



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Inmunodiagnostico de la cisticercosis porcina por
ELISA, evaluando el papel filtro como
contenedor de la sangre.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

SOLIS BRAVO LUIS ENRIQUE



A S E S O R E S :

M. en C. AGUSTIN PLANCARTE CRESPO

M.V.Z. ALINE S. DE ALUJA

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	pag.
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	10
III. MATERIALES Y METODOS.....	11
IV. RESULTADOS.....	21
V. DISCUSIÓN.....	49
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. APENDICE.....	53
VII. LITERATURA CITADA.....	55

RESUMEN

SOLIS BRAVO LUIS ENRIQUE. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis porcina por ELISA, evaluando el papel filtro como contenedor de la sangre.

ASESORES: M. en C. AGUSTIN PLANCARTE CRESPO Y M.SC. ALINE S. DE ALUJA.

En la estandarización del ELISA para la búsqueda de anticuerpos anticisticercosis en cerdo se emplearon tres sistemas: peroxidasa, biotina-streptoperoxidasa y fosfatasa alcalina. Se procesaron muestras con suero y eluido de papel. Hubo diferencias de sensibilidad en los tres sistemas y en la forma de procesado. Se utilizaron 62 cerdos en total, de los cuales se tenían 47 muestras de sangre impregnadas en papel filtro y 61 muestras de suero: de estas, 17 muestras fueron de la comunidad de "Los Sauces" Guerrero, con la presencia de la larva en lengua y 8 provenientes del rastro de Ecatepec. Para los controles negativos a cisticercosis se utilizaron 23 cerdos, 4 del rastro de Ferrería y 19 de una granja técnica y para los controles positivos se utilizaron otros 15 sueros que fueron usados en experimentos anteriores de cisticercosis porcina.

Se determinó el sistema más adecuado para el procesamiento de las muestras con los grupos provenientes de zonas rurales (III y IV): Para el papel filtro, con la elución B (2ml/3circ.) se tuvo una sensibilidad del 76.47% en el sistema peroxidasa, el 2o. lugar lo obtuvo el sistema fosfatasa con un 70% y el más bajo correspondió al de biotina-streptoperoxidasa con un 18.18%. En suero con los grupos III y IV a una dilución de 1:100 resultó el mejor sistema el de biotina-streptoperoxidasa con un 27%, seguido del 12.25% para peroxidasa. Las diferencias de sensibilidad con los grupos de cerdos hiperinmunizados y tratados con prazicuantel (VI y VII) con respecto a los anteriores fueron desde un 81.81% a un 90% con la dilución 1:100, no habiendo diferencias significativas entre el uso de 1ug/ml ó 10ug/ml de antígeno en este sistema. Debido a la obtención de valores bajos de absorbancia en los grupos infectados naturalmente con cisticercosis se sospecha de un mecanismo de evasión inmune presente en estos animales, por lo que se recomiendan más estudios de este tipo.

INTRODUCCION

La cisticercosis humana y porcina son parasitosis producidas por las larvas de la Iaenia solium. El ciclo biológico de este céstodo consiste en que los huevos infectantes provenientes de los proglótidos grávidos son ingeridos por los huéspedes intermediarios cerdo, perro, hombre y otros (38) penetrando la pared intestinal ubicandose principalmente en el sistema nervioso (2,19,21,39, 41,50), ojo (20,46), tejido muscular (2) y menos frecuentemente en corazón (34) y tejido subcutáneo (12,34).

El ciclo se continua cuando el hombre consume carne de cerdo mal cocida o cruda infectada con las larvas. Estas llegan al intestino y por acción enzimática evaginan y se adhieren a la pared del mismo, desarrollandose en el gusano adulto que puede llegar a medir hasta 7 metros, y permanecer en su huésped por varias décadas. Cuando se separan los últimos segmentos estos son expulsados junto con las heces fecales, contaminando el medio ambiente y cerrandose así el ciclo biológico (2,13,38).

La cisticercosis prevalece principalmente en países en vías de desarrollo como Africa donde el 1% de su población humana presenta esta enfermedad (33). En Asia es la segunda causa de lesiones cerebrales (33), al igual que en la India donde entre las afecciones expansivas del craneo es la segunda enfermedad de importancia despúes de la tuberculosis y de las principales causas de epilepsia, (1). En 8 países de Latinoamérica su rango de incidencia varía entre 0.4% a 2.0% (33,39,41,42).

Se sabe que en México desde hace aproximadamente 40 años la frecuencia de esta parasitosis era de alrededor del 3.6% (15). Estudios posteriores (23) y recientes, como una serie de casos de autopsias analizados en el Centro Médico Nacional en 4250 cadáveres de los cuales 135 (3.2%) presentaron larvas de I. solium en el cerebro (39,41), demostraron que las condiciones para que se

desarrolle esta enfermedad no se han modificado en casi medio siglo en nuestro país.

Las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis son extremadamente variadas: cefaleas, hipertensión endocraneana, edema cerebral, entre otras (21,39,50) y se explican de acuerdo con la localización, tipo, tamaño y número de las larvas así como el estado evolutivo de las mismas (21,50).

La ceguera es la principal complicación cuando se localiza en ojo (46,52). A excepción de la cisticercosis ocular de cámara anterior las demás son difíciles de diagnosticar por compartir los mismos síntomas con otras enfermedades neurológicas, lo cual hace difícil el manejo adecuado de estos pacientes (23).

En apoyo a la comunidad médica para diagnosticar esta enfermedad se han desarrollado diversas técnicas, entre las más útiles y recientes se cuentan la tomografía axial computerizada, y la resonancia magnética nuclear, así como los procedimientos serológicos (17,21,26). El inconveniente de usar las técnicas radiológicas, es el elevado costo de su uso y el existir pocos sitios que cuenten con el equipo, por otro lado las técnicas serológicas son más baratas y existen varios sitios que las emplean de rutina.

También la cisticercosis porcina es un gran problema porque además de ser el cerdo el huésped intermediario más importante para la salud pública (1,2) se tienen fuertes pérdidas económicas por el decomiso de la carne parasitada. Esta enfermedad fué bien conocida en el siglo pasado en Europa Central, de donde desapareció lentamente gracias a la mejoría en las condiciones de salud pública (33). Sin embargo en Africa la cisticercosis está muy propagada en todo el continente, por ejemplo en Zaire el 8% de los cerdos sacrificados tienen cisticercosis (1). La frecuencia de cisticercosis en cerdos sacrificados en seis rastros de Centroamérica entre 1959 y 1961 fue del 2.13% de un total de 543 672 cerdos (22).

En los Estados de la República Mexicana es común encontrar los cerdos en

libertad, donde tienen acceso directo al consumo de excretas humanas y basuras, con lo cuál se proveen de proteínas necesarias para subsistir (3,31), así como a la presencia de letrinas mal construidas con desagües cercanos a los corrales y por la defecación al aire libre por parte de los habitantes (40).

En una encuesta en México llevado a cabo en 75 rastros de 22 estados del país, se encontró que la frecuencia global de cisticercosis porcina para 1980-1981 fue del 1.52% (4), y los estados que presentaron una mayor incidencia de la enfermedad en rastros fueron Michoacán 10%, Guanajuato 10%, Chihuahua 3.32%, Colima 2.4%, Coahuila 2.37%, Durango 2.21% (3). Otros estados igualmente afectados por esta parasitosis, son Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Zacatecas (31).

Entre los rastros del valle de México y las plantas de tipo inspección federal (TIF) fueron sacrificados en el periodo 1974-1978; 3' 805, 716 cerdos, de los cuales el índice promedio de decomiso por cisticercosis porcina fué del 0.20% (31). Sin embargo la prevalencia de la cisticercosis estimada a partir de las cifras de cerdos que llegan a los rastros, debe de tomarse con reservas ya que los animales en su mayoría provienen de granjas tecnificadas donde principalmente los animales son alojados en locales higiénicos y alimentados con mezclas comerciales, a diferencia de los criados rústicamente, que frecuentemente son sacrificados sin ninguna inspección sanitaria, siendo el destino de la carne el consumo familiar o bien la venta directa en puestos de mercados y calles (4). Esta forma de comercialización representa aproximadamente el 35% de consumo de carne de puerco en algunas áreas del país (2,4). Además del problema de la matanza clandestina, existe el de la inspección en canal del cerdo que tiene deficiencias o no se lleva a cabo (5,40,51,52).

Débito a que en el cerdo la localización del cisticerco es predominantemente muscular (51,52), para su detección en los rastros, se realiza un solo corte

profundo en los músculos del lado derecho que se encuentran inmediatamente por arriba de la articulación del codo (músculo triceps) (45,51). La eficiencia de este método varía del 70 al 85% (5,32,51,52), por lo que de cada 3 cerdos cisticercosos detectados, pasarían 1 a 2 cerdos parasitados como sanos y si cada cisticerco es potencialmente capaz de desarrollarse en una tenia y cada proglótido contiene alrededor de 50,000 huevos es lógico observando los datos anteriores explicarse que la incidencia de esta parasitosis no ha cambiado en México desde los años 40's hasta la fecha (15).

No obstante que se han desarrollado diversos métodos de laboratorio para este fin como son, fijación de complemento (42), hemaglutinación indirecta (42), precipitación en agar (28), e inmunolectroforesis (25), desgraciadamente no se han obtenido resultados que eleven la confiabilidad obtenida por la inspección sanitaria, ésto podría deberse en parte a que todas estas técnicas tienen una sensibilidad muy baja (42). Hernández y col. (27), en San Luis Potosí, observaron en la revisión física una frecuencia del 4.6% de cisticercosis en canales de cerdo, mismo que se elevó a un 24%, al efectuarse pruebas inmunológicas de diagnóstico, como fué la fijación de complemento, sin embargo una segunda revisión para comprobar la sensibilidad y especificidad de la prueba no se realizó, por lo cual este aumento de sensibilidad no es confiable. Con respecto a la inmunolectroforesis, Gutiérrez analizó 84 cerdos infectados masivamente, y solo detectó el 15% de animales con anticuerpos precipitantes (25).

Recientemente las técnicas inmunoenzimáticas como el [Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)] han tenido una amplia aceptación no solo para el diagnóstico de diversas parasitosis sino también en endocrinología, inmunopatología, hemetología, microbiología entre otros (7,8,17,30,37,47).

El ELISA fue propuesto en 1971 por Engvall, Perlmann y por Van Weemen, Schurs, y su principio básico esta fundado en la reacción antígeno-anticuerpo, que finalmente es visualizada con la ayuda de enzimas (6,17,47,49,53).

Inicialmente el ELISA empleaba tubos de ensayo como soportes sólidos (macroelisa) (53), posteriormente se diseñó el microelisa con la finalidad de reducir la cantidad de muestra requerida para analizar y hacerla más sensible, para este fin se usan microplacas, hechas de nylon, poliestireno, polivinilo y polipropileno (8,26,52,54). Con estos materiales el antígeno se une homogéneamente, por lo que lo hace reproducible (49,53). Las uniones del antígeno a la fase sólida se realizan mediante interacciones hidrófobas (26), posteriormente se le agrega la muestra biológica a analizar y después el conjugado. La sensibilidad de la técnicas inmunoenzimáticas depende en gran parte de la preparación del los conjugados enzima-anticuerpo (53), ya que no obstante al tratamiento drástico que se emplea para prepararlos, tanto la enzima como el anticuerpo mantienen una eficaz funcionalidad. El procedimiento finaliza agregando el sustrato adecuado para la enzima elegida y los casos positivos serán aquellos en donde se halla revelado el color del sustrato en comparación con los negativos que son incoloros.

El ELISA ha sido usado para la detección de anticuerpos en suero contra Trichinella spiralis en seres humanos y en cerdos, siendo más efectivo en la detección de larvas de T. spiralis que el clásico diagnóstico con el triquinoscopio (30). El ELISA es usado actualmente por los países bajos en rastros para detectar la presencia de la larva de T. spiralis en cerdos infectados. El método ha sido mecanizado y en condiciones presentes se pueden analizar 4000 sueros diariamente por la prueba de microelisa (30).

