

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2004
October-December

Artículo:

Inmunización de ratones BALB/c con un antígeno de larvas musculares de *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

Inmunización de ratones BALB/c con un antígeno de larvas musculares de *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante

Immunization of BALB/c mice with an antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae using *Lactobacillus casei* as adjuvant

Carlos Ramón Bautista Garfias^{*,**}
Adriana Posadas Beltrán^{**}
Olga Ixta Rodríguez^{**}

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the adjuvant capacity of *Lactobacillus casei* with larval antigens from *Trichinella spiralis*. Fifty BALB/c mice were allocated into five groups of ten animals each, divided into two subgroups (A and B) of five mice each. The treatments were administered by an intraperitoneal (i.p.) route as follows: Group 1 (G1) physiologic saline solution; Group 2 (G2) viable *Lactobacillus casei* (vLc); Group 3 (G3) vLc and soluble extract from *T. spiralis* muscle larvae (TspMLAg); Group 4 (G4) vLc, TspMLAg and incomplete Freund's adjuvant; Group 5 (G5) TspMLAg in Freund's complete adjuvant (FCA). At day 21 all mice were orally challenged with 400 *T. spiralis* muscle larvae per mouse. Animals in A subgroups were sacrificed at day four post-infection (p.i.) to determine the number of adult worms in the intestine (AWI); while those mice from B subgroups were sacrificed at day 31 p.i. to determine the number of larvae per gram of muscle tissue (LPGMT). The percentages of reduction of AWI were of 79, 68, 60 and 62 for G2, G3, G4 and G5, respectively, all significant ($P < 0.01$) with respect to the control group G1. The percentages of reduction of LPGMT were of 42.7, 87, 26.7 and 86.7 for G2, G3, G4 and G5, respectively. The maximal reduction of LPGMT observed in G3 and G5 was significant ($P < 0.01$) with respect to the other groups. It is concluded that viable *L. casei* behaves as an adjuvant when administered to mice along with *T. spiralis* antigens.

Key words: *TRICHINELLA SPIRALIS* ANTIGENS, IMMUNIZATION, *LACTOBACILLUS CASEI*, ADJUVANT, BALB/c MICE.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de adyuvante de *Lactobacillus casei* con antígenos de larvas de *Trichinella spiralis*. Se distribuyeron 50 ratones BALB/c en cinco grupos de diez animales, cada uno con dos subgrupos (A y B) de cinco ratones. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal (i. p.) como sigue: Grupo 1 (G 1), solución salina fisiológica; Grupo 2 (G 2), *Lactobacillus casei* viable (Lcv); Grupo 3 (G 3), Lcv y extracto soluble de larvas musculares de *Trichinella spiralis* (TspMLAg); Grupo 4 (G 4), Lcv, TspMLAg y adyuvante incompleto de Freund; Grupo 5 (G 5), TspMLAg en adyuvante completo de Freund. El día 21 todos los animales fueron confrontados vía oral con 400 LM de *T. spiralis* por ratón. Los roedores de los subgrupos A se sacrificaron el día cuatro posinfección (pi) para determinar el número de gusanos adultos en el intestino (GAI); mientras que los ratones de los subgrupos B se sacrificaron el día 31 pi para determinar el número de larvas por gramo de tejido muscular (LPGTM). Los porcentajes de reducción de GAI fueron de 79, 68, 60 y 62 para G 2, G 3, G 4 y G

Recibido el 30 de junio de 2003 y aceptado el 5 de enero de 2004.

*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 15.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

**Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Casco de Santo Tomás, 11340, México, D. F.

Correspondencia: Carlos Ramón Bautista Garfias, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 15.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, 62550, Morelos, México, Teléfono: (01) 77 7319 2850, Fax: (01) 77 7320 5544, E-mail: bautir@pavet.inifap.conacyt.mx

5, respectivamente, todos ellos significativos ($P < 0.01$) con respecto al grupo testigo G 1. Los porcentajes de reducción de LPGTM fueron de 42.7, 87, 26.7 y 86.7 para G 2, G 3, G 4 y G 5, respectivamente. La máxima reducción de LPGTM observada en G 3 y G 5 fue significativa ($P < 0.01$) con respecto a los otros grupos. Se concluye que *L. casei* viable funciona como adyuvante cuando se administra a ratones junto con antígenos de *T. spiralis*.

Palabras clave: ANTÍGENOS DE *TRICHINELLA SPIRALIS*, INMUNIZACIÓN, *LACTOBACILLUS CASEI*, ADYUVANTE, RATONES BALB/c.

Introduction

Different strategies have been developed to control parasitic diseases of man and domestic animals; among them, animal management, education in man, genetic selection, use of antiparasitic drugs, and vaccination. The first four methods are known since a long time ago; however, they have not produced the wished results or they have serious drawbacks. For example, genetic selection is expensive and a considerable period of time is required (several generations) to obtain resistant animals, besides it is necessary to preserve the desired productive characteristics.¹ Probably with the new genetic-production technologies—for example, the development of transgenic mice resistant to *Nippostrongylus brasiliensis*—² practical results could be obtained in a medium or a long-term.

