(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 627 839**

(51) Int. CI.:

C07K 14/435 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/IB2011/050645**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101790**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11709481 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2558485**

(54) Título: **Antígenos polipeptídicos de Trichinella y sus aplicaciones**

(30) Prioridad:

17.02.2010 FR 1000660

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

(73) Titular/es:

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION,DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL (100.0%)
27-31, Avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex, FR

(72) Inventor/es:

ZOCEVIC, ALEKSANDAR;
GIOVANI, BALDISSERA;
LACOUR, SANDRINE A.;
MACÉ, PAULINE;
VALLÉE, ISABELLE y
BOIREAU, PASCAL

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antígenos polipeptídicos de *Trichinella* y sus aplicaciones

La presente invención se refiere al uso de nuevos antígenos identificados en el parásito *Trichinella* en el contexto del diagnóstico y la prevención de la triquinosis.

La triquinosis es una zoonosis asociada con el consumo de carne infestada por el parásito *Trichinella* (MURRELL et al., Vet Parasitol, 93, 293-307, 2000).

Este nematodo, de la clase *Adenophorea*, pertenece a la familia *Trichinellidae* que comprende 8 especies y 3 genotipos que se relacionan en 2 grupos filogenéticamente distintos: por un lado, las triquinas encapsuladas (*T. spiralis, T. nativa; T. britovi; T. murrelli, T. nelsoni*) que infestan mamíferos, y por otro lado las triquinas no encapsuladas (*T. pseudospiralis; T. papuae, T. zimbabwensis)* que infestan mamíferos, aves y reptiles (GASSER et al., Electrophoresis, 25, 3357-64, 2004). Todas estas especies pueden infestar al ser humano.

El ciclo biológico del parásito es autoheteroxeno: se produce enteramente en un mismo hospedador, que es tanto el hospedador intermedio como el hospedador definitivo (BOIREAU et al., Revue française des laboratoires, 71-89, 2002). El paso de las larvas infestantes de un hospedador a otro es necesario para que se lleve a cabo un nuevo ciclo. Este paso se produce por la ingestión de carne cruda o carne apenas cocinada, contaminada con las larvas del parásito. Durante la digestión, dichas larvas son liberadas y penetran en el epitelio intestinal en donde se transformarán en gusanos adultos (Ad) sexuales. Las hembras fecundadas expulsan posteriormente las Larvas L1 Recién Nacidas (L1RN) que llegan a los músculos estriados a través de la circulación linfática y el torrente sanguíneo. Estas larvas L1RN penetran en las células musculares (estadio de desarrollo infestante L1M: Larva L1 Muscular), en las que provocan la desdiferenciación en células nodrizas, rodeadas por una cápsula protectora de colágeno gruesa en el caso de triquinas encapsuladas, muy delgada en el caso de triquinas no encapsuladas.

Aunque la triquinosis es asintomática en los animales, la infestación humana se refleja durante la fase intestinal por diarreas asociadas a náuseas, vómitos y dolor abdominal violento, mientras que los síntomas asociados a la fase de invasión muscular se caracterizan por la asociación con fiebre, edema facial y mialgias (CAPO & DESPOMMIER, Clin Microbiol Rev, 9, 47-54, 1996). Los ataques oculares, pulmonares, gastrointestinales, cardíacos y neurológicos también pueden completar el cuadro clínico de la triquinosis, cuya evolución puede ser mortal. La naturaleza crónica de la infestación, marcada por un dolor muscular persistente en los pacientes, se asocia con la supervivencia del parásito en la célula nodriza.

El tratamiento específico de las triquinosis humanas con antihelmínticos es tanto más eficaz si el diagnóstico de la infestación se realiza precozmente para permitir una acción contra todos los estadios parasitarios y especialmente antes de la formación de la cápsula protectora de colágeno alrededor de las larvas L1M (FOURESTIE et al., Parasitol Res, 75, 36-41, 1988).

Los datos epidemiológicos han demostrado una distribución geográfica del parásito en todas las latitudes, asociada a un modo de transmisión que implica numerosas especies de la fauna silvestre que también mantienen un ciclo de infestación doméstico, representado principalmente por el cerdo (DUPOUY-CAMET, Vet Parasitol, 93, 191-200, 2000).

Las epidemias de triquinosis humana, una zoonosis emergente o re-emergente, constituyen un verdadero problema de salud pública en todo el mundo, debido a los hábitos alimenticios y los controles sanitarios que no siempre son eficaces (MURRELL & POZIO, Int. J Parasitol, 30, 1339-49, 2000). Estas epidemias implican esencialmente carne de cerdo y de jabalí y también carne de caballo (BOIREAU et al., Vet Parasitol, 93, 309-20, 2000).

Por lo tanto, la prevención de la contaminación humana consiste en cocinar la carne de forma adecuada a fondo y mejorar las condiciones de cría y/o de control de las triquinosis animales (cerdo, caballo, jabalí y otras especies de animales silvestres sensibles a *Trichinella*) (BOIREAU et al., Revue française des laboratoires, 71-89, 2002).

Las técnicas de escrutinio de la triquinosis se pueden dividir en dos categorías: 1) la detección directa de las larvas L1M, después de una digestión artificial de muestras musculares, y 2) la detección indirecta a través de diversos métodos inmunológicos que permiten detectar anticuerpos dirigidos contra los antígenos de *Trichinella*.

A cada uno de los estadios de desarrollo del parásito, Ad, L1RN y L1M, le corresponde un perfil antigénico particular.

Preparaciones antigénicas obtenidas a partir de larvas en el estadio L1M son las que se usan actualmente para el inmunodiagnóstico. De hecho, las fracciones antigénicas de los dos estadios tempranos Ad y L1RN son difíciles de purificar y hasta hace poco no había sido posible la identificación de antígenos inmunodominantes asociados con uno y/o el otro de estos dos estadios (LIU et al. 1-13, 2007).

Se utiliza principalmente, o bien preparaciones de antígeno total soluble, obtenidas mediante la lisis de las larvas, centrifugación del lisado y recuperación del material sobrenadante o, más comúnmente, antígenos de excreción/secreción (antígenos E/S).

Los antígenos E/S se producen cuando las larvas L1M se colocan en condiciones de supervivencia en un medio de cultivo; provienen de un órgano particular, denominado el esticosoma, que consiste en una cincuentena de células discoides, los esticocitos. Los esticocitos contienen gránulos, cuyo contenido es evacuado por un canalículo en el lumen del esófago del parásito. Este contenido que es muy antigénico, constituye una parte de los antígenos E/S. Estos antígenos forman una mezcla compleja de proteínas, que contiene en particular un grupo de glicoproteínas (denominadas antígenos TSL-1) que son portadoras de una molécula glucídica particular, conocida únicamente en *Trichinella* y presente en todas las especies de este parásito, la beta-tyvelosa.

Las preparaciones de antígenos E/S que se utilizan actualmente como referencia en términos de inmunodiagnóstico de la triquinosis, se obtienen a partir de medio de cultivo de larvas L1M de *T. spiralis*. Después de un cultivo durante 18 a 20 horas, el medio se recupera por filtración y después se concentra (GAMBLE et al., Vet Parasitol, 13, 349-61, 1983, GAMBLE et al., Vet Parasitol, 30, 131-7, 1988).

El principal inconveniente de las preparaciones de antígeno total soluble es su falta de especificidad. Se observan frecuentemente reacciones antigénicas cruzadas con otras parasitosis. Los antígenos E/S permiten obtener una mejor especificidad. Sin embargo, en ambos casos, es difícil producir grandes cantidades de lotes estandarizados de antígeno.

Otro problema encontrado en el contexto del diagnóstico serológico de *Trichinella* es la existencia de una "ventana ciega" de detección, correspondiente a los estadios iniciales de la infestación, lo que se refleja en resultados serológicos falsos negativos. Esta ventana ciega puede durar de 3 a 8 semanas, dependiendo de la dosis infecciosa inicial. Además, en el caballo se ha observado una desaparición gradual de los anticuerpos, 25 semanas después de la infestación.