Los resultados obtenidos con ELISA indirecto han sido satisfactorios para las tripanosomiasis, tanto la africana (mal del sueño) como la americana (enfermedad de Chagas), según lo informa Voller y col. (54). Buenos resultados se han obtenido con el ELISA para la detección de anticuerpos contra hidatidosis (54), mientras en la enfermedad causada por Coxiella burnetii (fiebre Q) se comparó el ELISA indirecto contra otros métodos como fué la

fijación del complemento y la inmunofluorescencia teniendo una mayor sensibilidad en los estudios seroepidemiológicos que los métodos anteriores (37).

La experiencia con ELISA indirecto en infecciones por filarias, onchocercosis, toxoplasmosis, han sido variables debido tal vez a la obtención y preparación del antígeno así como a las reacciones cruzadas entre estos parásitos con otros, dando problemas para su detección (37).

En México, el Instituto de Investigaciones Biomédicas ha estandarizado el método de ELISA indirecto para la detección de cisticercosis cerebral en seres humanos. La prueba tiene una sensibilidad del 98% para líquido cefalorraquídeo y un 85% para las muestras de suero con una especificidad del 96% (17). Esta técnica se ha empleado también en estudios epidemiológicos para conocer diversos aspectos biológicos de esta relación huésped-parásito, por ejemplo, cuales han sido los diferentes contactos que haya tenido una población con el parásito.

Débito a que el cerdo es el huésped intermediario de la Taenia solium, es conveniente analizar su repuesta inmune para completar los estudios epidemiológicos. En un estudio inicial en que se analizó la eficacia del prazicuantel en la cisticercosis porcina, se empleó el ELISA para monitorear su respuesta inmune humoral (18), sin embargo un problema fué la dificultad para tomar muestras sanguíneas ya que para esto hay que derribar al animal para puncionar las venas yugulares con la ayuda de dos o más personas, dependiendo de su talla, en las comunidades rurales, no es fácil que los dueños acepten que sus cerdos sean maltratados por la técnica descrita. Otro de los inconvenientes es el transporte de las muestras que deben estar en refrigeración y las distancias que con frecuencia se deben recorrer para ser procesadas en el laboratorio. Por lo descrito anteriormente, se buscará el procedimiento que permitirá la toma de muestras fácilmente y en gran número, así como su

conservación inalterable hasta su análisis.

El uso del suero colectado en papel filtro para pruebas serológicas fué descrito por Stapp y Bercks en 1948. El papel filtro saturado con sangre completa fué utilizado para la detección de anticuerpos en la encefalitis equina del este en la Estados Unidos de América (7). También en el Reino Unido, este procedimiento se ha utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky. El procedimiento consiste en la impregnación directa del papel filtro (Whatman no.1) con sangre completa, obtenida de las venas auriculares externas que una vez seca es transportado al laboratorio para su procesamiento (7). Cosío y col. estudiaron la conservación de anticuerpos para el virus de la enfermedad de Newcastle en papel filtro, obteniendo buenos resultados (14). Las muestras en papel filtro pueden soportar condiciones de medio ambiente tropical por un mínimo de 2 semanas sin que haya pérdida de seroreacción, en temp. de -20°C , un año (14,54); también pueden ser almacenadas en bolsas de plástico a 4°C durante 50 semanas conservando la seroreacción (7).

Se han comparado valores de absorbancia de las muestras de suero con las de papel filtro, por lo que es aceptable el papel filtro como una alternativa favorable (7,14). Sin embargo no puede subsistir por completo al suero (7). La absorción de sangre en el papel filtro puede destruir la reacción de los anticuerpos IgM. Por lo tanto para estudios seroepidemiológicos de infecciones en donde estas inmunoglobulinas son importantes para el diagnóstico, se debe usar el suero fresco (54).

El método de detección que se busca debe ser de bajo costo, fácil de emplear que sea rápido, y con capacidad para procesar un gran número de muestras para la detección de cisticercosis porcina (54).

El papel filtro reúne las características como contenedor y conservador de sangre, necesarias para un estudio seroepidemiológico de cisticercosis porcina a nivel de campo.

Se escogió la comunidad rural "Los Sauces" en el Estado de Guerrero por presentar problemas de diversos tipos, como son la carencia de letrinas y de drenaje, por lo que la gente de este pueblo defeca al aire libre. Si se tiene presente que los cerdos del pueblo andan sueltos, que se alimentan de basura y excremento de diversos animales, incluido el de los seres humanos, no es de extrañar el 5.8% de cisticercosis porcina obtenido de un estudio epidemiológicos en 485 cerdos, determinando dicho porcentaje por la inspección de la lengua (48).

HIPOTESIS:

El papel filtro como contenedor de sangre de la misma efectividad en el ELISA que el suero.

OBJETIVOS:

Estandarizar el ELISA para el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina, empleando el papel filtro como contenedor y medio de transporte de las muestras de sangre.

MATERIAL Y METODOS :

MATERIAL BIOLÓGICO:

El estudio comprendió el análisis de los siguientes sueros y papeles filtro impregnados de sangre (cuadro 1), en cerdos que se agruparon de la siguiente forma:

Grupo I

Sueros y sangre en papel filtro (Whatman No.1), de 4 cerdos que en la inspección sanitaria en el rancho de Ferrería, no presentaron larvas de Taenia solium: 30, 31, 32, 33.

Grupo II

Sueros y papeles filtro (P.F) de 19 cerdos provenientes de una granja altamente tecnificada, propiedad de la U.N.A.M., sin la presencia de larvas de Taenia solium a la inspección de la lengua y sin historia de casos de cisticercosis en los últimos 2 años: 34, 35, 36, 37, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52

Grupo III

Únicamente P.F de 1,2,3 y 4, de los otros 13 cerdos, ambos de la comunidad "Los Sauces" Guerrero, se obtuvo suero y P.F, además todos presentaron cisticerco en

CUADRO I Sueros utilizados en la estandarización del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra larvas de I. solium

Grupos	Origen	Número	Muestra con papel	Muestra con suero	Fecha de la colección
Grupos I-II					
Cerdos sin	(I) Ferrería	4	4	4	Marzo '87
cisticercosis	(II) Zapotitlán	19	19	19	Agost. '87
Grupos III-IV					
Cerdos con					
cisticercosis†					
1a colecta	(III) Los Sauces	4	4	4	Ene-marzo '87
2a colecta	Los Sauces	13	12	13	Julio-agos '87
	(IV) Rastro de Ecatepec	5	5	5	Agosto '87
Grupos V-VI-VII					
Cerdos Positivo	(V) I.I.B.**	3	-	3	1985
a la necropsia*					
hiperinmunizados*	(VI) I.I.B.**	2	-	2	1986
Tratados con					
prazicuantel	(VII) I.I.B.**	10	-	11	1986
TOTAL		59	44	58	

* Cerdos sacrificados con infecciones masivas de larvas de Isonia solium

† Cerdos revisados en lengua con presencia de larvas de Isonia solium.

** Con un extracto crudo de larvas de Isonia solium.

** I.I.B. Instituto de Investigaciones Biomédicas.

lengua: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17.

Grupo IV

Sueros y P.F de 5 cerdos del rastro de Ecatepec Edo. de México, con presencia del cisticerco en lengua: 18, 19, 20, 21, 22.

Grupo V

Sueros de 3 cerdos infectados con larvas de Cysticercus cellulosae: 23, 24, 25

Grupo VI

Sueros de 2 cerdos hiperinmunizados con antígeno crudo de Cysticercus cellulosae, escolex+pared (E+P): P45 y P47

Grupo VII

Sueros de 10 cerdos infectados naturalmente con larvas de I. solium y que posteriormente fueron tratados con prazicuantel: P7, P6-13, P6-16, P17, P18, P19-3, P19-26, P25, P31, P52.

GAMMAGLOBULINAS

- A) Gammaglobulinas de cerdo anti-E+P.
- B) Gammaglobulinas normales de cerdo.
- C) Gammaglobulinas de cerdo anti-IgG humanas.
- D) Gammaglobulinas normales de conejo.

ANTIGENO:

- A) Extracto crudo de escolex y pared (E+P) de la larva de Iaenia solium.
- B) Extracto crudo de larvas de I. crassiceps.

MATERIAL PARA ELISA

- A) Placas de Imulon No.1 (DYNATECH LABORATORIES, INC)
- B) Albumina al 25% (Lab. S.S.A)
- C) Conjugados:
 - Anti-IgG de cerdo acoplada a peroxidasa (Sigma), conjugado a.
 - Anti-IgG de cerdo acoplada a fosfatasa, conjugado b.
 - Anti-IgG de cerdo acoplada a biotina (Sigma), conjugado c.

Biotina-Streptoavidina-peroxidasa (Amersham Internacional plc).

Anti-IgG de cerdo en conejo.

D) Enzima:

Fosfatasa alcalina (Sigma).

E) Sustrato:

Ortofenilendiamina (OFD) (Sigma).

Para-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma).

F) Espectrofotometro (BIO-RAD model 2550 EIA) con filtros de 405nm y 492nm.

G) Buffers:

Carbonatos, fosfatos, citratos, dietanolamina

Método de impregnación del papel filtro y de la toma de sangre:

1.- Las muestras de sangre para el P.F se tomaron de la vena sublingual al momento de la inspección, distribuyendolas homogéneamente en el papel filtro (P.F), o se puncionó la vena yugular para impregnar el P.F y a su vez obtener suero, los que se congelaron a -10°C . Los papeles se dejaron secar a la intemperie y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso, ambos métodos fueron utilizados con los grupos II, III y IV.

2.- Solo en el caso del grupo I (cerdos de Ferreria), se tomaron muestras de sangre al momento del deguello para impregnar los P.F, así como para la obtención de los sueros.

3.- Los grupos V, VI y VII fueron sangrados de la vena yugular para la obtención del suero.

Técnica de ELISA para la detección de anticuerpos (figura 1):

La realización de esta técnica estuvo en función de la utilizada para el diagnóstico de la cisticercosis en seres humanos (17), con algunas modificaciones:

a) Preparación del antígeno:

1. SE UNE EL ANTIGENO A LA FASE SOLIDA



2. SE AGREGA LA MUESTRA PROBLEMA



3. SE AGREGA EL CONJUGADO ANTICUERPO-ENZIMA



4. SE AGREGA EL SUBSTRATO



FIGURA.1 Método indirecto para la detección de anticuerpos

Se utilizó un extracto crudo de (E+P) de larvas de Isonia solium. Los cisticercos fueron obtenidos del músculo esquelético de cerdos infectados, provenientes de canales decomisados en varios rastros, se colectaron sin líquido vesicular, se pusieron en hielo seco y se almacenaron a -10°C . Posteriormente se homogenizaron en un Polytron (Brinkmann Instruments), con 3M de KCl y solución de fosfatos (PBS) en una proporción de 5ml de solución por gramo de larvas (peso húmedo) y se dejaron en agitación toda la noche a 4°C . Al día siguiente el homogenado se centrifugó a 20,000 rpm durante 45 min a 4°C , se dializó con PBS para eliminar el exceso de sales, al final de la diálisis se centrifugó a 20,000 rpm por una hora a 4°C se determinó la concentración de proteína por BIO-RAD (10) ajustándose a 15 mg/ml (figura 2).

b) Preparación del conjugado empleando fosfatasa alcalina, según el método de Avrameas y col. (6):

Obtención de IgG de cerdo

5ml de suero de cerdo normal se incubó en una columna de sefarosa 4B-proteína-A (resina) Sigma, (1cmx6cm) toda la noche, posteriormente ésta se lavó con PBS exhaustivamente para eliminar lo que no reaccionó con la resina y por diferencia de pH se obtuvieron las IgG's. Su pureza se analizó por medio de geles de poli-acrilamida. La enzima fosfatasa alcalina tipo VII de intestino de borrego Sigma, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min, el precipitado se resuspendió en solución salina al 0.5% pH 6.8, dializándola después contra la misma, toda la noche.