An undesirable effect of antiparasitic drugs is that they contaminate the environment, including animal products for human consumption and, besides, their uncontrolled use has induced the appearance of parasite strains resistant to chemical products, which restraint more their use.³ With respect to the vaccines against parasites, even though is a desirable control method, at the present there is not availability of commercial vaccines due to the difficulty to identify, isolate and produce specific antigens (in different parasitic diseases) to a commercial scale. The need for safer vaccines has favored the development of new generation antigens (synthetic peptides, recombinant proteins) which, however, are poor immunogenic by themselves and need adjuvants to stimulate an immune response, in such a way that the development of new subunit vaccines relies on the crucial immunomodulator role of adjuvants. Particularly in Mexico, there is the need for developing new adjuvants, which stimulate an appropriated immune response (for example, T cell immunity against intracellular pathogens) and that they do not cause undesirable collateral effects for using them safely with defined antigens in vaccination programs and to obtain the adequate protection in a particular animal species, including the human being.⁴⁻⁶

Introducción

Se han desarrollado diferentes estrategias para el control de las enfermedades parasitarias del hombre y sus animales domésticos, entre ellas el manejo de los animales, la educación en el hombre, la selección genética, el uso de fármacos antiparasitarios y la vacunación. Los primeros cuatro métodos se conocen desde hace mucho tiempo; sin embargo, no han producido los resultados deseados o tienen serios inconvenientes. Por ejemplo, la selección genética es costosa y se requiere de un tiempo considerable (varias generaciones) para obtener los animales resistentes a cierto tipo de enfermedad, además es necesario que se conserven las características deseables de producción.¹ Probablemente con las nuevas tecnologías de ingeniería genética—por ejemplo, el desarrollo de ratones transgénicos resistentes a la infección con *Nippostrongylus brasiliensis*—² se obtengan resultados prácticos a mediano o largo plazos.

Los fármacos antiparasitarios tienen el inconveniente de que contaminan el ambiente, incluyendo los productos de origen animal para consumo humano y, además, su uso indiscriminado ha provocado la aparición de cepas de distintos parásitos resistentes a los fármacos, ello limita su empleo.³ En cuanto a las vacunas contra parásitos, aunque es un método deseable, todavía no se dispone de vacunas comerciales debido a la dificultad de identificar, aislar y producir antígenos específicos (en diferentes enfermedades parasitarias) a escala comercial. La necesidad de contar con vacunas más seguras ha propiciado el desarrollo de antígenos de nueva generación (péptidos sintéticos, proteínas recombinantes) que, sin embargo, por sí solos son poco inmunogénicos y necesitan de adyuvantes para estimular una respuesta inmunitaria, de tal manera que el desarrollo de las nuevas vacunas de subunidad dependerá del papel inmunomodulador crucial de los adyuvantes. Existe la necesidad de desarrollar nuevos adyuvantes, particularmente en México, que estimulen una respuesta inmunitaria apropiada (por ejemplo, inmunidad de células T contra patógenos intracelulares) y que no provoquen efectos colaterales

In this scenario, it is evident the need for developing alternative methods for the control of parasitic diseases; for example, the use of immunostimulants,⁷ such as the lactic acid bacteria; *Lactobacillus casei* stands out for its capacity to stimulate the host's immune system,⁸⁻¹¹ in such a way that induces in mice nonspecific protection against *Trichinella spiralis* infections,^{8,12,13} parasite which causes one of the most important parasitic zoonosis in the world.¹⁴ Furthermore, it has been demonstrated that *L. casei* has adjuvant properties when is administered by oral route.¹⁵⁻¹⁷ There are not antecedents on the use of *L. casei* as adjuvant with parasite antigens, for this reason the aim of the present experiment was to evaluate its protective effect when is administered with antigens from *T. spiralis* muscle larvae in BALB/c mice, against an experimental infection with parasite's infective larvae.

Material and methods

Experimental animals

To maintain the *T. spiralis* strain, NIH mice were used; while for the immunization assay 2-3 month-old female BALB/c mice, parasite free, with an average weight of 20 g were used. Mice were allocated in acrylic cages containing sterilized sawdust where they were fed with commercial food and drank water *ad libitum*.

Parasite

The *Trichinella spiralis* strain used (ISS3) has been maintained in laboratory by serial passage in NIH mice and Wistar rats.¹²

Muscle larvae (ML) were obtained according to the methods of Slaton Blair.¹⁸ *T. spiralis* infected mice were sacrificed by cervical dislocation; subsequently the obtained skeletal muscle mass was grinded and then digested in saline solution containing 1% pepsin HCl, which was maintained in a warm bath at 37°C with a continuous air flux during three hours. This solution was screened through two sieves, numbers 100 and 200; subsequently it was washed with tap water and finally larvae were recovered from a sieve number 200.

The larvae obtained were used to prepare a soluble extract and to infect more mice. The number of larvae/ml was determined by using a chamber for counting nematodes. The required number of larvae was adjusted and this was inoculated to each mouse trough an oral probe.

indeseables para utilizarlos de manera segura con antígenos definidos en programas de vacunación y obtener la protección adecuada en la especie animal que se desee, incluyendo al ser humano.⁴⁻⁶

Así, es evidente la necesidad de desarrollar métodos alternos para el control de enfermedades parasitarias; por ejemplo, el uso de inmunoestimulantes,⁷ como las bacterias ácido-lácticas; destaca el *Lactobacillus casei* por su capacidad para estimular el sistema inmunitario del huésped,⁸⁻¹¹ de manera que genera protección inespecífica contra infecciones por *Trichinella spiralis*,^{8,12,13} responsable de una de las zoonosis parasitarias más importantes en el mundo.¹⁴ Además, se ha demostrado que *L. casei* es adyuvante cuando se administra por vía oral.¹⁵⁻¹⁷ No hay antecedentes sobre el uso de *L. casei* como adyuvante con antígenos de parásitos, por lo que se realizó este experimento, que pretende evaluar su efecto protector administrado con antígenos de larvas musculares de *T. spiralis* en ratones BALB/c, contra una infección experimental con larvas infectivas del parásito.