Durante unos trabajos previos, el equipo de los inventores han identificado dos antígenos inmunodominantes conservados en el seno del género *Trichinella* y específicos del mismo. Estos antígenos se describen en el documento de solicitud PCT WO/2007/090960. Uno de estos antígenos, denominado antígeno NBL1, se expresa específicamente en el estadio L1RN, mientras que el otro, denominado antígeno 411, parece ser común a varios estadios de desarrollo de *Trichinella*.

Se han desarrollado ensayos de diagnóstico serológico de tipo ELISA a partir de estos antígenos producidos en forma de proteínas recombinantes purificadas. Estos ensayos permiten una detección serológica muy temprana de los anticuerpos específicos anti-*Trichinella*. La comparación con un ensayo ELISA de referencia que emplea los antígenos E/S (ensayo ELISA E/S) ha permitido mostrar que los ensayos ELISA que utilizan los antígenos NBL1 y 411 pueden detectar la presencia de anticuerpos específicos anti-*Trichinella*, respectivamente, 5 a 45 días antes y 5 a 20 días antes que el ensayo ELISA E/S. Sin embargo, la respuesta humoral dirigida al antígeno NBL1 tiene entonces una tendencia a atenuarse (una media de 8 semanas después de la infestación) y el antígeno 411 presenta el inconveniente de tener una sensibilidad menor que el ensayo ELISA E/S para detectar una infestación con especies de *Trichinella* distintas de *T. nativa*.

Los inventores han identificado ahora dos nuevos antígenos inmunodominantes de *Trichinella*, que se pueden usar para desarrollar nuevos ensayos de diagnóstico serológico o para mejorar los niveles de rendimiento de los ensayos existentes.

El primero de estos antígenos se denomina a continuación "L20h-Ts3". La secuencia de un clon de ADNc que codifica este antígeno y la secuencia polipeptídica deducida se representan en la Figura 1A y también se reproducen respectivamente en la lista de secuencias adjunta, con los números SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. El polipéptido SEQ ID NO: 2 tiene una identidad elevada (91%) con la proteína SML-3 (GenBank ACJ06741) identificada recientemente entre las proteínas secretadas probablemente por larvas de *T. spiralis* en el estadio muscular y que podría tener una función en la formación de la célula nodriza (GUILIANO et al., Int J Parasitol, 39, 515-24, 2009); sin embargo, las propiedades antigénicas de la proteína SML-3 no se han estudiado hasta la fecha.

El segundo antígeno se denomina en lo sucesivo "L20h-Ts1". La secuencia de un clon de ADNc que codifica este antígeno y la secuencia polipeptídica deducida se representan en la Figura 1B y también se reproducen respectivamente en la lista de secuencias adjunta con los números SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. El polipéptido SEQ ID NO: 4 no posee identidad con ninguna proteína conocida de *Trichinella* o de otros organismos.

Los polipéptidos L20h-Ts3 y L20h-Ts1, producidos en forma recombinante, permiten detectar en un estadio inicial, la respuesta humoral dirigida contra *Trichinella*. Además, la respuesta humoral dirigida a estos antígenos persiste durante más tiempo después de la infestación que en el caso del antígeno recombinante NBL1, en donde comienza a atenuarse aproximadamente 8 semanas después de la infestación. Por lo tanto, el uso de los polipéptidos L20h-Ts3 y L20h-Ts1 permite ampliar la ventana temporal de detección de la respuesta humoral.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es el uso de un polipéptido antigénico reconocido por anticuerpos anti-*Trichinella*, como un reactivo para detectar anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, caracterizado porque dicho polipéptido es un polipéptido que a) comprende la secuencia SEQ ID NO: 2, o comprende una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.

Ventajosamente, en el contexto de la puesta en práctica de la presente invención, es posible utilizar una mezcla que comprende un polipéptido a) tal como se ha definido anteriormente y un polipéptido b) que comprende los aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 (que representan la forma madura de la proteína L20h-Ts1), o que comprende una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4, o bien una mezcla que comprende un polipéptido a) y un polipéptido b) tal como se han definido anteriormente, asociados con uno o varios otros polipéptidos antigénicos reconocidos por anticuerpos anti-*Trichinella*, por ejemplo, uno o varios de los polipéptidos obtenidos a partir de los antígenos NBL1 y 411, descritos en el documento de solicitud PCT WO/2007/090960.

Un objeto de la presente invención es más particularmente un procedimiento para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, en donde el procedimiento se caracteriza porque comprende:

- poner en contacto dicha muestra biológica con un polipéptido a) o un polipéptido a) y un polipéptido b), tal como se han definido anteriormente, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo entre dicho(s) polipéptido(s) y los anticuerpos anti-*Trichinella*, que posiblemente están presentes en dicha muestra;

- detectar, por cualquier medio apropiado, el complejo antígeno/anticuerpo posiblemente formado.

Generalmente, dicha muestra biológica es una muestra de suero. Se puede obtener a partir de cualquier sujeto (mamífero, ave o reptil) perteneciente a una especie que se pueda infestar con *Trichinella*, y en la que se desea detectar la presencia de este parásito. Ventajosamente, se trata de una muestra obtenida a partir de un mamífero, por ejemplo, de un animal de explotación ganadera o de un paciente humano.

Esta asociación hace posible, en particular, ampliar el espectro de reactividad, y también la ventana temporal para la detección de la respuesta humoral, en comparación con cada uno de los polipéptidos utilizados individualmente.

La presente invención incluye en particular polipéptidos quiméricos que comprenden una o varias copias de un polipéptido a) y una o varias copias de un polipéptido b) o varias copias de un polipéptido a) tal como se han definido anteriormente, opcionalmente fusionados con uno o varios polipéptidos heterólogos, por ejemplo, uno o varios de los polipéptidos obtenidos a partir de los antígenos NBL1 y 411 descritos en el documento de solicitud PCT WO/2007/090960.

La presente invención también tiene como objeto los polinucleótidos que codifican un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención, así como vectores recombinantes que comprenden dichos polinucleótidos, y células hospedadoras transformadas con dichos vectores.

Los polipéptidos a) y b) definidos anteriormente se pueden usar en el contexto de diversos métodos para detectar anticuerpos, que son conocidos en sí mismos. A modo de ejemplo, se pueden mencionar en particular los métodos de tipo ELISA (directo, indirecto o sándwich), los métodos de microaglutinación sobre perlas y también los métodos de transferencia electroforética acoplada con inmunomarcado.

La presente invención tiene también como objeto un kit para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en una muestra biológica, caracterizado porque comprende un polipéptido a) o un polipéptido a) y un polipéptido b), tal como se han definido anteriormente y, cuando sea apropiado, tampones y reactivos adecuados para constituir un medio de reacción que permite la formación de un complejo antígeno/anticuerpo y, opcionalmente, medios para detectar dicho complejo antígeno/anticuerpo. Opcionalmente, puede comprender uno o varios otros polipéptidos antigénicos reconocidos por anticuerpos anti-*Trichinella*, por ejemplo, uno o varios de los polipéptidos obtenidos a partir de los antígenos NBL1 y 411 descritos en el documento de solicitud PCT WO/2007/090960.

Ventajosamente, dicho o dichos polipéptidos se inmovilizan sobre un soporte sólido. A modo de ejemplos no limitativos de soportes sólidos que se pueden utilizar, se hará mención a placas de microtitulación, perlas, microperlas o micropartículas, tiras, etc.

Dicho kit puede comprender también muestras de referencia, tales como uno o varios sueros negativos y uno o varios sueros positivos.