El método de conjugación de la enzima con el anticuerpo fue el siguiente: a la enzima, se le agregó glutaraldehído al 25% (Sigma) a una concentración final de 0.02%, se incubó 2 hrs a temperatura ambiente. Se le agregó inmunoglobulina de cabra, antiIgG de cerdo, que previamente fue dializada contra una solución salina pH 6.8. La concentración del reactivo fue de 1mg de Ig por 2.5 de enzima. Se dejaron incubando por 2 hrs a temperatura ambiente. El conjugado

Obtener cisticercos del músculo de cerdo

|

|

Homogenizar con KCl 3M en PBS

|

|

Agitar toda la noche a 4°C

|

|

Dializar exhaustivamente con PBS a 4°C

|

|

Centrifugar a 1000 rpm

|

|

Determinar concentración y ajustar proteína a 15 mg/ml

|

|

Almacenar en alicuotas a -20°C

FIGURA.2 Producción de extracto total de la larva de Igania solium, tomado de la referencia (17).

resultante se dializó contra una solución amortiguadora de Tris base 0.05M pH 8.8 (6). Posteriormente se probó el conjugado con diluciones de 1:200 hasta 1:6000

Realización del ELISA (cuadro 2).

1.- Se inició adsorbiendo durante toda la noche a 4 °C entre 100pg/100 ul y 1000pg/100 ul por pozo por duplicado de E+P previamente dializado en buffer de carbonatos.

2.-Al día siguiente cada pozo se lavó con 200 ul de PBS-T por tres veces con un intervalo de 5 min cada vez. Estos lavados siempre se realizaron previamente a la incubación de cualquiera de los diferentes reactivos que se emplearon en los diferentes pasos del método.

3.- Para evitar el pegado inespecífico se agregó 200ul/pozo de albúmina al 1% en PBS-T, durante 1hr a 37°C.

4.- Incubación con el 1er anticuerpo.

Cuando se utilizó suero se realizaron diluciones desde 1:100 a 1:800 en PBS-T. Al utilizar el P.F se cortaron 3 círculos de 5mm de diametro que fueron depositados en un tubo de ensaye para eludir los anticuerpos, con 250 ul (elución A) ó 2ml (elución B) en buffer de PBS-T a 4 °C toda la noche posteriormente se hicieron diluciones de 1:10 hasta 1:400 con la elución A y ninguna con la elución B. De cada una de las muestras provenientes de papel o suero se tomaron 100ul/pozo y se incubaron por 2 hr a 37°C.

5.- Incubación con el 2o anticuerpo (conjugados a, b, y c).

Se probaron diluciones de los conjugados a y b desde 1:100 hasta 1:10,000, y del c fué 1:1000, para el conjugado c que requirió un reactivo adicional, biotina-streptoavidina-peroxidasa, éste se probó sólo a la dilución 1:2000.

6.- Sustrato:

4 mg de ortofenilendiamina (OFD) se usaron para los conjugados a y c, el OFD se disolvió en 10 ml de buffer de citratos más 4 ul de peróxido de hidrógeno,

100ul de esta mezcla se utilizaron por pozo.

Para-nitrofenilfosfato fué para el conjugado b, 20 ng fueron disueltos en 5ml de agua y se agregó 15 ml de buffer de dietanolamina, por pozo también se usaron 100 ul.

7.- Lecturas de las muestras.

Un espectofotómetro para placas de ELISA con filtros de 405 nm para fosfatasa y 492 para peroxidasa. En el sistema de peroxidasa las lecturas se tomaron cuando se obtenían claras diferencias colorimétricas entre los controles positivos y negativos no excediendo un tiempo máximo de 30 min y previamente parando la reacción con 40ul/pozo a 1 N de ácido sulfúrico, esta incubación se desarrolló a temperatura ambiente y protegida de la luz. En el sistema de fosfatasa alcalina una vez que se agregó 100ul/pozo del sustrato se incubó por última vez a 37°C por 30 min e inmediatamente se leyó.

8.- Punto de corte.

Se obtuvo de sumar al promedio de los valores de absorbancias de los cerdos negativos, tres veces su desviación estandar ($\bar{X} \pm 3 (D.S) = \text{punto de corte}$) (9,53).

Cuadro.2 Diferencias entre los 3 sistemas utilizados para la detección de cisticercosis porcina por ELISA.

Pasos	Tipos de enzimas		
	Peroxidasa Iug/10ml buffer de carbonatos*	Fosfatasa Iug/10ml buffer de carbonatos	Biotina-streptoperoxidasa Iug ó 10ug/10ml buffer de carbonatos
3 lavados con 200 ul de	PBS-T*	PBS-T c/azida de sodio *	PBS-T
Albumina al 1%*	si	no	no
Incubar 1 hr a 37°C.	si	no	no
3 lavados con 200 ul de	PBS-T	PBS-T con azida de sodio	PBS-T
Diluciones suero 1:50 a 1:800 Elución papel A: 1:10 a 1:400 B: 2ml	100ul/pozo	100ul/pozo	100ul/pozo
Lavados con	100ul/pozo <u>Incubar 2 hrs a 37 C.</u> PBS-T*	100ul/pozo PBS-T c/azida	100ul/pozo PBS-T
Conjugados de cerdo,	anti-IgG Peroxidasa	anti-IgG Fosfatasa	anti-IgG Biotina
Lavados con	100ul/pozo <u>Incubar 2 hrs a 37 C.</u> PBS-T	100ul/pozo PBS-T c/azida	100ul/pozo PBS-T
2o conjugado de cerdo,	-	-	antiIgG acoplada con Streptoavidina
Lavados con	-	<u>Incubar 2 hrs a 37 C.</u> -	PBS-T
Preparación del sustrato	buffer de citratos* 4 mg de OFD 4ul de H2O2	buffer de dianolamina* 10mg parani- fenil fosfato	buffer de citratos. 4 mg de OFD 4ul de H2O2
Incubación final.	Parar la reacción según la coloración entre positivos con H2504.	30 minutos	Parar la reacción según la coloración entre positivos con H2504.
Lectura con el espectrofotometro	492nm	405nm	492nm

* Consultar el apéndice

RESULTADOS

En la estandarización del ELISA para la búsqueda de anticuerpos anticisticercos en cerdos se emplearon tres sistemas: peroxidasa, biotina-streptoperoxidasa y fosfatasa alcalina.

Sistema peroxidasa:

Los resultados obtenidos para buscar la mínima concentración detectable de anticuerpos así como comprobar que todos los reactivos estuviesen en óptimas condiciones están resumidos en el cuadro 3 y en la figura 3, en donde se detectó hasta 150ng/pozo cuando se diluyó el 1er anticuerpo 1:10000. Sin embargo esta dilución no fué la que se empleó en las subsecuentes determinaciones ya que todos los controles positivos (grupos V y VI) se volvieron negativos en estas condiciones. Fueron las dilución de 1:100 - 1:800 en suero y 1:10 - 1:400 en el eluido de papel filtro (elución A) los que manifestaron mejores señales.

Con las muestras del grupo III procedentes de "Los Sauces" Guerrero, se obtuvo una sensibilidad del 0-75% con P.F (cuadro 5 y fig.4), estos rangos estuvieron en función de la dilución que se empleó. Para el control en suero fue utilizado el grupo V y grupo VI, con un 80% de sensibilidad (cuadro 6 y fig.5). Para las siguientes determinaciones en ELISA peroxidasa se incluyeron un mayor número de sueros y P.F. tanto negativos como positivos. Grupo II negativo: Al obtener el punto de corte en suero, éste no se modificó prácticamente con respecto al grupo I (cuadro 4), pero en el P.F. hubo el doble de diferencias en los valores de densidades óptica en 1:100, hasta el cuádruple en la elución B (cuadro 7).

Con respecto a los grupos positivos III y IV, la sensibilidad fué del 76.47% al emplear la elución B y tan baja, como 25% al emplear la dilución 1:100 (elución A), con el suero 1:100 fué de 12% y con la dilución 1:800 fué 50% (cuadro 8 y figs.6,7,8 y 9)

CUADRO 3 Valores de absorbancia a 492 nm de gammaglobulinas como controles positivo y negativos a diferentes diluciones.

Dilución del conjugado peroxidasa 1:2000 IgG normales de conejo y cerdo a 15mg/ml		
MUESTRA IgG	POSITIVA CERDO	NEGATIVA CONEJO
ABSORBANCIAS		
1:10	.521	.171
1:100	.455	.170
1:500	.532	.081
1:1000	.607	.054
1:1500	.599	.032
1:2000	.583	0
1:2500	.615	0
1:3000	.516	0
1:6000	.496	0
1:10000	.627	0

CUADRO 4 Valores de absorbancia a 492 nm de P.F y sueros negativos así como su punto de corte con la siguiente fórmula: $X + 3(D.S) = P.C$

MUESTRA PAPEL	CONJUGADO PEROXIDASA	30	GRUPO I ANIMAL No.			PROMEDIO	D.S	PUNTO DE CORTE
			31	32	33			
ABSORBANCIAS								
1:10	1:2000	.430	.408	.446	.433	.42925	.013663	.468
1:50	1:2000	.377	.285	.311	.300	.31825	.035152	.423
1:100	1:2000	.273	.291	.300	.291	.28875	.009807	.315
1:200	1:2000	.243	.320	.253	.243	.26475	.032158	.360
1:400	1:2000	.371	.279	.254	.258	.29075	.045246	.431
2ml/100ul*	1:2000	.364	.519	.443	.495	.45525	.059415	.632
SUERO								
1:800	1:2000	.128	.113	.144	.132	.121175	.059415	.290

*Los 3 círculos de los papeles filtro se eluyeron en 2ml de PBS-Tween, toda la noche y al siguiente día, se tomaron 100ul y se depositaron en los pozos sin diluir (elución B)

PEROXIDASA

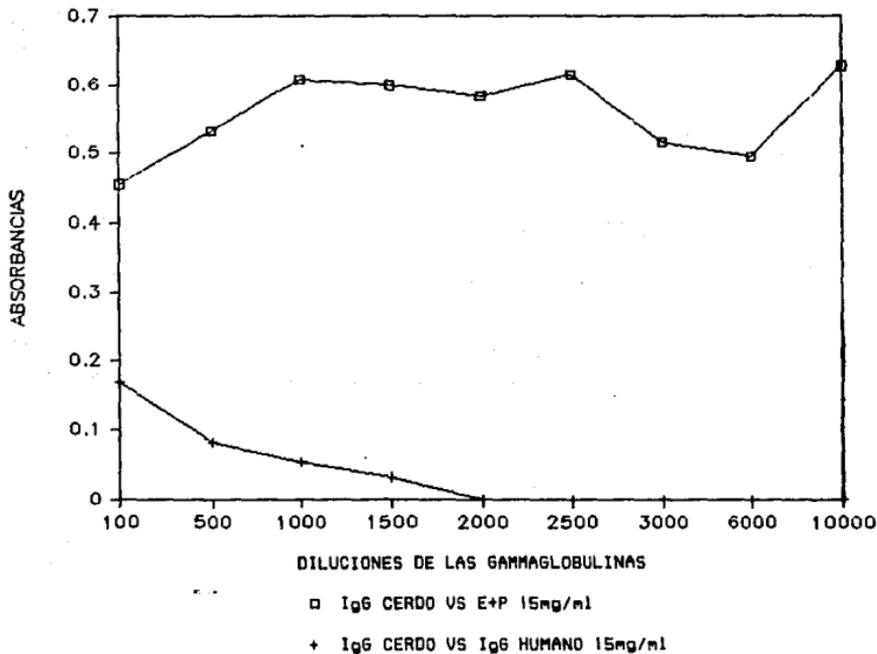


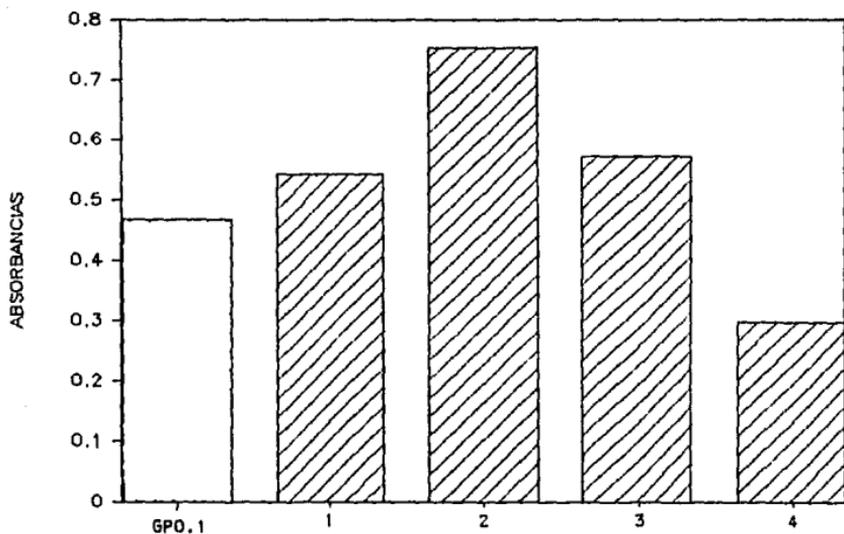
FIGURA.3 Valores de de absorbancia a 492 nm del control positivo y negativo a diferentes diluciones, el conjugado de utilizó 1:2000