Material y métodos

Animales de experimentación

Para mantener la cepa de *T. spiralis* se usaron ratones NIH, y para el esquema de inmunización ratones BALB/c de 2-3 meses de edad, hembras, pesaban 20 g. Se les practicó examen coproparasitológico para verificar que no estuvieran parasitados. Luego se alojaron en jaulas de acrílico con aserrín esterilizado y se les dio alimento comercial y agua *ad libitum*.

Parásito

La cepa de *Trichinella spiralis* utilizada (ISS3) se ha mantenido en el laboratorio por pases seriados en ratones NIH y en ratas Wistar.¹²

La obtención de larvas musculares (LM) se hizo con los métodos de Slaton Blair.¹⁸ Los ratones infectados con *T. spiralis* se sacrificaron por dislocación cervical para obtener músculo esquelético, que fue triturado con un molino de carne y digerido con solución salina que contenía pepsina 1%-HCl, y mantenido en baño María a 37°C con flujo continuo de aire durante tres horas. La solución de digestión se pasó por dos tamices, números 100 y 200, para lavarla con agua de la llave y luego recuperar las LM del tamiz de 200.

El paquete de LM obtenido se usó para preparar el extracto soluble total e infectar más ratones. El número de larvas/ml se determinó mediante una cámara cuenta-nematodos. Luego se ajustó al número de larvas requerido y se inoculó a cada ratón vía oral, con sonda.

Preparation of the *Trichinella spiralis* muscle larvae soluble extract (MLSE)

The MLSE was prepared according with the method of Jungery *et al.*¹⁹ for obtaining parasite surface antigens. ML were suspended in a 10 mM, pH 8.1 trizma-base solution containing a protease-inhibition cocktail.* This suspension was macerated in a Wheaton tissue homogenizer during 15 min at 4°C, then, to solubilize proteins, 2% sodium desoxicolate was added to the suspension, which was homogenized for additional 10 min. This suspension was then centrifuged at 14 000 *g* during one hour in a refrigerated Eppendorf centrifuge. Subsequently the supernatant –*T. spiralis* muscle larvae antigen (Tsp MLAG)– was collected and its protein concentration was determined by the Lowry method.²⁰ The antigen dose used for immunization was 100 g in accordance with the results of Darwish *et al.*²¹

Bacteria

The *Lactobacillus casei*, strain ATCC7469, was grown in MRS broth at 37°C during 18 h. The microorganisms were harvested and centrifuged at 5 000 *g* during 10 min, they were washed several times with sterile phosphate buffered saline solution,⁸ later the viable count was determined and the viable bacteria concentration was adjusted (cfu).

Adjuvants

Freund's complete adjuvant (FCA) or Freund's incomplete adjuvant (FIA),** were mixed with the antigen (v/v) before immunization.

Immunization protocol

Fifty BALB/c female mice, parasite free, were distributed at random into five groups of ten animals each. Mice in groups 1 and 2 were treated by intraperitoneal route (i.p.) with saline solution and viable *Lactobacillus casei* (vLc, 1.8×10^9 fcu), respectively, on day 14. Mice in groups 3, 4 and 5 were treated by i.p. route with vLc (1.8×10^9 cfu) plus 100 g of *T. spiralis* muscle larvae antigen (TspMLAg), vLc (1.8×10^9 cfu) plus 100 g of TspMLAg in Freund's incomplete adjuvant (FIA), and 100 g of TspMLAg in Freund's complete adjuvant (FCA), respectively, on days zero, seven and 14. Infection was carried by oral route on day 21 with 400 *Trichinella spiralis* muscle larvae per mouse. Five animals in each group were sacrificed four days after infection (d.a.i) to determine adult worms in the intestine, while the remaining mice in each group were sacrificed 31 d.a.i to evaluate larvae per gram of muscle tissue.

Obtención del extracto soluble de larvas musculares(ESLM) de *Trichinella spiralis*

El ESLM se obtuvo con el método de Jungery *et al.*¹⁹ para obtener antígenos de superficie del parásito. El paquete de LM se resuspendió en una solución de trizma-base 10 mM, pH 8.1 que contenía un coctel de inhibidores de proteasas.* La suspensión de parásitos se maceró en un homogeneizador de tejidos Wheaton durante 15 min a 4°C, luego, para solubilizar proteínas, a la suspensión se le adicionó desoxicolato de sodio a concentración de 2% y se siguió con la homogeneización durante diez minutos. Al final se centrifugó el lisado a 14 000 *g* durante una hora en una centrífuga Eppendorf refrigerada. Después se recolectó el sobrenadante –antígeno de larvas musculares de *T. spiralis* (TspMLAg)–, cuya concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.²⁰ La dosis de antígeno en la inmunización fue de 100 g con base en los resultados de Darwish *et al.*²¹

Bacteria

Se utilizó la cepa ATCC7469 de *Lactobacillus casei* cultivada en medio MRS a 37°C durante 18 h. Los microorganismos fueron cosechados por centrifugación a 5 000 *g* por 10 min, se lavaron varias veces con solución salina estéril,⁸ se determinó la cuenta viable y se ajustó a la concentración deseada (ufc).

Adyuvantes

Se utilizaron los adyuvantes completo de Freund (FCA) e incompleto de Freund (FIA),** mezclando v/v con el antígeno antes de la inmunización.