La presente invención se comprenderá mejor con ayuda de la descripción adicional que sigue a continuación, que se refiere a ejemplos que ilustran el uso de los antígenos L20h-Ts3 y L20h-Ts1 para el inmunodiagnóstico de la triquinosis.

EJEMPLO 1: Identificación de los antígenos L20h-Ts3 y L20h-Ts1 y producción de estos antígenos en forma de proteínas recombinantes en un sistema de expresión procariota.

Se realizó un inmunoescrutinio de genotecas de expresión de ADNc de los estadios iniciales de *Trichinella* (14 h, 20 h, 48 h después de la infección de ratones) con sueros y material sobrenadante de cultivos de mucosa intestinal de cerdos infestados experimentalmente con *T. spiralis*.

El gen L20h-Ts3 se identificó en 41 de los clones de las genotecas de ADNc obtenidas 14 h y 20 h después de la

infección de los ratones. La secuencia de nucleótidos y la secuencia polipeptídica deducida de uno de esos clones se representan en la Figura 1A.

Su longitud es de 398 pb, incluyendo las 33 pb de 3'UTR, una señal de poliadenilación putativa (subrayada en la Figura 1A) y un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 106 aa, con un peso molecular de 11906,0 Da y un punto isoeléctrico de 4,21. No se ha identificado ningún péptido señal basándose en el algoritmo de BENDTSEN et al. (BENDTSEN et al., J Mol Biol, 340, 783-95, 2004). La búsqueda de homólogos en las bases de datos revela una fuerte identidad (91%) entre la secuencia polipeptídica deducida de L20h-Ts3 y una proteína de *T. spiralis*, denominada SML-3 (GUILIANO et al., Int J Parasitol, 39, 515- 24, 2009).

Este clon se digirió con *BamH*I-*Not*I (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts) y el fragmento de restricción que contenía la secuencia codificante completa de L20h-Ts3, se subclonó en el vector pGEX-6P-1 (GenBank U78872). Este vector tiene un marcador de glutatión S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST*sj*) en el extremo N-terminal (la GST*sj* no presenta reacciones inmunológicas cruzadas con *Trichinella*). El vector de expresión resultante, denominado pGEX-6P-1-(L20h-Ts3), codifica una proteína recombinante que contiene la totalidad de la secuencia de L20h-Ts3 y es portador de un marcador GST*sj* en la posición N-terminal y un marcador de polihistidina en la posición C-terminal.

El gen L20h-Ts1 se ha identificado en 121 de los clones de las genotecas de ADNc obtenidas 20 h y 48 h después de la infección de los ratones. La secuencia de uno de esos clones está representada en la Figura 1B. Su longitud es de 339 pb, de las cuales 139 pb de 3'UTR, una señal de poliadenilación putativa (subrayada en la Figura 1B), y un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 67 aa, con un peso molecular de 7834,9 Da y un punto isoeléctrico de 4,42. Se ha identificado un péptido señal de 20 aa (en negrita en la Figura 1B) basándose en el algoritmo de BENDTSEN et al. (2004). La búsqueda de homólogos en las bases de datos no reveló ninguna homología con proteínas de *Trichinella* conocidas.

Ese clon se digirió con *BamH*I-*Not*I (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts), y un fragmento de restricción que codificaba el fragmento Tyr_{21}-Ala_{67} de L20h-Ts1 (correspondiente a la forma madura sin el péptido señal) se subclonó en el vector pGEX-6P-1. El vector de expresión resultante, denominado pGEX-6P-1-(L20h-Ts1), codifica una proteína recombinante que contiene la secuencia de la forma madura de L20h-Ts1 y que es portadora de un marcador GST*sj* en la posición N-terminal y un marcador de polihistidina en la posición C-terminal.

El vector pGEX-6P-1-(L20h-Ts3) o pGEX-6P-1-(L20h-Ts1) se han utilizado para transformar bacterias *E. coli* (cepa BL21) y la expresión de cada proteína recombinante (que contenía un marcador GST*sj* en el extremo N-terminal o un marcador de histidina en el extremo C-terminal) se ha inducido mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) 0,5 mM (concentración final) y la incubación durante 3 h, a 37ºC y 225 rpm. Las bacterias inducidas se centrifugaron (4000 x g, 20 min a 4ºC), se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM) complementado con 0,5 mg/ml de lisozima y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido.

A continuación, se añadieron 5 µg/ml de ADNasa I al material lisado incubado durante 15 min a 37ºC. El lisado se incubó a continuación durante 1 h 30 a 4ºC en un agitador rotatorio en un tubo Falcon® de fondo cónico de 50 ml (Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, Francia) en presencia de una matriz Ni-NTA (GE Healthcare Europe, Orsay, Francia) pre-equilibrada en tampón de lisis. La mezcla de lisado-matriz se cargó en una columna PD-10 (GE Healthcare Europe, Orsay, Francia) para eliminar las proteínas no fijadas o los contaminantes, y luego se transfirió a un nuevo tubo Falcon® de 50 ml y se lavó con 50 ml de tampón de lavado I (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM) durante 30 min a 4ºC en un agitador rotatorio. Después de centrifugar durante 5 minutos (1500 x g, 4ºC), la mezcla se lavó 4 veces con 50 ml de tampón de lavado II (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM; imidazol 30 mM) durante 30 minutos a 4ºC; estos lavados estuvieron seguidos por una centrifugación final durante 5 min (1500 x g, 4ºC). Finalmente, se eluyó cada proteína recombinante con el tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM; imidazol 500 mM) y la concentración se determinó usando un espectrofotómetro a 280 nm. La proteína recombinante se dividió en fracciones alícuotas y se almacenó a -20ºC en glicerol al 10%.

Los geles de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las proteínas de fusión GST*sj*-L20h-Ts3 y GST*sj*-L20h-Ts1 se representan respectivamente en las Figuras 2A y 2B (carril 1: marcadores del peso molecular). En estos geles, las proteínas GST*sj*-L20h-Ts3 y GST*sj*-L20h-Ts1 aparecen ambas en forma de una sola banda con el tamaño esperado para la proteína de fusión.

EJEMPLO 2: Inmunorreactividad de las proteínas L20h-Ts3 y L20h-Ts1 en una transferencia Western

Sueros anti-*Trichinella*

Se inocularon 200, 1000, 20000 larvas infestantes de *T. spiralis* (ISS004, Centro Internacional de Referencia de Trichinella, Roma, Italia) o de *T. britovi* (ISS100), en cerdos exentos de organismos patógenos específicos (cerdos EOPS) o en cerdos procedentes de una explotación ganadera convencional. Se tomaron muestras de sangre 48 h antes de la infestación (control negativo) y a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 días después de la infestación (pi).

Se utilizaron también sueros procedentes de cerdos EOPS infestados con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* (ISS003) o *T. britovi* (ISS002). Se tomaron muestras de sangre 24 h antes de la infestación (control negativo) y a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20 y 25 semanas pi.

En el año 2004 se recogieron sueros de cerdos procedentes de explotaciones ganaderas industriales intensivas en Ille-et-Vilaine (Francia) y controles negativos para la triquinosis mediante digestión artificial y se utilizaron como sueros de referencia negativos.

Transferencia Western

La inmunoreactividad de los antígenos L20h-Ts3 y L20h-Ts1 recombinantes (en forma de proteínas de fusión GST*sj*-L20h-Ts3 y GST*sj*-L20h-Ts1) se analizó mediante transferencia Western.

Las proteínas recombinantes se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 15%, 700 ng de proteína por pocillo) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo de las membranas por incubación durante 1 noche a 4ºC en tampón PBS que contenía Tween®-20 al 0,1% (PBS-T) y leche desnatada al 5%, se lavaron 3 veces en PBS-T durante 5 min. Las membranas se incubaron a continuación durante 1 h a temperatura ambiente con:

- en el caso de L20h-Ts3, sueros de cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis*, recogidos -2, 5, 12, 15, 20, 28 y 60 días después de la infestación y diluidos 1/300 en PBS-T que contenía 5% de leche desnatada,

- en el caso de L20h-Ts1, suero de un cerdo EOPS infestado experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis*, recogido -1, 7, 14, 21, 28, 49 y 84 días después de la infestación y diluido a 1/300 en PBS-T que contenía leche desnatada al 5%.

