoglobulina IgY
unida a fosfatasa alcalina
(Conjugado comercial)
Anticuerpo policlonal IgY
anti-*Giardia*
(Segundo capturador de antígeno de
Giardia)
Materia fecal de gerbo
Anticuerpo policlonal IgG
anti-*Giardia*
(Primer capturador de antígeno de
Giardia)

Figura 14.


1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Densidad Optica (405 nm)
10
50
100
150
200
250
300
350
microgramos por mililitro
Positivo
Negativo

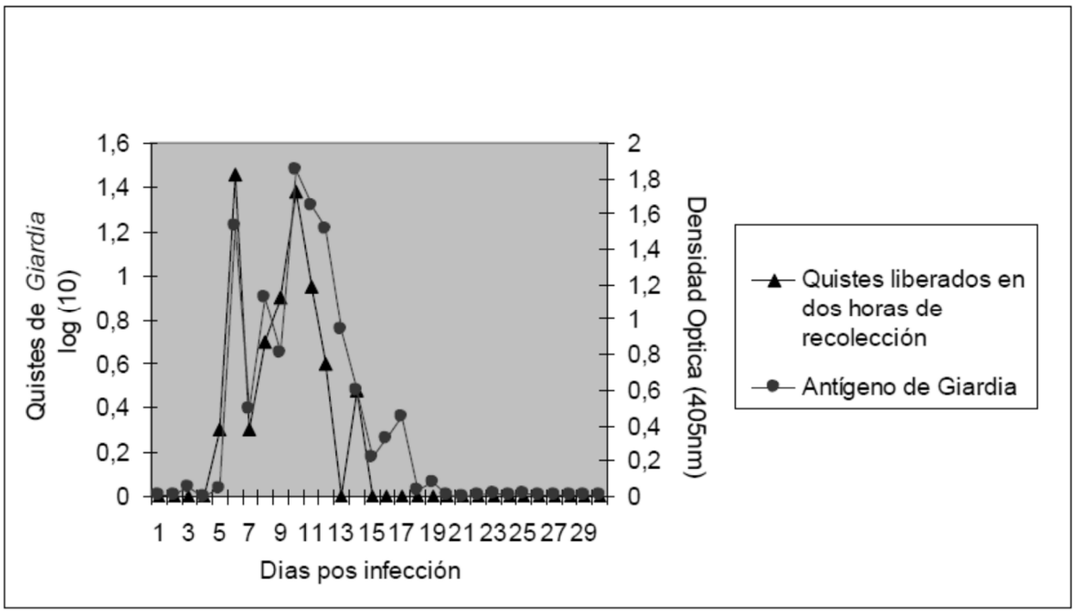
5

Figura 15.


1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Densidad Optica (405 nm)
0
1000
2000
4000
6000
8000
10000
12000
Dilución de conjugado (1:X)
Positivo
Negativo

5

Figura 16.


Quistes de *Giardia* log (10)
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Densidad Optica (405nm)
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
Dias pos infección
Quistes liberados en dos horas de recolección
Antígeno de Giardia

5

Figura 17.

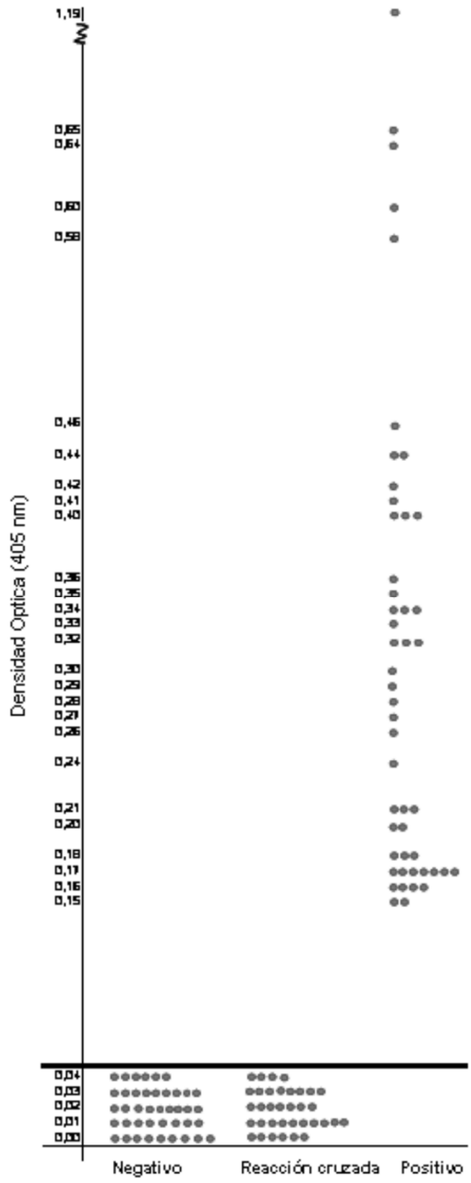

Densidad Optica (405 nm)
1,19
0,65
0,64
0,60
0,58
0,46
0,44
0,42
0,41
0,40
0,36
0,35
0,34
0,33
0,32
0,30
0,29
0,28
0,27
0,26
0,24
0,21
0,20
0,18
0,17
0,16
0,15
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
Negativo
Reacción cruzada
Positivo

Figura 18.

dot-Elisa-*Giardia*-INS
RESULTADOS DE LA PRUEBA:
NEGATIVA
para antígeno de *Giardia*
POSITIVA
para antígeno de *Giardia*

5