CUADRO.5 Valores de absorbancia a 492 nm de P.F positivos, del grupo III en ELISA, con su porcentajes de sensibilidad

		<u>GRUPO III</u>				
		ANIMAL No.				PORCENTAJE
MUESTRA	CONJUGADO	1	2	3	4	SENSIBILIDAD
PAPEL	PEROXIDASA	ABSORBANCIAS				
1:10	1:2000	<u>.542</u>	<u>.753</u>	<u>.573</u>	.297	75.00%
1:50	1:2000	<u>.435</u>	<u>.520</u>	.337	.298	50.00%
1:100	1:2000	.273	<u>.403</u>	<u>.359</u>	.253	50.00%
1:200	1:2000	.278	-	.255	-	00.00%
1:400	1:2000	.228	.345	.333	.245	00.00%

CUADRO.6 Valores de absorbancia a 492 nm de sueros positivos, de los grupos IV y V en ELISA, con su porcentaje de sensibilidad.

		<u>GRUPOS V y VI</u>					
		ANIMAL No.					PORCENTAJE
MUESTRA	CONJUGADO	A	B	C	P45	P47	SENSIBILIDAD
SUERO	PEROXIDASA	ABSORBANCIAS					
1:100	1:2000	.291	.393	.176	.685	.830	-- --
1:800	1:2000	<u>.330</u>	<u>.376</u>	.286	<u>1.342</u>	<u>1.350</u>	00.00%



PAPELES FILTRO DEL GRUPO III

FIGURA.4 Comparación entre el grupo I con el grupos III se observa que el punto de corte en D.O.= .468 a 492nm con la dilución 1:10, obteniendo un 75% de sensibilidad.

CUADRO.7 Valores de absorbancia a 492 nm de P.F y sueros negativos, el conjugado se utilizó 1:2000. EL punto de corte, se realizó con la siguiente fórmula: $X + 3(D.S) = P.C$

GRUPO II

ANIMAL No.

MUESTRA	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	PROMEDIO	D.S	PUNTO DE
PAPEL	ABSORBANCIAS																				CORTE	
1:100	.179	.229	.221	.189	.152	.150	.154	.157	.201	.194	.150	.134	.190	.140	.192	.178	.250	.181	.183	.17745	.0323	.273
2ml/100ul*	.195	.228	.184	.179	.165	.168	.159	.154	.202	.191	.224	.187	.159	.163	.232	.223	.219	.212	.183	.16771	.0183	.221
SUERO																						
1:100	.139	-	-	.234	.226	.279	-	-	.170	-	.068	.168	.058	.077	-	-	.214	.199	-	.16654	.070	.376
1:800	.170	.183	.169	.144	.143	.139	.129	.140	.157	.149	.144	.137	.142	.156	.170	.223	.201	.169	-	.15916	.042	.285

* Elusión B

CUADRO.8 Valores de absorbancia a 492nm de sueros y P.F positivos, de los grupos III y IV en ELISA, con su porcentaje de sensibilidad, el conjugado se utilizó 1:2000.

MUESTRA	GRUPO III-IV																		PORCENTAJE
	ANIMAL No.																		
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	SENSIBILIDAD
PAPEL	ABSORBANCIAS																		
1:100	.181	.182	.232	.227	.259	.206	<u>.342</u>	.247	.272	.265	<u>.704</u>	<u>.455</u>	-	-	-	-	-	-	25.00%
2ml/100ul*	<u>.292</u>	.149	.184	<u>.303</u>	<u>.333</u>	-	<u>.726</u>	<u>.756</u>	<u>.756</u>	<u>.464</u>	<u>.631</u>	<u>.474</u>	-	<u>.258</u>	<u>.301</u>	.188	<u>.253</u>	<u>.227</u>	76.47%
SUERO																			
1:100	.230	-	-	-	.157	-	-	-	-	.329	<u>.426</u>	-	.199	-	.307	.324	-	.133	12.25%
1:800	.152	.176	.211	<u>.291</u>	<u>.309</u>	.250	<u>.400</u>	<u>.341</u>	.279	<u>.298</u>	<u>.416</u>	<u>.503</u>	.196	.211	<u>.303</u>	.157	<u>.356</u>	<u>.279</u>	50.00%

* Elusión B

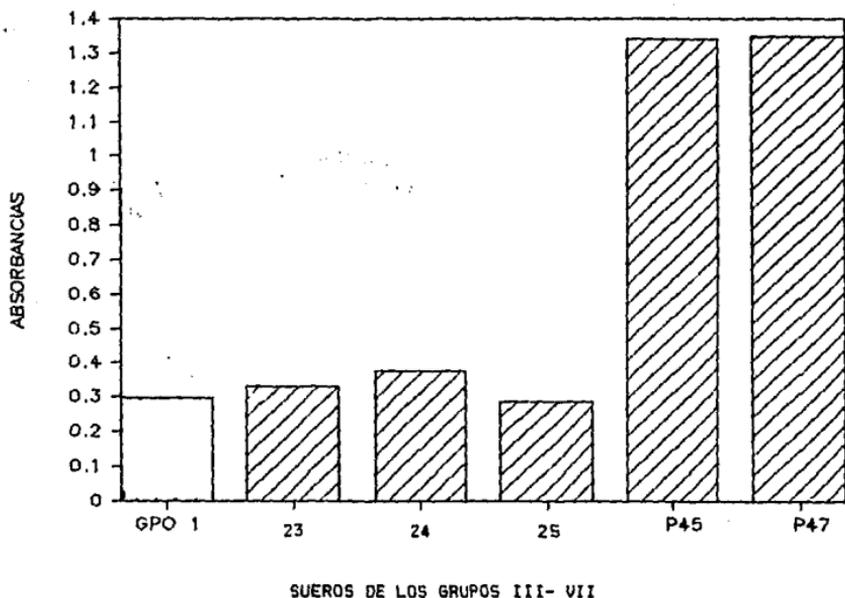


FIGURA.5 Comparación entre el grupo I con los grupos III-VII se observa que el punto de corte en O.O. = .300 a 492nm con la dilución 1:800, obteniendo un 80% de sensibilidad.

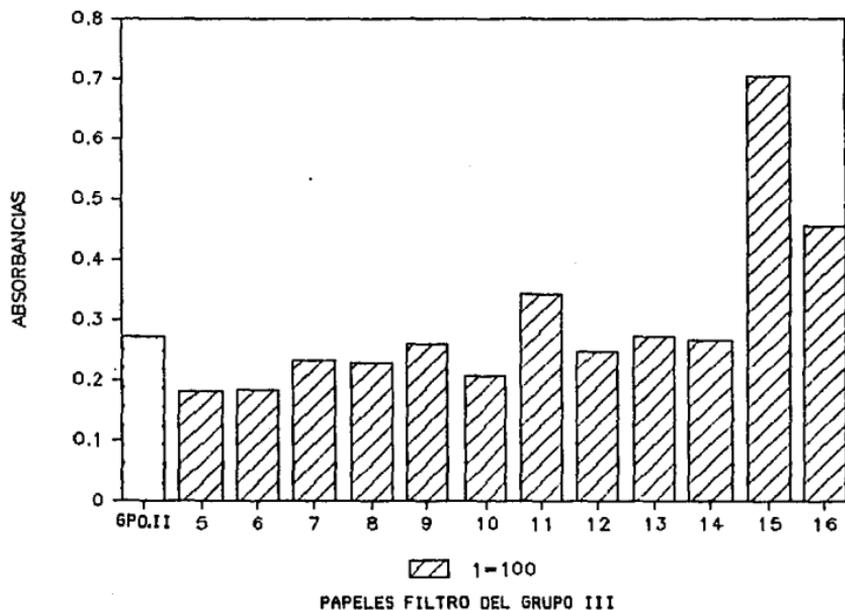
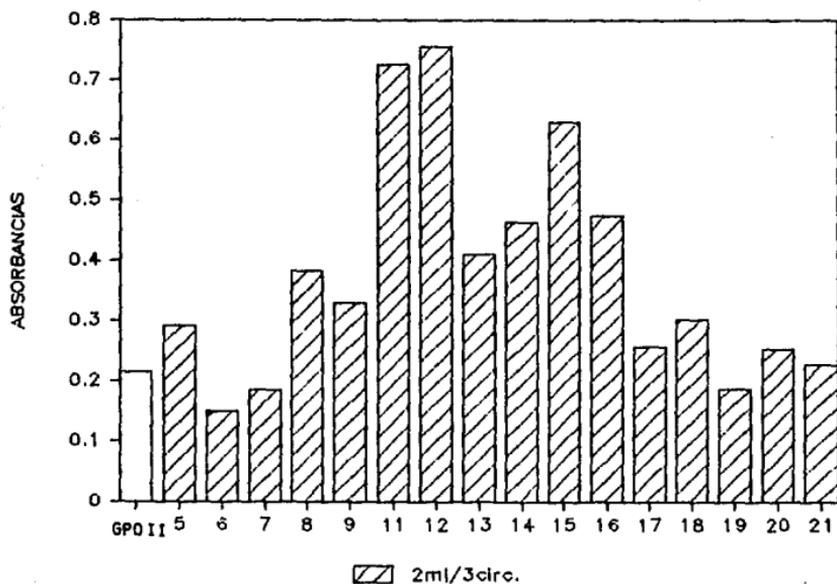
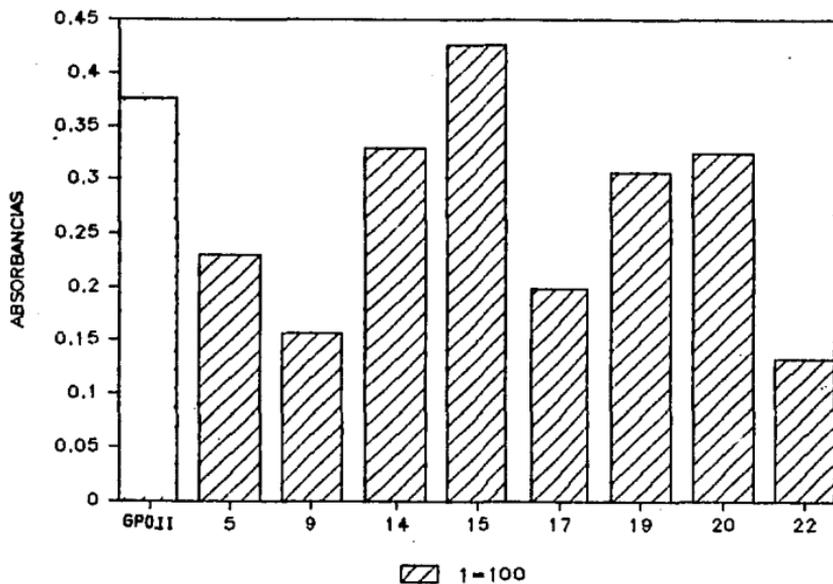


FIGURA.6 Comparación entre el grupo II con el grupo III se observa que el punto de corte en D.O. = .273 a 492nm con la dilución 1:100, obteniendo un 25% de sensibilidad.