Después de 3 lavados durante 5 min en PBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cerdo, marcado con peroxidasa, diluido 1/10000. Después de 3 lavados adicionales, la visualización se realizó con ayuda del kit "ECL PLUS WESTERN BLOTTING ET AMERSHAM HYPERFILM ECL" (GE Healthcare Europe, Orsay, Francia).

L20h-Ts3:

Los resultados obtenidos con los sueros de cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* y recogidos los días -2, 5, 12, 15, 20, 28 y 60 pi, se ilustran en la Figura 3. Estos resultados muestran que el antígeno L20h-Ts3 recombinante (GST*sj*-L20h-Ts3) es reconocido claramente a partir del día 20 pi (una banda débil es visible a partir del día 15 pi) y al menos hasta 60 días pi.

L20h-Ts1:

Los resultados se ilustran en la Figura 4. Estos resultados muestran que el antígeno L20h-Ts1 recombinante (GST*sj*-L20h-Ts1) es reconocido claramente a partir del día 28 pi (una banda débil es visible a partir del día 21 pi) y al menos hasta 84 días pi por el suero de un cerdo EOPS infestado experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* (Figuras 4A y 4B) (Debe observarse que una detección 112 días pi también era posible con otro cerdo EOPS infestado experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis*, datos no mostrados). También se reconoce el antígeno L20h-Ts1 recombinante (GST*sj*-L20h-Ts1) (una banda débil es visible) a los 60 días pi en el caso de un cerdo infestado con 200 larvas L1M de *T. spiralis* (datos no mostrados).

EJEMPLO 3: Inmunorreactividad del antígeno L20h-Ts3 recombinante en ELISA indirecto

La inmunorreactividad del antígeno L20h-Ts3 recombinante se evaluó mediante ELISA indirecto, en comparación con el antígeno E/S de *T. spiralis*, y con el antígeno NBL1 descrito en el documento de solicitud PCT WO/2007/090960.

Los sueros procedentes de cerdos infestados con *Trichinella* utilizados son los descritos en el Ejemplo 2 anterior. Se utilizó un total de 220 sueros de referencia de cerdos negativos para determinar el umbral de diagnóstico.

El antígeno E/S utilizado como referencia es el del ensayo ELISA comercializado por el Instituto Pourquier (Montpellier, Francia).

El protocolo utilizado para los ensayos ELISA es el siguiente: se depositaron 100 µl/pocillo de antígeno diluido en tampón de sensibilización (carbonato sódico 12 mM; bicarbonato sódico 35 mM, pH 9,6) y se incubaron durante 2 h a 37ºC en una placa de microtitulación (Placas Immuno 96 MicroWell F96 MaxiSorp, Nunc, Roskil, Dinamarca). A continuación, se lavó cada pocillo 5 veces con 250 µl de tampón de lavado (agua destilada, 0,05% de Tween®-20) y se incubaron durante 30 minutos a 37ºC con 200 µl de tampón de saturación (PBS, gelatina al 1%, Tween®-20 al 0,05%). Después de 5 lavados con la solución de lavado, se depositaron 200 µL/pocillo de anticuerpos primarios (sueros) diluidos en tampón de saturación y se incubaron durante 1 h a 37ºC. Después de 5 lavados con la solución

de lavado, se depositaron 100 µL/pocillo de anticuerpos secundarios de conejo anti-IgG de cerdo conjugados con peroxidasa (diluidos 1/50000 en tampón de saturación) y se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Finalmente, los pocillos se lavaron 5 veces con la solución de lavado y se añadieron 100 µl/pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Zymed, California, EE.UU.) para la visualización en una habitación oscura. La reacción se detuvo con 50 µL/pocillo de ácido sulfúrico al 12,5% y la lectura se llevó a cabo a 450 nm con ayuda de un lector de placas Labsystems iEMS Reader MF acoplado con el programa informático Ascent 2.6 (Thermo LabSystems, Cergy Pontoise, Francia).

Las condiciones óptimas para el ELISA se definieron sometiendo a ensayo muestras de suero en diluciones 1/10, 1/100 y 1/300, y cantidades de proteína L20h-Ts3 de 50 ng, 250 ng, 500 ng y 1 µg por pocillo. Los resultados obtenidos se analizaron a continuación mediante un ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney. De este modo se observó la mayor diferencia entre los valores de las muestras positivas y los valores de las muestras negativas para una dilución 1/10 de los sueros y 250 ng de proteína L20h-Ts3. Por lo tanto, estas condiciones se utilizaron en los ELISA posteriores.

Por lo tanto, estas condiciones se utilizaron para el resto de las pruebas. El umbral de diagnóstico se determinó a partir de sueros de referencia negativos. El cálculo se basa en el uso de la fórmula definida por la Oficina Internacional de Epizootias (Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres, 6ª ed., 2008, capítulo 2.01.6), correspondiente a la media de las D.O. medidas a 450 nm a la que se añade 3 veces la desviación estándar.

Los resultados se ilustran en las Figuras 5 a 13.

La Figura 5 representa los valores de densidad óptica medidos en 220 sueros de referencia negativos. El umbral de diagnóstico establecido a partir de estas mediciones es de 0,33 unidades de D.O.

La Figura 6 representa los valores de densidad óptica medidos con sueros de cerdos EOPS (▲) o cerdos procedentes de una explotación ganadera convencional (■), infestados con 20000 larvas L1M de *T. spiralis*, para los sueros recogidos 5 (cerdos 1-3), 12 (cerdos 4-6), 15 (cerdos 7-9), 20 (cerdos 10-12) y 60 (cerdos 13-15) días pi. La ventana ciega, durante la cual no es posible ninguna detección con ELISA E/S, está representada en sombreado.

La Figura 7 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* y sometidos a ensayo con el antígeno L20h-Ts3.

La Figura 8 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* y sometidos a ensayo con el antígeno E/S. El % de E/P se define por la siguiente fórmula: (D.O. de la muestra que se va a someter a ensayo)/(D.O. media de la muestra de control positivo) x 100.

La Figura 9 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. spiralis* y sometidos a ensayo con el antígeno NBL1.

La Figura 10 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. britovi* y sometidos a ensayo con el antígeno L20h-Ts3.

La Figura 11 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. britovi* y sometidos a ensayo con el antígeno E/S.

La Figura 12 representa la evolución de la densidad óptica (en el eje de ordenadas) durante las semanas siguientes a la infestación (en el eje de abscisas) para los sueros de 3 cerdos EOPS infestados experimentalmente con 20000 larvas L1M de *T. britovi* y sometidos a ensayo con el antígeno NBL1.

La Figura 13 representa los valores de densidad óptica medida con sueros de cerdos EOPS (▲) o de cerdos de una explotación ganadera convencional (■), infestados con 200 (cerdos 1-3) o 1000 (cerdos 4-6) larvas L1M de *T. spiralis* y sometidos a ensayo con el antígeno L20h-Ts3.

En el caso de cerdos infestados experimentalmente con 20000 L1M de *T. spiralis*, la detección con el antígeno L20h-Ts3 era posible a partir del día 15 pi para 1/6 cerdos (cerdo 8) y del día 20 pi para 4/6 cerdos (Figura 6). En cuanto al ELISA E/S, no permitía una detección de la infección antes de 25 días. Los resultados obtenidos eran diferentes dependiendo del estado de salud de los cerdos. En efecto, los cerdos EOPS se detectaban de forma más precoz, en comparación con los cerdos convencionales.