Protocolo de inmunización

Cincuenta ratones hembra BALB/c, libres de parásitos, fueron distribuidos al azar en cinco grupos de diez animales cada uno. Los de los grupos 1 y 2 se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) con solución salina fisiológica y *Lactobacillus casei* viable (Lcv, 1.8×10^9 ufc), respectivamente, en el día 14. Los ratones de los grupos 3, 4 y 5 fueron tratados por vía i. p. con Lcv (1.8×10^9 ufc) más 100 g de antígeno de larvas musculares de *T. spiralis* (TspMLAg), Lcv (1.8×10^9 ufc) más 100 g de TspMLAg más adyuvante incompleto de Freund (FIA) y 100 g de TspMLAg más adyuvante completo de Freund (FCA), respectivamente, en los días cero, siete y 14. La infección se llevó a cabo por

*Complete <TM> Mini, Boehringer, Germany.

**Sigma, Missouri, USA.

Assessment of *Trichinella spiralis* adult worms

Mice were sacrificed by cervical dislocation; next the small intestine from each animal was placed in isotonic saline solution and was cut both longitudinally and transversally. Later, the intestine in saline solution was exposed during 5 min at 4°C, then it was placed in gauze on the Baerman apparatus, which consists in a funnel with rubber tubing and a Mohr pincer to avoid liquid spillage, containing warm physiologic saline solution (approximately at 40°C) and left during 24 h. Adult worms were collected in an assay tube adapted to the final part of the rubber tubing and then placed in 70% alcohol for fixing. The number of adult worms per mouse was carried out in a chamber for counting nematodes.⁸

Assessment of *Trichinella spiralis* larvae per gram of muscle tissue (LPGTM)

Recovering of muscle larvae was carried out in accordance with the methods of Slaton Blair,¹⁸ and, according with the muscle mass, the number of LPGTM was calculated.

Statistical analysis

Results were examined by the analysis of variance (ANOVA).²²

Results

The treatments with viable *Lactobacillus casei* generated significant protection in mice ($P < 0.01$) which was showed as a reduction, both in the number of adult worms in the intestine (AWI) as in the number of larvae per gram of muscle tissue (LPGTM) from a challenge infection with *Trichinella spiralis* infective larvae, as compared with controls treated with physiologic saline solution.

In Table 1 is shown the average of adult worms recovered from immunized mice four days after infection. The averages of AWI obtained in groups 1, 2, 3, 4, and 5 were 310, 65, 98, 123 and 117, respectively; and the percentage reduction averages obtained, with respect to the group 1 (control), were 79, 68, 60 and 62 for the groups 2, 3, 4, and 5, respectively. It is worth to point out that *L. casei* treatment lowered in 79% the amount of recovered worms (Table 1).

In Table 2 is shown the average of larvae per gram of muscle tissue (LPGTM) recovered 31 days after infection. The averages of LPGTM obtained in groups 1, 2, 3, 4, and 5 were 10 290, 5 896, 1 313, 7 539 and 1 371, respectively; while the percentage reduction aver-

vía oral en el día 21 con 400 larvas musculares de *Trichinella spiralis* por ratón. Cinco animales de cada grupo fueron sacrificados cuatro días después de la infección (ddi) para determinar gusanos adultos en el intestino, los restantes ratones de cada grupo fueron sacrificados en el día 31 ddi para determinar larvas por gramo de tejido muscular.

Determinación de gusanos adultos de *Trichinella spiralis*

Para obtener los gusanos adultos, los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical. Posteriormente se colocó el intestino delgado de cada animal en solución salina isotónica y se cortó tanto longitudinal como transversalmente. Mientras tanto, se montó el aparato de Baerman, que consiste en un embudo con una tubería de látex en el cuello y una pinza Mohr, para evitar la salida de los líquidos, a este embudo se le colocó un pedazo de gasa y se le añadió solución salina fisiológica (SSF) caliente, aproximadamente a 40°C. El intestino en SSF se expuso a 4° C durante 5 min y luego se colocó en la gasa y así se dejó durante 24 h. Los gusanos adultos se recolectaron en un tubo de ensaye a partir de la parte final de la tubería por la migración debida al contraste de ambiente. Los adultos recuperados se colocaron en alcohol al 70% para la fijación. El conteo se realizó en una cámara cuenta-nematodos y se obtuvo el número de adultos por ratón.⁸

Determinación de larvas de *Trichinella spiralis* por gramo de tejido muscular (LPGTM)

La recuperación de LM se hizo de acuerdo con los métodos de Slaton Blair,¹⁸ después, de acuerdo con la masa muscular, se calculó el número de LPGTM.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron examinados por medio de análisis de varianza (ANDEVA).²²

Resultados

Los tratamientos con *Lactobacillus casei* viable generaron protección significativa ($P < 0.01$) en los ratones, que se manifestó como una reducción, tanto en el número de gusanos adultos en el intestino (GAI) como en el de larvas por gramo de tejido muscular (LPGTM), provenientes de la infección de confrontación con larvas infectivas de *Trichinella spiralis*, en comparación con los testigos tratados con solución salina fisiológica.