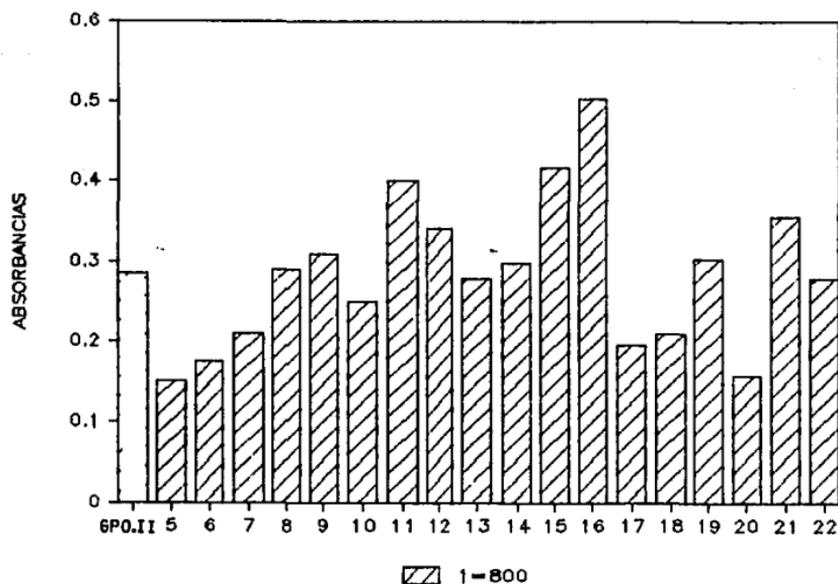
PAPELES FILTRO DEL GRUPO III

FIGURA.7 Comparación entre el grupo II con el grupo III, se observa que el punto de corte en D.O.=.215 a 405nm con la elusión B, obteniendo un 76.47% de sensibilidad.



SUEROS DE LOS GRUPOS III

FIGURA.8 Comparación entre el grupo II con el grupo III, se observa que el punto de corte en D.O. = .375 a 492nm con la dilución 1:100, obteniendo un 12% de sensibilidad.



SUEROS DE LOS GRUPOS III-IV

FIGURA.9 Comparación entre el grupo II con los grupos III-IV, se observa que el punto de corte en D.O.= .273 a 492nm con la dilución 1:800, obteniendo un 50% de sensibilidad.

SISTEMA BIOTINA-AVIDINASTREPTOPEROXIDASA

En este sistema el punto de corte (P.C) para las muestras de suero fué casi 2 veces menor comparandolo con el sistema de peroxidasa (cuadro 9), no fué posible tener la comparación con los eluidos en los dos sistemas por no contar con las diluciones similares, pero con las que si se efectuaron, el P.C en el sistema de biotina, resultó el más bajo de todos los valores (cuadro 10). Cuando se compararon las dos concentraciones de antígeno en este mismo sistema no existieron diferencias significativas (cuadro 13). Los grupos III y IV tuvieron una sensibilidad similar a la obtenida con el sistema peroxidasa cuando se analizaron las muestras de suero (cuadro 11 y fig.10), pero con las muestras provenientes de los eluidos (cuadro 12 y fig.11), la diferencia entre ambos es ampliamente significativa siendo más elevada en el sistema de peroxidasa. El grupo VII resultó el más ampliamente positivo (cuadro 12-14 y fig. 12-13).

CUADRO 9 Diferentes puntos de corte de los sistemas peroxidasa y biotina-strepto-peroxidasa.

	PEROXIDASA		BIOTINA-STREPTOPX GRUPO I-II P.C	FOSEFATASA GRUPO II P.C
	GRUPO I P.C	GRUPO II P.C		
ELUCION A: 1:10	.468	-	.199	-
1:100	.423	.273	-	-
ELUCION B: 2ml	.632	.221	-	.239
SUERO: 1:50	-	-	.258	-
1:100	-	.376	.211	.295
1:800	.298	.285	.140	-
			**SUERO: 1:50 .271	
			1:100 .205	

* En la elusión A no se incluyó el P.C del grupo I

** Solo en este ensayo a diferencia de todos los experimentos, se utilizó el antígeno a 10ug/ml.

- No determinado

CUADRO 10 Valores de absorbancia a 492nm de P.F. y sueros negativos.

GRUPO I y II

ANIMAL No.

MUESTRA	30	31	32	33	34	35	36	37	39	41	42	44	45	46	47	48	49	PROMEDIO	D.S	PUNTO DE
SUERO	ABSORBANCIAS																		CORTE	
1:50	.224	.084	.144	.160	.207	.207	.127	.136	.135	-	.119	.115	-	.140	.133	.117	.168	.1477	.03708	.258
1:100	.151	.113	.148	.106	.184	.184	.172	.137	.103	.098	.122	.113	.147	.114	.128	.136	.118	.1337	.02642	.211
1:800	.135	.058	.075	.057	.081	.081	.039	.045	.051	-	.063	.033	-	.060	.047	.102	-	.0683	.02474	.140
PAPEL																				
1:10	-	-	-	-	.126	.058	.054	-	.169	.049	.075	.111	.092	-	-	-	-	.0917	.03902	.199

Concentración del antígeno 1ug/ml, el 1er. conjugado fue 1:1000 y el 2o. conjugado 1:2000.

CUADRO 11 Valores de absorbancias a 492nm de aerosy P.F positivos, de los grupos III y IV en ELISA, con sus porcentajes de sensibilidad.

GRUPO III y IV														
MUESTRA	ANIMAL No.												PORCENTAJE	
	7	8	9	11	13	14	15	16	17	19	20	21	22	SENSIBILIDAD
SUERO	ABSORBANCIAS													
1:100	-	-	<u>.357</u>	-	<u>.265</u>	.187	<u>.753</u>	<u>.333</u>	.055	.151	.115	.207	.160	40.00%
1:800	-	-	<u>.154</u>	.081	.080	.074	<u>.420</u>	<u>.181</u>	.047	.110	.058	.119	.057	27.00%
PAPEL														
1:10	.116	.189	.126	<u>.360</u>	-	.121	<u>.300</u>	-	-	.169	.059	.118	.157	18.18%

La dilución del 1er. conjugado fue 1:1000 y el 2o. conjugado 1:2000.

Concentración del antígeno 1ug/ml.

CUADRO 12 Valores de absorbancias a 492nm de sueros positivos, de los grupos VI y VII en ELISA, con sus porcentajes de sensibilidad.

<u>GRUPO VI y VII</u>														
	ANIMAL No.													PORCENTAJE
MUESTRA	P7	P6-13	P6-16	P17	P17N	P18	P19-3	P19-26	P25	P31	P52	P45	P47	SENSIBILIDAD
SUERO	ABSORBANCIAS													
1:50	.265	.188	.433	.495	-	.355	.308	.553	.143	.350	-	1.121	.827	81.81%
1:100	.430	.183	.284	.633	-	.338	.243	.578	.133	.300	-	1.006	.725	81.81%
1:800	.320	.138	.359	-	.357	.435	.120	.389	.077	.228	.372	.873	.481	75.00%

La dilución del ser. conjugado fue 1:1000 y el 2o. conjugado 1:2000. Concentración del antígeno Iug/ml.

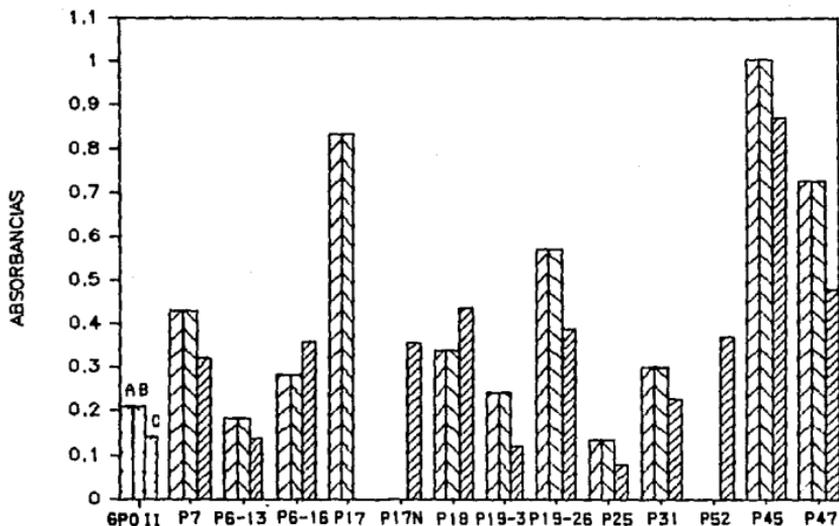


FIGURA.10 Comparación de los sueros de los grupos II (barras transparentes) con los valores de los grupos VI-VII (barras con diagonales), se observan los diferentes puntos de corte según la dilución utilizada a 492nm, con su porcentaje de sensibilidad:

- a) 1:50 D.O.= .250 81.81% 
- b) 1:100 D.O.= .211 81.81% 
- c) 1:800 D.O.= .140 75.00% 

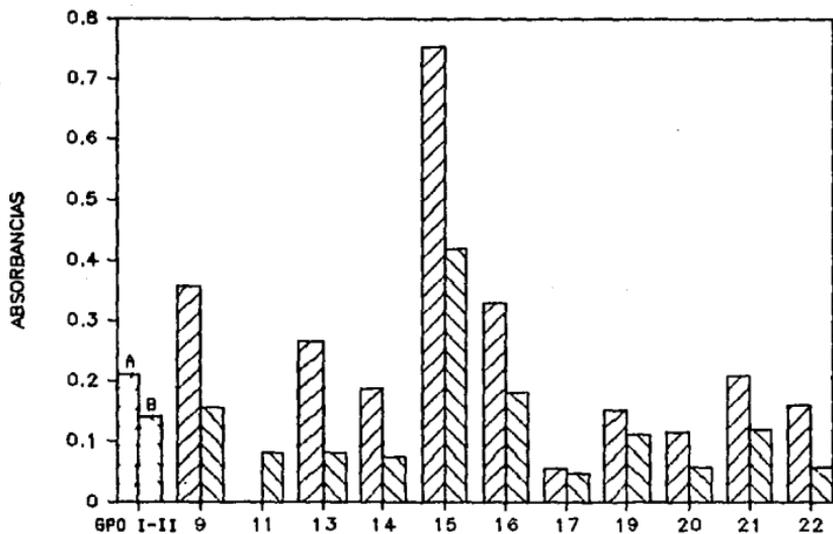
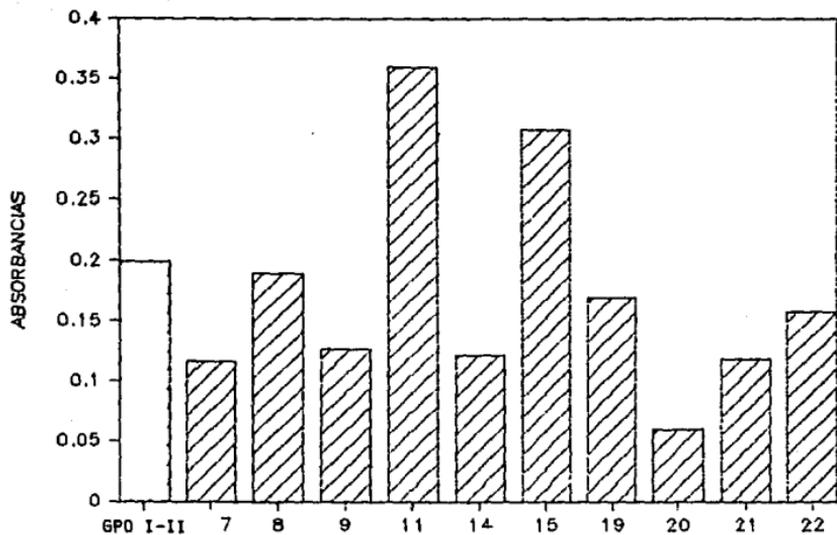


FIGURA.11 Comparación de los sueros de los grupos I-II (barras transparentes) con los valores de los grupos III-IV (barras con diagonales), se observan los diferentes puntos de corte según la dilución utilizada a 492nm, con su porcentaje de sensibilidad:

- a) 1:100 D.O.= .211 40.00% 
- b) 1:800 D.O.= .140 27.00% 



PAPELES FILTRO DEL GRUPO III

FIGURA.12 Comparación entre el grupo I con el grupo VIII se observa que el punto de corte en D.O. = .199 a 492nm con la dilución 1:10, obteniendo un 18.18% de sensibilidad.