La seroconversión está acompañada de un perfil de respuestas humorales que tienen títulos elevados y se mantienen hasta 25 semanas pi para 2/3 cerdos y hasta 12 semanas pi para 1/3 cerdos infestados con *T. spiralis*

(Figura 7). Se detectó más precozmente un cerdo de cada tres (1 semana antes) que con el ELISA E/S (Figura 8). En los mismos 3 animales, el antígeno NBL1 (Figura 9) permitía una detección de los anticuerpos anti-*Trichinella* a partir de 3 semanas pi. Por otra parte, se observa una disminución de la respuesta a las 7 semanas pi para 2 de estos 3 cerdos. Para el tercer cerdo, la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* ya no se detecta después de 12 semanas.

En el caso de cerdos infestados experimentalmente con 20000 L1M de *T. britovi*, se observó una seroconversión una a dos semanas antes con el antígeno L20h-Ts3 que con el ELISA E/S (Figuras 10 y 11), con las D.O. medidas elevadas desde 3 semanas pi y que se mantuvieron hasta 25 semanas pi para los tres cerdos sometidos a ensayo. En los mismos 3 animales, el antígeno NBL1 (Figura 12) permitía la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* en el suero de uno de los cerdos a partir de 2 semanas pi y hasta 16 semanas pi. La presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* se detectó en el suero de un segundo cerdo, solamente en la tercera y cuarta semanas pi. Finalmente, no se detectó ningún anticuerpo anti-*Trichinella* en el suero del tercer cerdo.

Además, se detectaron 3/6 cerdos con una dosis infestante moderada (1000 L1M, *T. spiralis*) a los 60 días pi con el antígeno L20h-Ts3 (Figura 13). Una vez más, los resultados obtenidos dependían del estado de salud de los cerdos. En efecto, se detectaron 2/3 cerdos EOPS y 1/3 cerdos convencionales. Los cerdos infestados con una dosis infestante baja (200 L1M, *T. spiralis*) no se detectaron a los 60 días pi.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AGENCE NATIONALE CHARGEE DE LA SECURITE SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL
ZOCEVIC, Aleksandar
BALDISSERA, Giovani
LACOUR, Sandrine A.
MACE, Pauline
VALLEE, Isabelle
BOIREAU, Pascal

<120> Antígenos polipeptídicos de *Trichinella* y sus aplicaciones

<130> MJP/11-F1159-7 WO

<150> FR 10 00660
<151> 17-12-2010

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 398
<212> DNA
<213> Trichinella spiralis

<220>
<221> CDS
<222> (34)..(351)

<400> 1

```
gggtcagttt tagcagcttt tatcttcttt ttc atg gca gtt atg cct gaa atc        54
                                      Met Ala Val Met Pro Glu Ile
                                      1               5

aat gcg gat ttg agt cca ttg gaa gaa gcc caa agt tac ata tac caa        102
Asn Ala Asp Leu Ser Pro Leu Glu Glu Ala Gln Ser Tyr Ile Tyr Gln
        10                  15                  20

tct gat ttg caa agc ggt aaa ggt cat ttc cgc aga gtt ctc gat ata        150
Ser Asp Leu Gln Ser Gly Lys Gly His Phe Arg Arg Val Leu Asp Ile
    25                  30                  35

agc gat gtc gac aca agt gac gga tta tcc tta acg ata gac gct ctt        198
Ser Asp Val Asp Thr Ser Asp Gly Leu Ser Leu Thr Ile Asp Ala Leu
40                  45                  50                  55

cca act aca tgt cct gtg tca tca gaa atg act caa gat caa gtg tat        246
Pro Thr Thr Cys Pro Val Ser Ser Glu Met Thr Gln Asp Gln Val Tyr
                60                  65                  70

tca gat gag tgc ccc gtc acc aga gag gaa tat gac gaa ata gaa tgc        294
Ser Asp Glu Cys Pro Val Thr Arg Glu Glu Tyr Asp Glu Ile Glu Cys
            75                  80                  85

cat ttg aag ctt gac cat tct aaa act ggc caa att gaa tgt aca tat        342
His Leu Lys Leu Asp His Ser Lys Thr Gly Gln Ile Glu Cys Thr Tyr
        90                  95                  100

tat gga cat taaactatga gaataaagtg atttaatgaa aaaaaaaaaa aaaaaaa        398
Tyr Gly His
    105
```

<210> 2

<211> 106
<212> PRT
<213> Trichinella spiralis

<400> 2

```
Met Ala Val Met Pro Glu Ile Asn Ala Asp Leu Ser Pro Leu Glu Glu
1               5                   10                  15

Ala Gln Ser Tyr Ile Tyr Gln Ser Asp Leu Gln Ser Gly Lys Gly His
            20                  25                  30

Phe Arg Arg Val Leu Asp Ile Ser Asp Val Asp Thr Ser Asp Gly Leu
        35                  40                  45

Ser Leu Thr Ile Asp Ala Leu Pro Thr Thr Cys Pro Val Ser Ser Glu
    50                  55                  60

Met Thr Gln Asp Gln Val Tyr Ser Asp Glu Cys Pro Val Thr Arg Glu
65                  70                  75                  80

Glu Tyr Asp Glu Ile Glu Cys His Leu Lys Leu Asp His Ser Lys Thr
                85                  90                  95

Gly Gln Ile Glu Cys Thr Tyr Tyr Gly His
            100                 105
```

<210> 3
<211> 339
<212> DNA
<213> Trichinella spiralis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(201)

<400> 3

```
atg ttc atc acg ttt atc ttt ctt gct aac ata ctg ctt ctt gtg caa         48
Met Phe Ile Thr Phe Ile Phe Leu Ala Asn Ile Leu Leu Leu Val Gln
1               5                   10                  15

cca tcg gaa gca tat cgt ggt cac acc aac gat gaa att cga ttg atg         96
Pro Ser Glu Ala Tyr Arg Gly His Thr Asn Asp Glu Ile Arg Leu Met
            20                  25                  30

gat gag tgt agc gat gaa cca tac ata cga gaa cac ttg ggg gaa gat        144
Asp Glu Cys Ser Asp Glu Pro Tyr Ile Arg Glu His Leu Gly Glu Asp
        35                  40                  45

gat tat atg agt tta att gat gcg tgc gtt gaa gaa cga ctt gga cga        192
Asp Tyr Met Ser Leu Ile Asp Ala Cys Val Glu Glu Arg Leu Gly Arg
    50                  55                  60

aga gtt gca tgaagaatat aagaaaagct atcaagaatt gttcatttc               241
Arg Val Ala

65

aagcgacaat tttatttatg aaatgaattt attgaaaaat gaaaatctgt tacagtattc    301

gtaataaata gctatgcagt aaaaaaaaaa aaaaaaaa                            339
```

<210> 4
<211> 67

<212> PRT
<213> Trichinella spiralis

<400> 4

```
Met Phe Ile Thr Phe Ile Phe Leu Ala Asn Ile Leu Leu Leu Val Gln
1               5                  10                  15

Pro Ser Glu Ala Tyr Arg Gly His Thr Asn Asp Glu Ile Arg Leu Met
            20                  25                  30

Asp Glu Cys Ser Asp Glu Pro Tyr Ile Arg Glu His Leu Gly Glu Asp
        35                  40                  45

Asp Tyr Met Ser Leu Ile Asp Ala Cys Val Glu Glu Arg Leu Gly Arg
    50                  55                  60

Arg Val Ala
65
```

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido antigénico como reactivo para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* inducidos por la infestación con *Trichinella* en una muestra biológica, caracterizado porque dicho polipéptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 y en donde dicho polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*.

2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza una mezcla que comprende un primer polipéptido tal y como se define en la reivindicación 1 y un segundo polipéptido que comprende los aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 y en donde dicho segundo polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*.