En el Cuadro 1 se indica el promedio de gusanos

Cuadro 1

PROMEDIO DE GUSANOS ADULTOS DE *Trichinella spiralis* RECUPERADOS AL CUARTO DÍA POSINFECCIÓN DEL INTESTINO DE RATONES INMUNIZADOS CON ANTÍGENOS DE *T. spiralis*

AVERAGE *Trichinella spiralis* ADULT WORMS RECOVERED FOUR DAYS AFTER CHALLENGE FROM THE INTESTINE OF MICE INMUNIZED WITH *T. spiralis* ANTIGENS

Group	Treatment	Average $\pm$ Standard error*	% reduction
1	SS	310.2 $\pm$ 17.27 ^a	--
2	Lc	65.4 $\pm$ 20.31 ^b	79
3	TspMLAg-Lc	98 $\pm$ 21.49 ^b	68
4	TspMLAg-Lc-FIA	123.2 $\pm$ 28.94 ^b	60
5	TspMLAg-FCA	116.8 $\pm$ 12.15 ^b	62

Lc: *Lactobacillus casei*; SS: physiologic saline solution; TspMLAg-Lc: *T. spiralis* muscle larvae antigen + *L. casei*; TspMLAg-Lc-FIA: as in the previous group + Freund's incomplete adjuvant; TspMLAg-FCA: *T. spiralis* muscle larvae antigen + Freund's complete adjuvant.

*Different literals in the same column indicate a significant difference (P < 0.01)

Cuadro 2

PROMEDIO DE LARVAS DE *Trichinella spiralis* POR GRAMO DE TEJIDO MUSCULAR 31 DÍAS POSINFECCIÓN EN RATONES INMUNIZADOS CON ANTÍGENOS DE *T. spiralis*

AVERAGE *Trichinella spiralis* LARVAE PER GRAM OF MUSCLE TISSUE 31 DAYS AFTER CHALLENGE FROM IN MICE INMUNIZED WITH *T. spiralis* ANTIGENS

Group	Treatment	Average $\pm$ Standard error*	% reduction
1	SS	10290 $\pm$ 111.93 ^a	--
2	Lc	5896 $\pm$ 23.28 ^c	42.7
3	TspMLAg-Lc	1312.9 $\pm$ 6.86 ^d	87
4	TspMLAg-Lc-FIA	7539 $\pm$ 7.69 ^b	26.7
5	TspMLAg-FCA	1371 $\pm$ 7.23 ^d	86.7

Lc: *Lactobacillus casei*; SS: physiologic saline solution; TspMLAg-Lc: *T. spiralis* muscle larvae antigen + *L. casei*; TspMLAg-Lc-FIA: as in the previous group + Freund's incomplete adjuvant; TspMLAg-FCA: *T. spiralis* muscle larvae antigen + Freund's complete adjuvant.

* Different literals in the same column indicate a significant difference (P < 0.01)

ages, with respect to the group 1 (control), were of 42.7, 87, 26.7, and 86.7 for the groups 2, 3, 4, and 5, respectively.

Discussion

The results of this research corroborate the findings on the use of *L. casei* in inducing non-specific resistance against *Trichinella spiralis* infection, both in NIH mice,^{8,12} as in BALB/c mice.¹³ In those studies it was demonstrated that viable or dead *L. casei*, administered by intraperitoneal or oral routes before *T. spiralis* infection, induces a protective response directed against the adult worms in the intestine (AWI) and,

adultos recuperados cuatro días después de la infección de ratones inmunizados con los tratamientos. Los promedios de GAI obtenidos en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron 310, 65, 98, 123 y 117, respectivamente, y los porcentajes de reducción obtenidos, respecto del grupo 1 (testigo), fueron 79, 68, 60 y 62 para los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Cabe resaltar que la administración de *L. casei* redujo en 79% la cantidad de gusanos recuperados (Cuadro 1).

En el Cuadro 2 se muestra el promedio de larvas recuperadas por gramo de tejido muscular (LPGTM) 31 días después de la infección. Los promedios de LPGTM obtenidos en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron 10 290, 5 896, 1 313, 7 539 y 1 371, respectivamente;

in a lesser extent, against muscle larvae (larvae per gram of muscle tissue, LPGTM). In the present study, *L. casei* by itself induced maximal reduction of AWI (79%); however, this was not different from that generated by the combinations of larvae antigen (TspMLAg) + *L. casei* (68%), TspMLAg + *L. casei* + FIA (60%) or TspMLAg + FCA (62%). This result corroborates the fact that *L. casei* induces a potent nonspecific immune response in the intestine, which affects the implantation of *T. spiralis* adult worms. This observation also indicates that in order to generate a better immune response against AWI, is necessary a study in which antigens from adult *T. spiralis* worms be administered in an adjuvant (for example, *L. casei*).

With respect to the muscle larvae, the reduction percentages in the treatments TspMLAg + *L. casei* and TspMLAg + FCA were of 87 and 86.7, respectively, and these were better than the reduction percentage obtained by Darwish *et al.* in mice²¹ against muscle larvae (80%) when they used larvae antigens to immunize, and similar to the reduction percentage of muscle larvae (86%) observed by these authors when they immunized mice with a combination of antigens from larvae and from adults. When immunization is carried out with different parasite's stages effective protective responses are generated against the particular stage used to immunize; however, a weaker protection against the other stages is induced, as is shown by the results of Darwish *et al.*,²¹ probably due to the presence of shared antigens among stages.^{23,24}