CUADRO 13 Valores de absorbancia a 492nm de P.F. y sueros negativos.

<u>GRUPO I-II</u>																
ANIMAL No.																
MUESTRA	30	31	32	33	34	35	36	37	39	41	42	44	45	PROMEDIO D.S	PUNTO DE	
SUERO	ABSORBANCIAS													CORTE		
1:50	.253	.159	.193	.165	.131	.215	.127	.136	.109	.118	.149	.115	.199	.157	.038	.271
1:100	.190	.102	.152	.152	.120	.148	.101	.085	.145	.148	.103	.082	.109	.124	.027	.205

Concentración del antígeno 10ug/ml, el 1er. conjugado fue 1:1000 y el 2o. conjugado 1:2000.

CUADRO 14 Valores de absorbancias a 492nm de sueros positivos, del grupo VI y VII en ELISA, con sus porcentajes de sensibilidad.

GRUPO VI y VII

ANIMAL No.

MUESTRA	P7	P6-13	P6-16	P18	P19-3	P19-26	P25	P31	P52	P47	PORCENTAJE
SUERO	ABSORBANCIAS										SENSIBILIDAD
1:50	.291	.352	.415	.450	.257	.470	.116	.322	.339	.739	80.00%
1:100	.302	.306	.345	.328	.220	.567	.062	.309	.311	.622	90.00%

La dilución del 1er conjugado fue 1:1000 y el 2o. conjugado 1:2000.
Concentración del antígeno 10ug/ml.

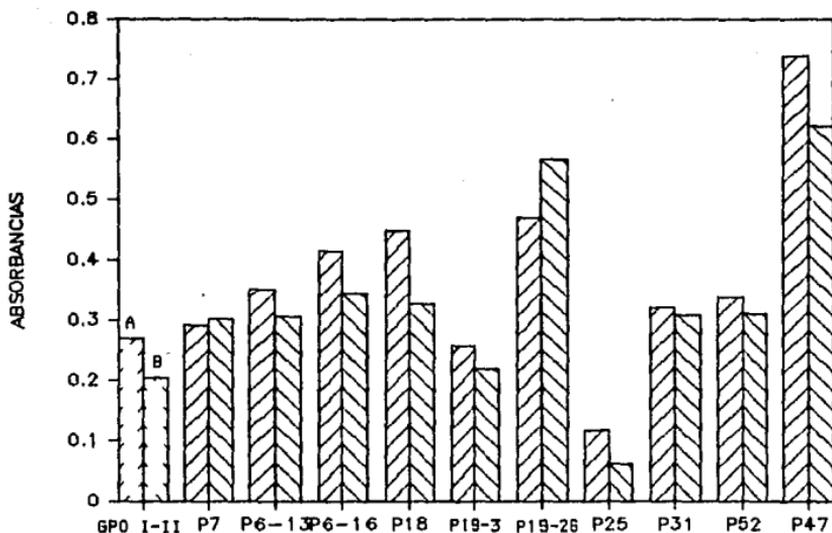


FIGURA.13 Comparación de los sueros de los grupos I-II (barras transparentes) con los valores de los grupos VI-VII (barras con diagonales), se observan los diferentes puntos de corte según la dilución utilizada a 492nm, con su porcentaje de sensibilidad:

a) 1:50 D.O.= .271 80.00% 

b) 1:800 D.O.= .205 90.00% 

SISTEMA FOSFATASA

En fosfatasa fueron utilizadas las gammaglobulinas anti-E+P; antiIgG humanas y IgG de conejo, como controles positivos y negativos para probar la potencia del conjugado (cuadro 15 y figs.14-15).

También en este sistema el punto de corte fue muy similar a los otros dos sistemas(cuadro.16). La sensibilidad del eluido de este sistema fue igual que con el sistema de peroxidasa (70.00%) y con respecto al suero fue 30% menor (cuadro 17-18 y figs. 16-17).

La sensibilidad de los tres sistemas utilizados en ELISA, así como sus comparaciones, se observan en la cuadro 19.

CUADRO 15 Valor de absorbancia a 405 nm, de gammaglobulinas como controles positivos y negativos a diferentes diluciones.

MUESTRA IgG	CONJUGADO FOSFATASA	GAMMAGLOBULINAS 15mg/ml			ALBUMINA 1%
		CERDO VS E+P	CERDO VS IgG HUMANO ABSORBANCIAS	CONEJO NORMAL	
1:100	1:100	.745	-	.079	0
1:100	1:500	.539	-	.098	0
1:100	1:1000	.842	.792	.085	0
1:200	1:1000	.658	.779	.000	0
1:100	1:1500	.589	.654	.084	0
1:100	1:2000	.699	.561	.064	0
1:200	1:2000	.529	.369	.000	0
1:100	1:2500	.713	.463	.106	0
1:100	1:3000	.728	.554	.151	0
1:100	1:4000	.343	.317	.069	0
1:200	1:4000	.097	.000	.000	0
1:100	1:6000	.238	.250	.045	0
1:200	1:6000	.000	.000	.000	0
1:100	1:10000	.498	.076	.000	0

FOSFATASA

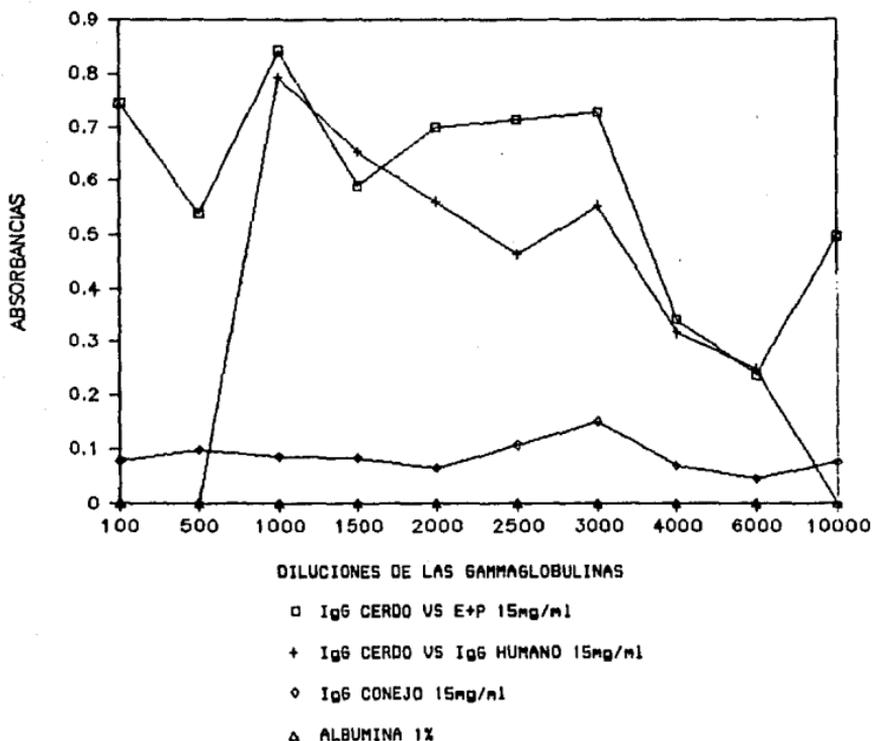


FIGURA.14 Valores de de absorbancia a 405 nm del control positivo y negativo a una dilución de 1:100, el conjugado de utilizó a diferentes diluciones.

FOSFATASA

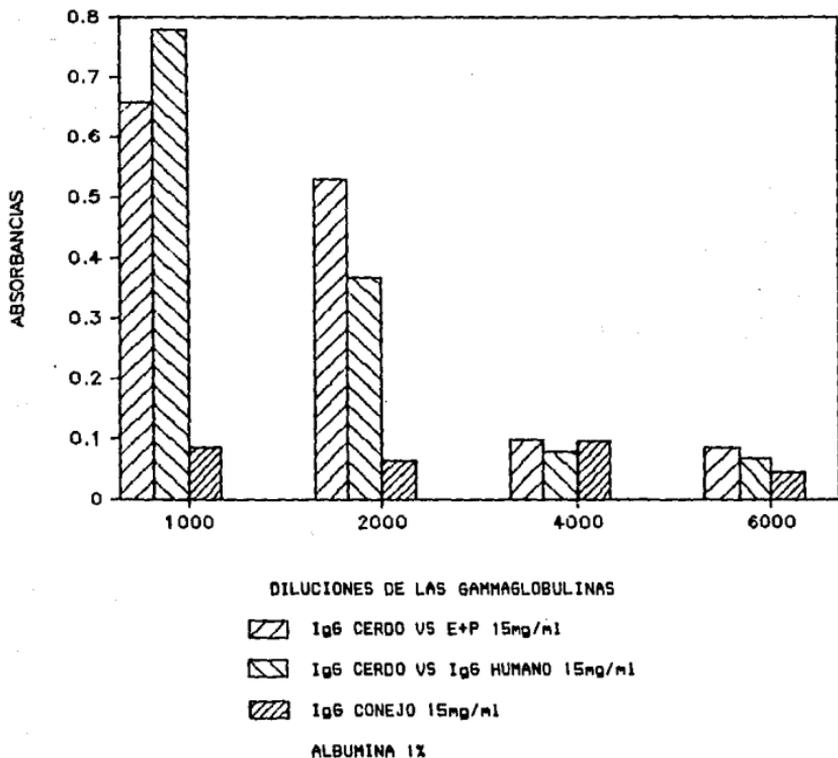


FIGURA.15 Valores de de absorbancia a 405 nm del control positivo y negativo a una dilución de 1:200, el conjugado de utilizó a diferentes diluciones.

CUADRO.16 Valores de absorancias a 405 nm de P.F y sueros negativos asi como su punto de corte $X+3(0.5) = P.C$

GRUPO II

ANIMAL No.

MUESTRA	CONJUGADO	34	35	37	39	42	43	44	45	46	47	PUNTO DE
PAPEL	FOSFATASA	ABSORBANCIAS										CORTE
2ml/100ul*	1:2000	.159	.083	.026	.144	.107	.131	.159	.040	.046	.089	.239
SUERO												
1:100	1:2000	.135	-	.184	-	-	-	-	.041	.060	.105	.295

*Elusión B

CUADRO.17 Valores de absorancias a 405 nm de P.F. de los grupos III y IV en ELISA, con su porcentaje de sensibilidad.

GRUPO III y IV

ANIMAL No.