3. Polipéptido antigénico reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*, caracterizado porque se elige entre:

- un polipéptido quimérico que comprende:

(i) una o varias copias de un primer polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 y en donde dicho polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*, y

(ii) una o varias copias de un segundo polipéptido que comprende los aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 y en donde dicho polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*, opcionalmente fusionados con uno o varios polipéptidos heterólogos;

- un polipéptido quimérico que comprende varias copias de un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 y en donde dicho polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*, opcionalmente fusionados con uno o varios polipéptidos heterólogos.

4. Polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico según la reivindicación 3.

5. Vector recombinante que contiene uno o varios polinucleótidos según la reivindicación 4.

6. Célula hospedadora transformada por un vector recombinante según la reivindicación 5.

7. Procedimiento para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* inducidos por la infestación con *Trichinella*, en una muestra biológica, cuyo procedimiento se caracteriza porque comprende:

- poner en contacto dicha muestra biológica con un polipéptido tal como se define en la reivindicación 1, una mezcla de péptidos tal como se define en la reivindicación 2 o un péptido quimérico tal como se define en la reivindicación 3, en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno/anticuerpo con los anticuerpos anti-*Trichinella* eventualmente presentes en dicha muestra;

- detectar, por todos los medios apropiados, el complejo antígeno/anticuerpo opcionalmente formado.

8. Kit para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* inducidos por la infestación con *Trichinella*, en una muestra biológica, caracterizado porque comprende:

- un polipéptido, en donde el polipéptido comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 y en donde dicho polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*,

- una mezcla de polipéptidos que comprenden un primer polipéptido tal como se ha definido anteriormente y un segundo polipéptido que comprende los aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 o una secuencia que presenta al menos 95% de identidad con la secuencia de los aminoácidos 21-67 de la secuencia SEQ ID NO: 4 y en donde dicho segundo polipéptido es reconocido por los anticuerpos anti-*Trichinella*, o

- un polipéptido quimérico tal como se define en la reivindicación 3, y

- tampones y reactivos adecuados para la constitución de un medio de reacción que permite la formación de un complejo antígeno/anticuerpo.

9. Kit según la reivindicación 8, caracterizado porque el(los) dicho(s) polipéptido(s) está(n) inmovilizado(s) sobre un soporte sólido.

A

```
gggtcagttttagcagcttttatcttctttttcATGGCAGTTATGCCTGAAATCAATGCG  60
                                  M  A  V  M  P  E  I  N  A   9
GATTTGAGTCCATTGGAAGAAGCCCAAAGTTACATATACCAATCTGATTTGCAAAGCGGT  120
 D  L  S  P  L  E  E  A  Q  S  Y  I  Y  Q  S  D  L  Q  S  G  29
AAAGGTCATTTCCGCAGAGTTCTCGATATAAGCGATGTCGACACAAGTGACGGATTATCC  180
 K  G  H  F  R  R  V  L  D  I  S  D  V  D  T  S  D  G  L  S  49
TTAACGATAGACGCTCTTCCAACTACATGTCCTGTGTCATCAGAAATGACTCAAGATCAA  240
 L  T  I  D  A  L  P  T  T  C  P  V  S  S  E  M  T  Q  D  Q  69
GTGTATTCAGATGAGTGCCCCGTCACCAGAGAGGAATATGACGAAATAGAATGCCATTTG  300
 V  Y  S  D  E  C  P  V  T  R  E  E  Y  D  E  I  E  C  H  L  89
AAGCTTGACCATTCTAAAACTGGCCAAATTGAATGTACATATTATGGACATtaaactatg  360
 K  L  D  H  S  K  T  G  Q  I  E  C  T  Y  Y  G  H           106
agaataaagtgatttaatgaaaaaaaaaaaaaaaaa                          398
```

B

```
ATGTTCATCACGTTTATCTTTCTTGCTAACATACTGCTTCTTGTGCAACCATCGGAAGCA  60
 M  F  I  T  F  I  F  L  A  N  I  L  L  L  V  Q  P  S  E  A  20
TATCGTGGTCACACCAACGATGAAATTCGATTGATGGATGAGTGTAGCGATGAACCATAC  120
 Y  R  G  H  T  N  D  E  I  R  L  M  D  E  C  S  D  E  P  Y  40
ATACGAGAACACTTGGGGGAAGATGATTATATGAGTTTAATTGATGCGTGCGTTGAAGAA  180
 I  R  E  H  L  G  E  D  D  Y  M  S  L  I  D  A  C  V  E  E  60
CGACTTGGACGAAGAGTTGCAtgaagaatataagaaaagctatcaagaattgttcatttt  240
 R  L  G  R  R  V  A                                          67
caagcgacaattttatttatgaaatgaatttattgaaaaatgaaaatctgttacagtatt  300

cgtaataaatagctatgcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaa                       339
```

Fig. 1

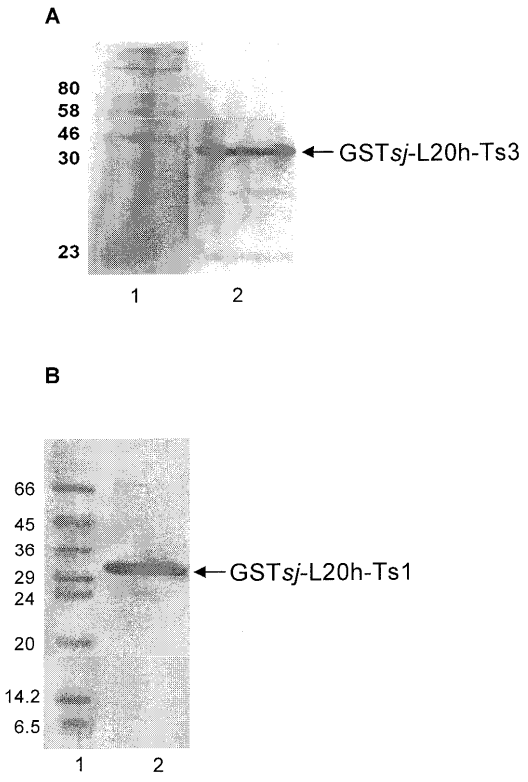
A
80
58
46
30
23
GSTsj-L20h-Ts3
1
2
B
66
45
36
29
24
20
14.2
6.5
GSTsj-L20h-Ts1
1
2

Fig. 2

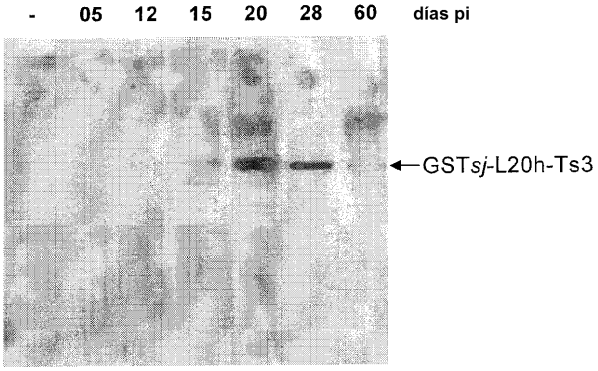
- 05 12 15 20 28 60 días pi
GSTsj-L20h-Ts3

Fig. 3

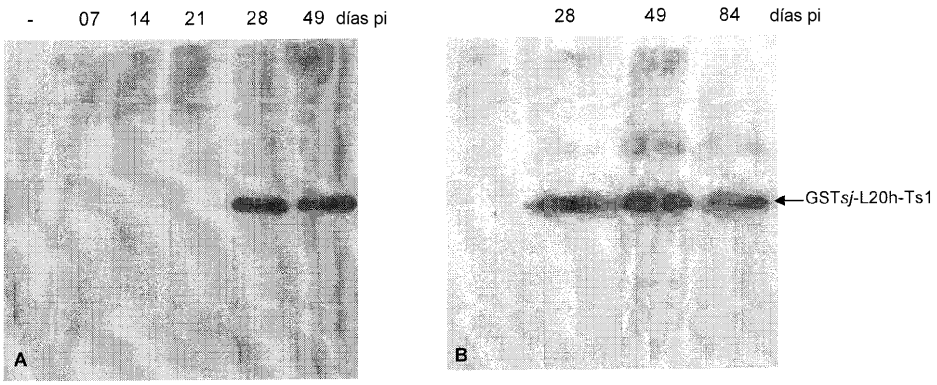
- 07 14 21 28 49 días pi
A
28 49 84 días pi
B
GSTsj-L20h-Ts1