The results of the present study support the previous observations; on the basis that although the protective response generated by the immunization with larvae antigens was better against muscle larvae, a protection against adult worms was also observed; this indicates that viable *L. casei* functions as adjuvant, similar to the FCA. In this context, in a study where the adjuvants "TiterMax", alum, ISCOMs and FCA were evaluated to immunize NIH mice against *T. spiralis* antigens, the best result was obtained with FCA;²⁵ however, this adjuvant has important disadvantages.²⁶ In this order, when the efficiency of two adjuvants (FCA and aluminum hydroxide), administered with antigens from *T. spiralis* larvae by intraperitoneal route in swine, was tested, it was showed that the FCA had better efficiency (57% muscle larvae reduction), than the aluminum hydroxide (37% reduction). Nonetheless, it was concluded that the FCA causes undesirable secondary effects when is used in swine;²⁶ for this reason *L. casei* might be (previous validation studies in swine) a satisfactory adjuvant for using in this species. If it is true that the intraperitoneal inoculation of antigen in adjuvant represents a difficulty, this could be avoid by delivering the anti-

mientras que los porcentajes de reducción, respecto del grupo 1 (testigo), fueron de 42.7, 87, 26.7 y 86.7 para los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Discusión

Los resultados de esta investigación confirman los hallazgos sobre el uso de *L. casei* en la inducción de resistencia inespecífica contra la infección por *Trichinella spiralis*, tanto en ratones NIH^{8,12} como en ratones BALB/c.¹³ En esos estudios se demostró que *L. casei* viable o muerto, administrado por vía intraperitoneal u oral antes de la infección con *T. spiralis*, genera una respuesta protectora dirigida contra los gusanos adultos en el intestino (GAI) y en menor proporción contra las larvas musculares (larvas por gramo de tejido muscular, LPGTM). En este estudio, *L. casei* por sí solo indujo la máxima reducción de GAI (79%); sin embargo, ésta no fue distinta de la producida por las combinaciones de antígeno de larvas (TspMLAg) más *L. casei* (68%), TspMLAg más *L. casei* más FIA (60%) o TspMLAg más FCA (62%). Este resultado corrobora que *L. casei* induce una respuesta inmune inespecífica y potente en el intestino, la cual afecta la implantación de los gusanos adultos de *T. spiralis*. Esta observación indica que para generar una mejor respuesta inmune contra GAI, es necesario un estudio en el que se administraran antígenos de adultos de *T. spiralis* en un adyuvante (por ejemplo, *L. casei*).

En cuanto a las larvas musculares, los porcentajes de reducción en los tratamientos con TspMLAg más *L. casei* y TspMLAg más FCA fueron de 87 y 86.7, respectivamente, y resultaron superiores al porcentaje de reducción contra larvas musculares (80) obtenido por Darwish *et al.* en ratones²¹ cuando usaron antígenos de larvas para inmunizar y similares a la reducción de larvas musculares (86%) observada por dichos autores cuando inmunizaron con una combinación de antígenos de adultos y de larvas. Cuando se inmuniza con diferentes estadios del parásito se generan respuestas protectoras más efectivas contra el estadio particular que se utilizó para inmunizar, pero también se induce una protección menor contra los otros estadios de desarrollo, como lo demuestran los resultados de Darwish *et al.*,²¹ probablemente debido a la presencia de antígenos compartidos entre dichos estadios.^{23,24}

Los resultados del presente estudio apoyan las observaciones anteriores, pues, aunque la respuesta protectora generada por la inmunización con antígenos de larvas fue mayor contra larvas musculares, también se observó protección contra gusanos adultos, ello indica que *L. casei* viable se comportó como buen adyuvante, similar al FCA. En este contexto,

gen in adjuvant through the nasal mucosa, as it has been demonstrated in mice, using B Cholera toxin as adjuvant, with *Ascaris suum*²⁷ and *Trichinella spiralis*²⁸ antigens; procedure which generated protective responses against infection with these parasites. In the same way, it has been demonstrated that the intranasal inoculation of *L. casei* in mice induces protective responses against the influenza virus.²⁹ Taking into account the previous information and the results of the present study, it would be feasible to test an immunization protocol against *T. spiralis*, by inoculating this parasite antigens together with *L. casei* by intranasal route. It would be of particular interest to evaluate this route of inoculation in swine, using *L. casei* as adjuvant with antigens from *T. spiralis* newborn larvae, on the basis that the swine's immune response against *T. spiralis* is mainly directed against newborn larvae.³⁰

The low reduction percentage of LPGTM (26.7), observed in the group treated with TspMLAg + *L. casei* + FIA, although was significant with respect to the control group ($P < 0.01$), it also was lower ($P < 0.01$) than the reduction percentages obtained in the groups 2, 3, and 5; result which probably could be related to the fact that the *L. casei* used in the FIA was not in the optimum proportion, the combination of viable *L. casei* and mineral oil was not adequate, or that dead bacteria must be utilized when a mineral oil is used (AIF).

On the other hand, it is known that lipids, proteins and amino acids from pathogenic microorganisms such as parasites, virus and bacteria, contain conserved regions named pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are recognized by receptors present on cells of the immune system, and are known as Toll-like receptors. These receptors, when recognize PAMPs, unleash signaling chains, which final product is the increase of immune gene transcriptions, such as cytokines, which activate the innate and adaptive immune responses.³¹ The lactic-acid bacteria *Lactobacillus casei* is a potent stimulator of the immune response that protects the host against different infections,^{9,12,32} which in part is due to the stimulation of Toll-like receptors 2 (TLR2) on macrophages by the lactobacilli lipoteichoic acids.³³ Likewise, it is worth to note that last generation adjuvants such as MPL and Ribi.529, activate the innate immune response by stimulating Toll-4-like receptors (TLR4).³⁴