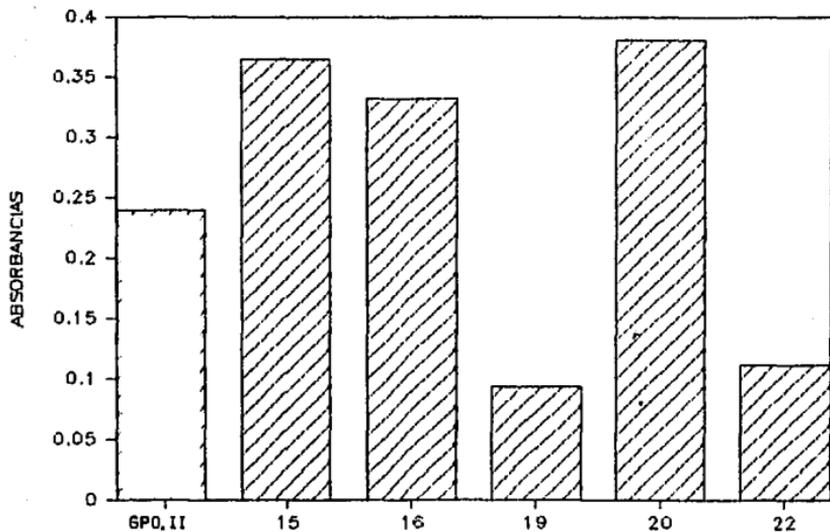
MUESTRA	CONJUG.	15	16	19	20	22	PORCENTAJE
PAPEL	FOSFATASA	ABSORBANCIA				SENSIBILIDAD	
2ml/100ul*	1:2000	<u>.365</u>	<u>.332</u>	.094	<u>.381</u>	.112	70.00%

CUADRO.18 Valores de absorancias a 405 nm de sueros, de los grupos III y VII en ELISA, con su porcentaje de sensibilidad.

GRUPO III y VII

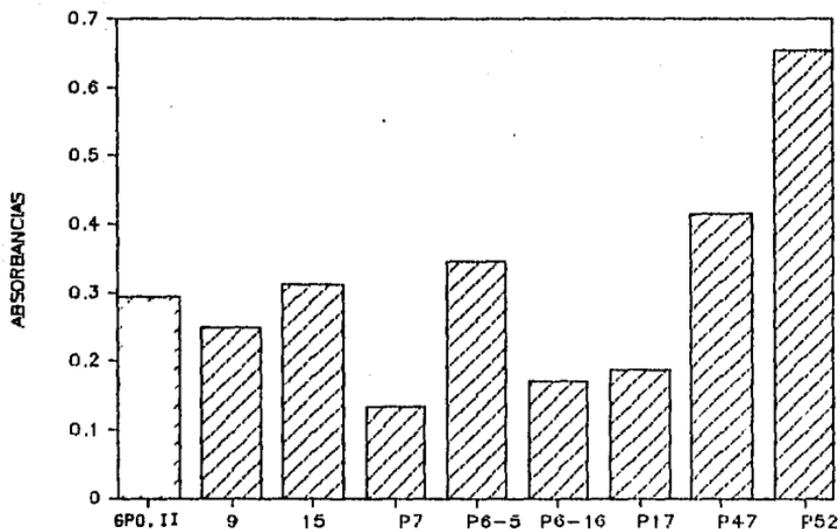
ANIMAL No.

MUESTRA	CONJUGADO	9	15	P7	P6-5	P6-16	P17	P47	P52	PORCENTAJE
SUERO	FOSFATASA	ABSORBANCIAS								SENSIBILIDAD
1:100	1:2000	.250	<u>.313</u>	.133	<u>.347</u>	.171	.187	<u>.416</u>	<u>.654</u>	50.00%



PAPELES FILTRO DEL GRUPO III-IV

FIGURA.16 Comparación del grupo II con los valores de los grupos III y IV, se observa que el punto de corte en D.O.= .239 a 485nm con la elución B, obteniendo un 70% de sensibilidad.



SUEROS DE LOS GRUPOS III-IV

FIGURA.17 Comparación entre el grupo II con los grupos III-VII, se observa que el punto de corte en D.O.= .295 a 405nm con la dilución 1:100, obteniendo un 50% de sensibilidad.

CUADRO 19 Comparaciones de los porcentajes de sensibilidad de los tres sistemas utilizados en el ELISA.

SISTEMA	II	PEROXIDASA	II	AVIDINASTREPTO	II	FOSFATASA		
GRUPOS	III	V-VI	III-IV	VI-VII	III-IV	VI-VII	III-IV	III-IV
ELUIDO A: 1:10	75	-	-	-	18.18	-	-	-
1:50	50	-	-	-	-	-	-	-
1:100	50	-	125	-	-	-	-	-
1:200	00	-	-	-	-	-	-	-
1:400	00	-	-	-	-	-	-	-
ELUIDO B: 2ml	-	-	176.47	-	-	-	70	-
SUERO : 1:50	-	-	-	81.81	40	80	-	-
1:100	-	-	112.25	81.81	27	90	-	50
1:800	-	80	150	75	-	-	-	-

* Concentración del antígeno 10ug/ml.

- No determinado.

DISCUSION

Los métodos diagnósticos realizados para detectar anticuerpos específicos en cerdos sospechosos de estar infectados con cisticercos se han basado principalmente en el empleo del suero (18,25,28,42,43). El uso del papel filtro como una nueva modalidad para el diagnóstico, se pensó por los inconvenientes que surgen en sangrar a los cerdos de las comunidades rurales. Este método ha probado ser rápido y operativo, siendo una alternativa a escoger para las pruebas serológicas. Los 3 métodos que se estandarizaron para la búsqueda de anticuerpos anti-cisticercosis en cerdos mostraron resultados similares entre sí en cuanto a su eficacia global.

Se utilizaron dos grupos controles negativos: debido a que en el rostro se obtuvo la sangre al momento del deguello con lo que el papel filtro se impregnó demasiado y además por este procedimiento se hemolizó la sangre, por lo que se obtuvieron altos valores de fondo (cuadro.2), esto probablemente se debió a la gran cantidad de enzimas liberadas de los eritrocitos destruidos que reaccionan con los sustratos. Debido a esto se decidió utilizar otro grupo de cerdos sin cisticercosis, de la granja técnica de Zapotitlán D.F. en donde hubo la facilidad para sangrarlos en la yugular y también tomar muestras de sangre de las venas sublinguales.

Las diluciones del papel filtro que obtuvieron una mejor respuesta en relación al suero en el sistema peroxidasa fueron: la elución B con un 76.46% de sensibilidad, mientras que con el suero a una dilución 1:800 sólo se tuvo un 50% con los grupos III-IV y con los grupos V-VI se encontró un 80%. En el sistema fosfatasa con la misma elución B se encontró un 70% de sensibilidad y un 50% en suero con la dilución 1:50. El sistema de avidinestrepto los eluidos no tuvieron la misma respuesta ya que sólo se obtuvo un 18.18% de sensibilidad en la elución A (1:10), mientras que con el suero hubo un 40%, ambos con los

grupos III-IV. Con los grupos VI-VII se observó desde un 81.81% hasta un 90% de sensibilidad.

No obstante que con los sueros empleados como controles positivos (grupos VI y VII) se obtuvieron porcentajes altos de sensibilidad, en los grupos III y IV con infecciones naturales se obtuvieron principalmente respuestas bajas, medianas y escasamente en 2 cerdos con promedios altos.

Esto podría explicarse en varias formas: los cerdos reaccionaron de manera inespecífica al absorberse algún componente de su sangre ó suero a los pozos de Imulon (cuadro 15), por lo cuál los controles negativos tuvieron un fondo alto, de 0.2 de absorbancia, que influyó para obtener el punto de corte. Con este mismo ELISA utilizado para la detección de anticuerpos humanos, se pueden obtener valores de fondo tan bajos como .05 ó inclusive 0 (16).

Otra explicación podría ser que no obstante que en la cisticercosis porcine es muy común encontrar gran cantidad de parásitos en un solo cerdo, quizá para mantener esta peculiar relación huésped-parásito sea necesario el disminuir la respuesta inmune del huésped, por lo que se encuentran entonces menor cantidad y calidad de anticuerpos anti-cisticerco.

Los resultados obtenidos en el suero con el ELISA son parecidos a los encontrados por Kumar y col.(29), que reportaron desde un 75% hasta un 95% de sensibilidad y un 96.2% de especificidad con cerdos infectados experimentalmente, con diferencias de sensibilidad. Esto probablemente se deba a que se tuvo un control mejor de las variables como son alimentación, manejo, clima, etc, así como la cantidad de huevos de I. solium utilizados para infectarlos.

Si bien hubo diferencias en cuánto al número de cerdos detectables con la infección, no hubo gran diferencia en relación a sus valores de absorbancias obtenidos a 450nm ya que hubo valores desde .1 hasta .450 D.O en cerdos con cisticercosis, presentandose valores igualmente cercanos a .1 de los cerdos no

infectados, sin haber establecido un punto de corte, por lo que el número de cerdos detectables a cisticercosis fué alto y no tanto por una mayor detección de anticuerpos contra el cisticerco ya que las absorbancias tanto de Kumar (29), como los resultados de este trabajo fueron generalmente bajas, por lo que si se hubiera establecido el punto de corte, su sensibilidad sería menor.

Una explicación más sería en términos de evasión inmune, por ejemplo en bovinos infectados con Fasciola hepática, se ha informado que este parásito produce sustancias tóxicas para los linfocitos, lo cual sugiere que éstas pueden proteger al parásito de la respuesta inmune del huésped. También se ha informado que las fasciolas liberan gran cantidad de antígenos que quizás consumen los anticuerpos disponibles, formando complejos inmunes que son depositados en el hígado y que causan lesiones inmunopatológicas. Parece ser que efectivamente en la fasciolosis operan mecanismos de evasión que son responsables de la permanencias prolongada de fasciolas en sus huéspedes, como es el caso de los ovinos, que pueden encontrarse fasciolas de 8 y 11 años de duración después de la infestación única (56).

Otro informe que apoya la presencia de mecanismos de inmunosupresión es el hecho de que en infestaciones por las formas jóvenes de Fasciola hepática de 6 semanas la reacción es fuerte contra su tegumento, mientras que progresivamente es más débil con el tegumento de fasciolas adultas. Esto sugiere que la renovación de tejidos en la superficie del tegumento, es un mecanismo inmunoprotector, utilizado por las fasciolas antes de que lleguen a los conductos biliares (35).

CONCLUSIONES

El papel filtro eluido tuvo una mejor respuesta en la detección de anticuerpos anti-cisticercos con el sistema peroxidasa con los grupos III y IV que el mismo suero, siendo la elución B la mejor forma de eluido para el papel filtro.

El sistema biotina-streptoperoxidasa tuvo la mejor respuesta para sueros del grupo III y IV con la dilución 1:100 así como con los grupo VI y VII, por lo que se recomienda el uso de esta dilución.

Se recomienda determinar el punto de corte con los controles negativos cada vez que se efectuen las rutinas en ELISA.

La sensibilidad de la prueba en los controles positivos fué de un 80-90% (sueros hiperinmunes y cerdos con cisticercosis tratados posteriormente con prazicuantel), sin embargo por haber obtenido en general una respuesta baja en títulos de anticuerpos anti-cisticercos en los 3 sistemas de enzimas, en los cerdos provenientes de un medio rural (cuadro 1, grupo III y IV); se sospecha de un fenómeno de evasión inmune en estos animales, que puede estudiarse en experimentos futuros.

La técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anticisticercos promete ser una buena alternativa como herramienta para utilizarla en estudios seroepidemiológicos, por sus ventajas a nivel de campo que el uso tradicional del suero, por lo siguiente:

- Mayor facilidad, rapidez para obtener, conservar y transportar la muestra.
- Es un método aceptable de obtención de sangre por parte del dueño.

Por todo lo enunciado anteriormente se recomienda que se sigan realizando este tipo de investigaciones sobre esta parasitosis.

APENDICE

Buffers y reactivos utilizados en el ELISA

Buffer de carbonatos:

Na₂CO₃ 0.159g/50ml

NaHCO₃ 0.293g/50ml

NaN₃ (Azida de sodio) 0.020g/50ml

pH=9.6

ELISA para peroxidasa y biotina-estreptoperoxidasa.