Fig. 4

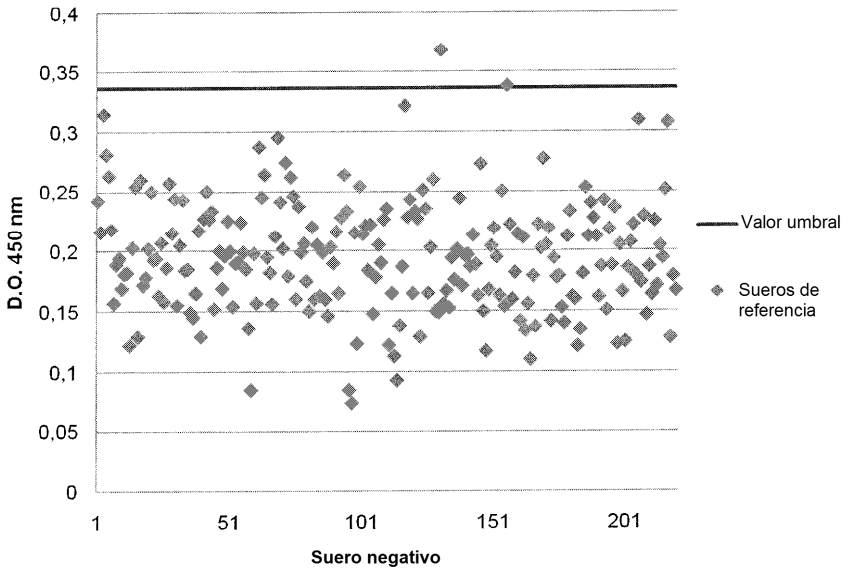
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
D.O. 450 nm
1
51
101
151
201
Suero negativo
Valor umbral
Sueros de referencia

Fig. 5

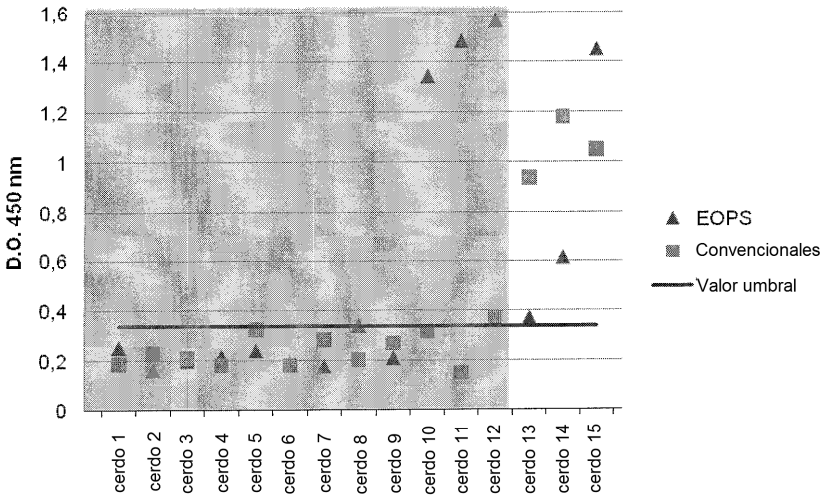
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
D.O. 450 nm
cerdo 1
cerdo 2
cerdo 3
cerdo 4
cerdo 5
cerdo 6
cerdo 7
cerdo 8
cerdo 9
cerdo 10
cerdo 11
cerdo 12
cerdo 13
cerdo 14
cerdo 15
EOPS
Convencionales
Valor umbral

Fig. 6

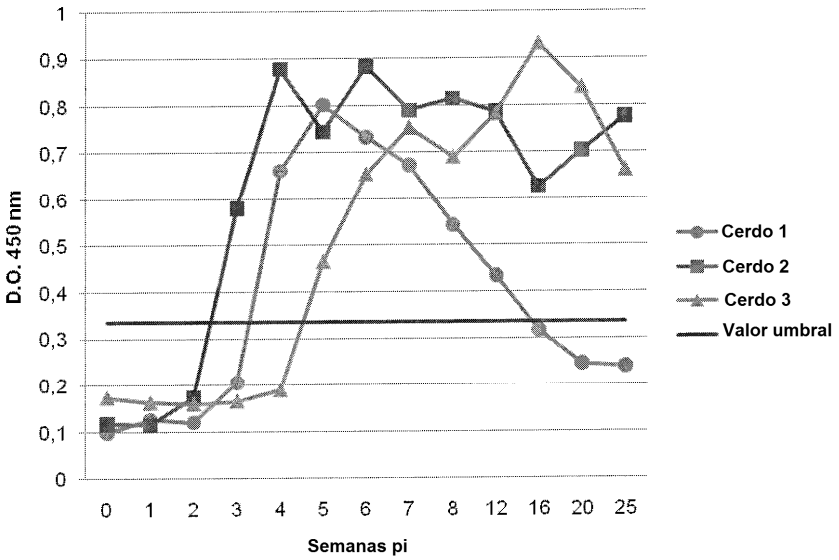
D.O. 450 nm
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
Semanas pi
Cerdo 1
Cerdo 2
Cerdo 3
Valor umbral

Fig. 7

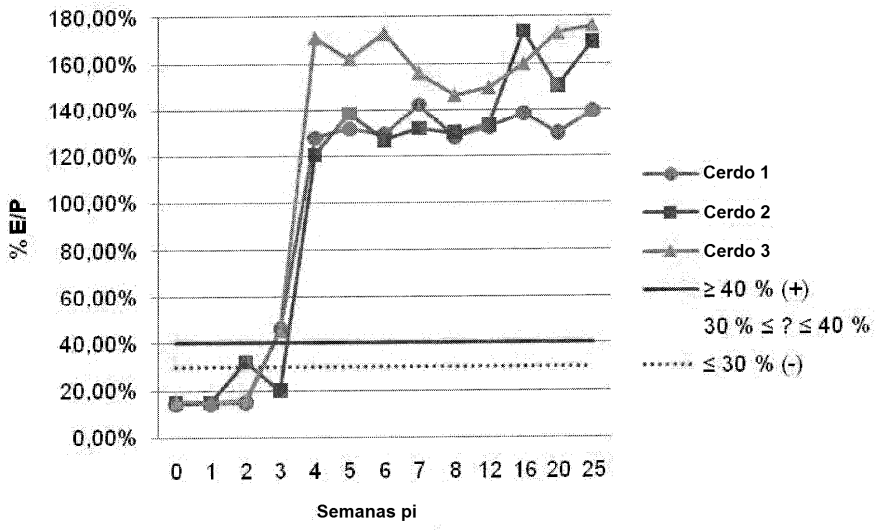
% E/P
180,00%
160,00%
140,00%
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
Semanas pi
Cerdo 1
Cerdo 2
Cerdo 3
≥ 40 % (+)
30 % ≤ ? ≤ 40 %
≤ 30 % (-)