On the other hand, there are not published studies on the use of *L. casei* as adjuvant with *T. spiralis* antigens in animal immunization trials so the present study represents the first of its kind and implicates that more research is needed to deepen and improve the use of the lactobacilli as adjuvant. Likewise, *L. casei* offers the required potential to be used as adjuvant with different parasites antigens for the control of parasitic diseases, taking into account the needs for developing new and

en un estudio en el que evaluaron los adyuvantes "TiterMax", alumbre, ISCOMs y FCA, para inmunizar ratones NIH con antígenos de *T. spiralis*, se obtuvo el mejor resultado total con el FCA;²⁵ sin embargo, dicho adyuvante presenta serias desventajas.²⁶ En este sentido, al evaluar la eficiencia de dos tipos de adyuvantes (FCA e hidróxido de aluminio), administrados con antígenos de larvas de *T. spiralis* vía intraperitoneal en cerdos, se observó que el FCA tuvo mayor eficiencia (57% de reducción de larvas musculares), que el hidróxido de aluminio (37% de reducción). No obstante, se concluyó que el FCA causa efectos secundarios dañinos al utilizarlo en cerdos,²⁶ por lo que se debe buscar otro tipo de adyuvante que no tenga esos efectos secundarios; por tal razón, *L. casei*, previos estudios de validación en cerdos, podría ser un adyuvante adecuado. Si bien es cierto que la administración intraperitoneal de antígeno en adyuvante, representa cierto grado de dificultad, ésta podría ser evitarse administrando el antígeno y el adyuvante a través de la mucosa nasal, como se ha demostrado en ratones, usando la toxina B de cólera como adyuvante, con antígenos de *Ascaris suum*²⁷ y *Trichinella spiralis*,²⁸ procedimiento que generó respuestas protectoras contra la infección con estos parásitos. Asimismo, se ha demostrado que la aplicación intranasal de *L. casei* en ratones induce respuestas protectoras contra la infección con el virus de influenza.²⁹ Considerando la información anterior y los resultados del presente estudio, sería factible ensayar un protocolo de inmunización contra *T. spiralis*, inoculando antígenos del parásito junto con *L. casei* por vía intranasal. Sería de particular interés evaluar esta vía de administración en cerdos, usando *L. casei* como adyuvante con antígenos de larvas recién nacidas de *T. spiralis*, y tomando en consideración que la respuesta inmune del cerdo contra *T. spiralis* está dirigida contra larvas recién nacidas.³⁰

El bajo porcentaje de reducción de LPGTM (26.7), observado en el grupo tratado con TspMLAg más *L. casei* más FIA, aunque fue significativo con respecto al grupo testigo ($P < 0.01$), también fue significativamente menor ($P < 0.01$) a los porcentajes de reducción obtenidos en los grupos 2, 3 y 5, resultado que podría deberse a que la cantidad de *L. casei* utilizada en el FIA no fue la óptima, a que la combinación de *L. casei* viable y aceite mineral no es adecuada, o a que cuando se usa un aceite mineral (AIF) se deben utilizar bacterias muertas.

Por otro lado, se sabe que lípidos, proteínas y aminoácidos de microorganismos patógenos como parásitos, virus y bacterias, contienen ciertas regiones conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que

better immunologic adjuvants for their use in vaccines of veterinary interest.³⁵

On the basis of the previous information and on the particular conditions in which the present study was carried out, it is concluded that: 1) significant *Trichinella spiralis* percentage reductions were obtained after a challenge infection in BALB/c mice immunized with *T. spiralis* muscle larvae and *L. casei* as adjuvant; 2) although reductions in worm load, adults and larvae, were observed in immunized animals the most noticeable protective effect was directed against larvae than against adult worms; 3) the protection induced by the immunization of BALB/c mice with *T. spiralis* larvae antigens and viable *L. casei* against a challenge infection with *T. spiralis* infective larvae was similar to that obtained by the immunization with *T. spiralis* larvae antigens and Freund's complete adjuvant (reference adjuvant).

Acknowledgements

The present study was carried out with funds from the Conacyt project 31524-B. Authors thanks to Mario Henry Rodríguez, Fernando Romero Torres, and Alberto Arzave from The National Institute for Public Health of the Health Department, the donation of BALB/c mice.

Referencias

1. Gasbarre LC, Eighton EA, Sonstegard T. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2001; 98: 51-64.
2. Daly CM, Mayrhofer G, Dent La. Trapping and immobilization of *Nippostrongylus brasiliensis* larvae at the site of inoculation in primary infections of interleukin-5 transgenic mice. *Infect Immun* 1999 67: 5315-5323.
3. Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health* 2001; 6: 874-882.
4. Cornelissen AW, Schetters TP. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 15: 61-72.
5. Brake DA. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *Int J Parasitol* 2002; 32: 509-515.
6. Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today* 2003; 8:934-943.
7. Bautista-Garfias CR, Zeron-Bravo F, De la Jara-Alcocer F, Flores-Castro R. Effect of three immunostimulants on the resistance against *Trichinella spiralis* infection in mice (preliminary report). *Arch Med Res* 1995; 26: 91-93.

son identificados por receptores presentes en las células del sistema inmunitario, entre ellos los receptores tipo Toll. Estos receptores, al reconocer los PAMP, desencadenarán cadenas de señalización, cuyo producto final es el incremento en la transcripción de genes inmunitarios, como las citocinas, que activan la respuesta inmune innata y adaptativa.³¹ La bacteria ácido-láctica *Lactobacillus casei* es un potente estimulador de la respuesta inmunitaria que protege al huésped contra distintas infecciones,^{9,12,32} que se debe, en parte, a la estimulación que ejercen los ácidos lipoteicoicos del lactobacilo sobre receptores tipo Toll 2 (TLR2) en macrófagos.³³ Asimismo, cabe señalar que los adyuvantes de última generación como, MPL y Ribi.529, activan la respuesta inmunitaria innata a través de la estimulación de receptores tipo Toll 4.³⁴