Buffer para peroxidasa (lavados y diluciones)

PBS-Tween-20

NaCl 8.0g/l

KCl 0.2g/l

Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g/l

KH₂PO₄ 0.2g/l

0.05% Tween pH=7.4

Reactivos para sustrato

4mg sustrato

10ml de buffer de citratos-fosfatos pH=4.5

4ul de H₂O₂

La reacción se para con H₂SO₄ 1M=5.5ml de H₂SO₄ en 100ml de H₂O

Buffer de citratos para preparar el sustrato:

Sol. A:

0.1M de Ac. cítrico (21g para 1l) H3C6O7 •H2O

Sol. B:

0.1M de citrato de sodio (29.11g para 1l) Na3C6H5O7 •2H2O

Tomar 5ml de Sol. A más 5ml de Sol.B y aforar a 10ml

ELISA para fosfatasa

Buffer para fosfatasa (lavados y diluciones)

PBS-Tween-20

NaCl 16g/2l

KH2PO4 0.4g/2l

Na2HPO4 5.8g/2l

KCl 0.4g/2l

NaN3 0.4g/2l

Tween-20 1.0ml

pH=7.2

Buffer de Dietanolamina 10%

H2O 800ml

NaN3 0.2g

MgCl2•6H2O 100mg

Dietanolamina 97ml

Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1N, quedar a 4°C, protegido de la luz.

Preparación del sustrato

3ml de H2O desionizada

10mg (2 pastillas) de fosfatasa alcalina

7ml de buffer de dietanolamina (debe estar a temperatura ambiente y prepararse

la mezcla inmediatamente antes de agregarse a los pozos)

LITERATURA CITADA

- 1.- Acha, N.P y Szyfres, B.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a ed. Publicación Científica, Washington, 1986.
- 2.- Aluja, S. de A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J., Larralde, C., Madrazo, I., Velásquez, V. y Willms, K.: Cisticercosis, una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium. Fondo de cultura económica, México, 1987.
- 3.- Aluja, S. de A.: Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Editado por Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltran, F., 53-62. Academic Press, New York, 1982.
- 4.- Aluja, S. de A.: La cisticercosis porcina en México. Soc. Méd. Mex. 120: 312-314 (1984).
- 5.- Avilés, B.: Situación de la cisticercosis en México en el periodo de 1974 a 1978, Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., 1981.
- 6.- Avrameas, S., Ternynck, T. and Guesdon, J.L.: Coupling of enzyme to antibodies and antigens. Scan J. Immunol. 8: 7-23, (1978).
- 7.- Banks, M.: Detection of antibodies to Aujeszky's Disease Virus in Whole Blood By Elisadiac. J. Virological Methods, 12: 41-45, (1985).
- 8.- Behymer, D.E., Ruppenmer, R., Brooks, D., Williams, J.C. and Franti, C.E.: Enzyme Immunoassay for surveillance of Q fever. Am. J. Vet. Res 46: 2413-2417 (1985).
- 9.- Berkowitz, B.D., Webert, W.D., The inactivation of horseradish peroxidase by poliestirene surfaces. J. Imm. Met. 47:121-124 (1981).

- 10.- Bio-Rad: Instruccions for the Bio-Rad Protein assay. Laboratories Bio-Rad.
- 11.- Biagi, F.: Epidemiología de la Cisticercosis en México. Gac. Med. Mex., 103: 227-230, (1972).
- 12.-Bollo, C.A.: Cisticercosis subcutáneo. Presentación de 16 casos. Patología 8: 280-285, (1970).
- 13.- Carrasco, M.J.: La cisticercosis porcina en el Estado de Sonora. Sal. Pub. Méx. 19, 2: 255-261 (1977)
- 14.- Cosío, T. L., Velázquez A.E. y Cunha, G. R.: Conservación del virus de la enfermedad de Newcastle en papel filtro a diferentes temperaturas. Vet. Mex. 3, 1: 5-11.(1972).
- 15.- Costero, I.: Tratado de anatomía patológica. ed. Atlante, pag 1486, 1946.
- 16.- Espinosa, G. B.: Respuesta inmune humoral en la neurocisticercosis humana. Inmunodiagnostico, Caracterización de anticuerpos e identificación en líquido cefalorraquídeo. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México D.F., 1985.
- 17.- Espinosa, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M.A., Plancarte, A. y Flisser, A. Characterization by Enzyme-linked Immunosorbent Assay of the Humoral Immune Response in Patients with Neurocysticercosis and its Application in Immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 24: 536-541,(1986).
- 18.-Flisser, A., González, D., Rodríguez, C.J., Skurovich, M., Cohen, S., Collado, M.A., Madrazo, I., Plancarte, A., Tovar, A., Ostrosky, P., Montero, R., Correa, D., Rodríguez del Rosal, E. y Aluja, S. de A.: Tratamiento de Cisticercosis Porcina con Praziquantel. En Cisticercosis Humana y Porcina. Su Conocimiento e Investigación en México. Editado por Flisser, A. y Malagón, F. (en prensa).
- 19.- Flisser, A., Woodhouse, E. y Larraalde, C. Human cysticercosis. Antigens, antibodies and non-responders. Clin. exp. Immunol. 39: 27-37 (1980).
- 20.- Flores, H. A.: Aspectos clínicos importantes de la cisticercosis ocular.

Arch. APEG, 22: 1-5, (1981).

21.- George, E., Caiaffa, H.: Cisticercosis cerebral características escanográficas.: Rev. Salud Uninorte., 3: 49-55 (1986).

22.- Gemmel, M., Matyas, Z., Paulowski, E.J., Soulsby.: " Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of teniasis-cisticercosis, an Epidemiology, Wld. Hlth. Org. rep.3: 68-125 (1983).

23.- González, A.: La cisticercosis en México. Gac. Med. Mex., 120: 309-311, (1984).

24.- González, D., Rodríguez, C.J., Aluja, A., Flisser, A.: Cerebral cisticercosis in pig studied by computed tomography and necropsy. Vet. Parasitology, 26: 55-69 (1987).

25.- Gutiérrez, R.: Determinación de anticuerpos séricos por inmunoelectroforesis en cerdos infectados con Cysticercus cellulosae. Tesis de licenciatura. Fac.de Med.Vet.y Zoot., U.N.A.M., México 1979.

26.- Hernández, L.J. y Santos, A.L., Aspectos relevantes del inmunoanálisis enzimático (ELISA)., Rev. Infectología 2:52-56 (1985).

27.- Hernández, S., Ramos, M.C. y Telléz Giron, E.: Investigación de cisticercosis porcina en San Luis Potosí., México. Boi.of. Sanit. Panam. 61. 430-431.(1966).

28.- Inclán, M.M.C.: Comparación de la técnica de inspección sanitaria e inmunoelectroforesis en el diagnostico de la cisticercosis porcina. Tesis de licenciatura. Fac.de Med.Vet.y Zoot., U.N.A.M., México, D.F., 1981.

29.- Kumar, D. and Gaur, S.N.S.: Serodiagnosis of Porcine Cysticercosis by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) using Fractionated Antigens. Vet. Parasitology, 24: 195-202 (1987).

30.- Ljungstrom, I.: ELISA a new technique for the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections. In: Proceeding of the British Society for Parasitology. Parasitology, 69:24-26 (1979).

- 31.- López, B.J.: Situación actual de la epidemiología de la cisticercosis en México. Tesis de licenciatura. Fac.de Med.Vet.y Zoot., U.N.A.M., México, D.F., 1981.
- 32.- Luna, V.S.: La cisticercosis porcina como principal causa de decomiso en 9 rastros del Edo. de México. Tesis de licenciatura., Fac.de Med.Vet.y Zoot., México, 1976.
- 33.- Mahajan, R.C.: Geographical Distribution of Human Cysticercosis. En Cisticercosis. Present state of Knowledge and perspectives. Edited by Flisser, A., Willis, K., Lalette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F., 39-46. Academic Press, New York, 1982.
- 34.- Márquez M.H., Aguirre, J. y Biagi, F.:Cisticercosis del miocardio. Informe de cuatro casos con estudio necrópsico. Rev. Fac. Med. 5: 401-411 (1963).
- 35.- Mitchell, G.F.: Inhibition of induction and expression of host protective immune responses in infected host: parasite-protective (proparasitic) responses and immunosuppression. Afr. J. Clin. Exp. Immunol. 2:295 (1981).
- 36.- Molinari, J.L., Meza, R., Juárez, B., Palacios, P. y Retana, A.: "Taenia solium. Immunity in hogs to, the cysticercus", Exp. Parasitology 55: 340-353 (1983).
- 37.- Peter, O., Dupuis, G., Peacock, M.G. y Burgdorfer, W.: Comparison of Enzyme-linked Immunosorbent Assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody test for detection of Coxiella burnetii antibody: J. Clin. Microb. 25:1063-1067 (1987).
- 38.- Quiroz, R.H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Linusa, México, 1986.
- 39.- Rabiela, C.M.T., Rodríguez, I.J., Rivas, H.A.: Consideraciones anatomopatológicas de la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología 17: 119-136.(1976).

- 40.- Ramírez, O. R.: Estudio epidemiológico de Cysticercus cellulosae en la comunidad de "Los Sauces" Guerrero. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool., U.N.A.M., México, D.F., 1988 (en prensa).
- 41.- Robles, C. y Chevarría, M.: Un caso de cisticercosis cerebral curado médicamente. Sal. Pub. Méx., 118, 2: 65-71. (1980).
- 42.- Rodríguez, E.R.: Estudio de dos reacciones serológicas para el diagnóstico de la cisticercosis porcina por Cysticercus cellulosae. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool., U.N.A.M., México, D.F., 1969.
- 43.- Romero, C.E.: Frecuencia de anticuerpos séricos anticysticercus cellulosae por inmunoelectroforesis en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Ecatepec. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool., U.N.A.M., México, D.F., 1980.
- 44.- Schenone, H., Villeroel, F., Rojas, A. y Ramírez, R.: Epidemiology of human cysticercosis in Latin América. E: Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Editado por Flisser, A., Willms, K., Leclittle, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltran, F., 25-38. Academic Press, New York, 1982.
- 45.- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: Reglamento de la Industrialización de la carne, Tipo Inspección Federal. 2a ed. Dirección General de Ganadería. México, D.F., 1980.
- 46.- Solanes, P.M.: Algunos aspectos anatomoclinicos del cisticercos intraocular. Sal. Pub. Méx. 24 5: 649-650 (1982).
- 47.- Speiser, F.: Serodiagnosis of Tissue Dwelling Parasites: Application of a Multi-antigen Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for screening. Ann. Soc. Belgae Med. Trop. 62: 103-120. (1982).
- 48.- Tay, J., Salazar-Schettino, P.M., Haro, I., Bucio, M.J.: Frecuencia de la helmintiasis intestinal en México. Rev. Invest. Salud Pub., México, 35:241, (1976).

- 49.- Tizard, I.: Inmunología Veterinaria, Interamericana, México, 1985.
- 50.- Toro, G., Román, y G., Román, L.N.: Neurología Tropical. 1a ed. Printer Colombiana, Colombia, 1983.
- 51.- Vargas, M.G., Saldierna, U., Navarro, F. R., Acevedo, H.A., Flisser, A. y Aluja, S de A.: Localización del cisticerco de la Taenia solium en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria., Vet. Mex. 17.4.: 275-279.(1986).
- 52.-Vergara, D.J.: Selectividad tisular de Cysticercus cellulosae en cerdos. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M., México, D.F., 1970.
- 53.- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett A.: Enzyme immunoassay in diagnostic medicine: Theory and practice. Bull. Wild. Hlth. Org. 53: 55-65. (1976).
- 54.- Voller, A. Bidwell, D.E. And Bartlett.: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull. Wild Hlth Org., 54: 129-139, (1976).
- 55.-Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett A.: The Application of microplate enzyme-linked immunosorbent assays to some infectious diseases. First International Symposium on Immunoenzymatic Technique IINSERM Symposium No. 2 North Holland. 167-173. (1976).
- 56.- Zimmerman, N.: Modulation of host immune responses by Fasciola hepatica. J. Parasitology 68: 402 (1982).