Fig. 8

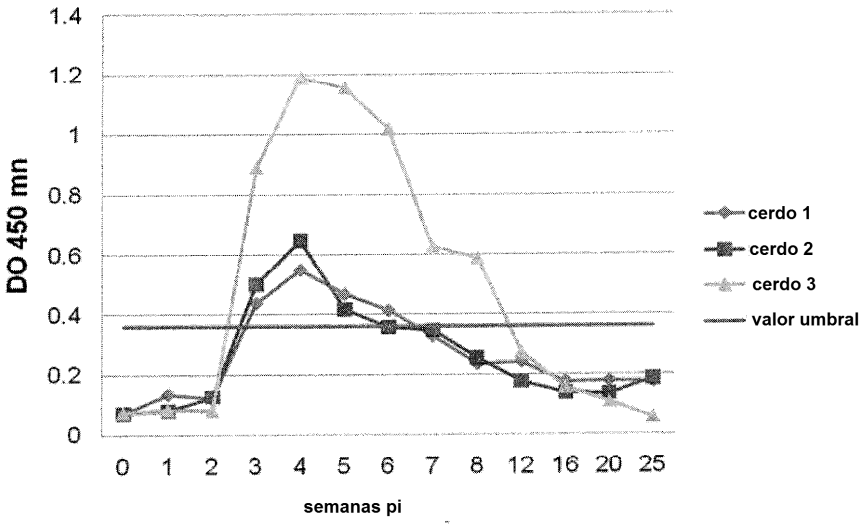
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DO 450 mn
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
semanas pi
cerdo 1
cerdo 2
cerdo 3
valor umbral

Fig. 9

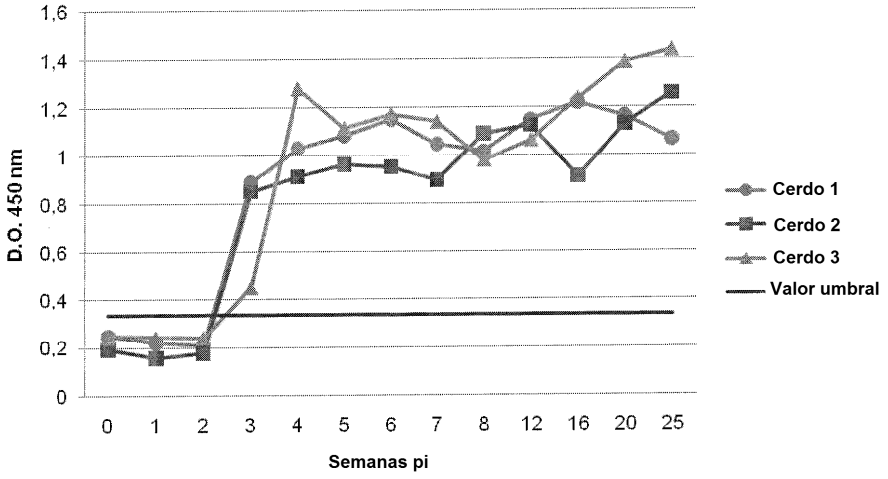
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
D.O. 450 nm
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
Semanas pi
Cerdo 1
Cerdo 2
Cerdo 3
Valor umbral

Fig. 10

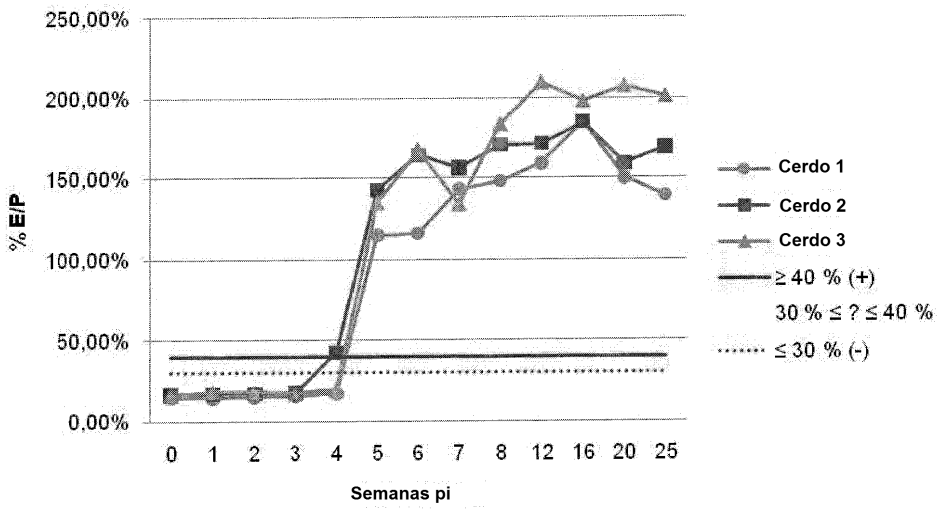
250,00%
200,00%
150,00%
100,00%
50,00%
0,00%
% E/P
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
Semanas pi
Cerdo 1
Cerdo 2
Cerdo 3
≥ 40 % (+)
30 % ≤ ? ≤ 40 %
≤ 30 % (-)

Fig. 11

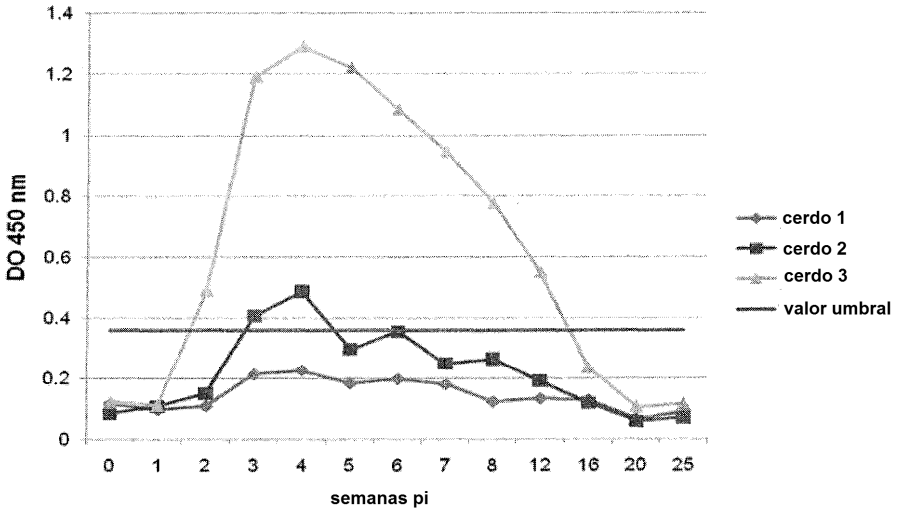
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DO 450 nm
0 1 2 3 4 5 6 7 8 12 16 20 25
semanas pi
cerdo 1
cerdo 2
cerdo 3
valor umbral

Fig. 12

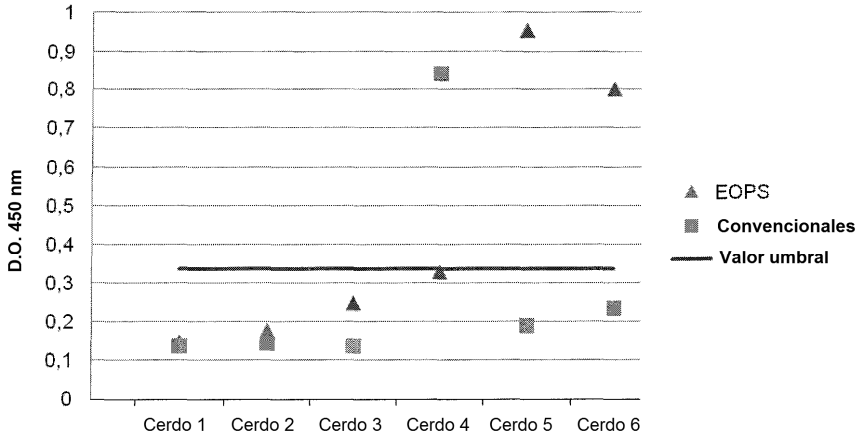
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
D.O. 450 nm
Cerdo 1 Cerdo 2 Cerdo 3 Cerdo 4 Cerdo 5 Cerdo 6
EOPS
Convencionales
Valor umbral

Fig. 13