Por otra parte, no existen estudios sobre el uso de *L. casei* como adyuvante con antígenos de *T. spiralis* en procedimientos de inmunización de animales, por lo que este trabajo representa el primero en su tipo e implica que todavía se requiere llevar a cabo más investigaciones al respecto, para profundizar y perfeccionar el uso del lactobacilo como adyuvante. Asimismo, *L. casei* ofrece el potencial necesario para utilizarse como adyuvante con diversos antígenos de parásitos con el fin de controlar enfermedades parasitarias, tomando en cuenta las necesidades actuales de desarrollar nuevos y mejores adyuvantes inmunológicos para su utilización en vacunas de interés veterinario.³⁵

Con base en lo anterior y bajo las condiciones en que se llevó a cabo este trabajo, se concluye que: 1) Se obtuvieron porcentajes significativos de reducción de *Trichinella spiralis* de una infección de confrontación en ratones BALB/c inmunizados con antígenos de larvas musculares de *T. spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante; 2) aunque se observaron reducciones en la carga parasitaria, tanto de adultos como de larvas musculares en los animales inmunizados, el efecto protector fue más notorio contra las larvas que contra los adultos; 3) la protección conferida por la inmunización de ratones BALB/c con *L. casei* viable, junto con antígenos de larvas de *T. spiralis*, contra una infección de desafío con larvas infectivas fue similar a la obtenida por la inmunización con adyuvante completo de Freund (adyuvante de referencia).

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por el proyecto 31524-B del Conacyt. Se agradece a Mario Henry Rodríguez, Fernando Romero Torres y Alberto Arzave, del Instituto Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud, la donación de los ratones BALB/c.

8. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodriguez O, Martinez-Gomez F, Lopez MG, Aguilar-Figueroa BR. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* 2001; 8: s226-228.
9. Kato I, Tanaka K, Yokokura T. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21: 121-131.
10. Perdigon G, De Macias ME, Alvarez S, Oliver G, De Ruiz Holgado AA. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun* 1986; 53: 404-410.
- Perdigon G, De Macias ME, Alvarez S, Oliver G, De Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988; 63: 17-23.
11. Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988; 63: 17-23.
12. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodriguez O, Martinez-Gomez F, Lopez MG, Aguilar-Figueroa B, Cortes A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: effect on *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol* 1999; 80: 251-260.
13. Bautista-Garfias CR, Fernández AR, Posadas-Beltrán A, Ixta-Rodríguez O. Efecto del tratamiento oral e intraperitoneal de ratones BALB/c con *Lactobacillus casei* sobre el establecimiento de adultos de *Trichinella spiralis*. *Tec Pecu Mex* 2002; 40: 165-168.
14. Murrell KD, Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1339-1349.
15. Perdigon G, Alvarez S, Pesce de Ruiz Holgado A. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J Dairy Res* 1991; 58: 485-496.
16. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* gg. *Vaccine* 1995; 13: 310-312.
17. De Waard R, Garssen J, Snel J, Bokken GC, Sako T, Veld JH, *et al.* Enhanced antigen-specific delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable *Lactobacillus casei* YIT9029 in wistar and brown norway rats. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 762-767.
18. Slaton Blair L. Laboratory techniques. in: Campbell W.C. editor: *Trichinella and trichinosis*. New York: Plenum Press; 1983, 563-570.
19. Jungery M, Clark NW, Parkhouse RM. A Major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* 1983; 7: 101-109.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-268.
21. Darwish RA, Sanad MM, Youssef SM. Immunization against *Trichinella spiralis* using antigens from different life-cycle stages experimental study in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 1996; 26: 19-26.
22. Olivares Sáenz E. Paquete de diseños experimentales. Marín (NL) México. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León: 1994.
23. Parkhouse RM, Clark NW. Stage specific secreted and somatic antigens of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* 1983; 9: 319-327.
24. Parkhouse RM, Ortega-Pierres G. Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 1984; 88: 623-630.
25. Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. Vaccination against the nematode *Trichinella spiralis* in high- and low-responder mice. Effects of different adjuvants upon protective immunity and immune responsiveness. *Immunology* 1994; 82: 261-267.
26. Gamble HR, Murrell KD, Marti HP. Inoculation of pigs against *Trichinella spiralis*, using larval excretory-secretory antigens. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2396-2399.
27. Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Matsumoto Y, Arakawa T, Ishiwata K, *et al.* Intranasal immunization with recombinant ascaris suum 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun* 2001; 69: 7285-7292.
28. McGuire C, Chan WC, Wakelin D. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun* 2002; 70: 7149-7152.
29. Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 593-597.
30. Marinculic A, Gamble HR, Urban JF, Rapic D, Zivcinkjak T, Smith HJ, *et al.* Immunity in swine inoculated with larvae or extracts of a pig isolate and a sylvatic isolate of *Trichinella spiralis*. *Am J Vet Res* 1991; 52: 754-758.
31. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-110.
32. Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. Effects of fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 2706-2708.
33. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, *et al.* Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 259-266.
34. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi. *Exper Rev Vaccines* 2003; 2: 219-229.
35. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 2003; 33: 469-478.