

29/201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



DETECCION DE ANTICUERPOS ANTICISTICERCO EN SUERO HUMANO MEDIANTE LA PRUEBA DE HEMOGLUTINACION Y ELISA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LETICIA ARACELI RUIZ GONZALEZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

I	INTRODUCCION	
	Antecedentes históricos y distribución	1
	Frecuencia	2
	Morfología	4
	Ciclo de vida	7
	Mecanismos de transmisión	8
	Sintomatología	9
	Inmunología	10
II	OBJETIVOS e HIPOTESIS	15
III	MATERIAL Y METODO	16
	Preparación de antígenos	18
	Antígeno de excreciones y secreciones	19
	Antígeno de fluido vesicular	20
	Antígeno somático incompleto	
	Antígeno somático completo	21
	Determinación de proteínas	22
	Determinación de carbohidratos	24
	Técnicas inmunológicas	
	Hemaglutinación indirecta	26
	E.L.I.S.A.	29
IV	RESULTADOS	34
V	DISCUSION Y CONCLUSION	50
VI	BIBLIOGRAFIA	53

I INTRODUCCION

ANTECEDENTES HISTORICOS Y DISTRIBUCION

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria producida por el estado larvario de Taenia solium (Cysticercus cellulosae).

Los estudios realizados sobre la cisticercosis humana se remontan a las primeras descripciones de Paranoli en 1550 y Rumler en 1558, quienes encontraron vesículas blanquecinas en cerebro humano, pero no definieron su origen. Laennec le dio el nombre de Cysticercus el cual deriva de la palabra griega "cisti" que significa vesícula y "cercos" cola. Rodolphi en 1809, --seguro de que se trataba de una especie nueva le dió el nombre específico de cellulosae debido a su gran afinidad por el tejido conectivo. Küchermeister (1855) y Leuckart (1856) demostraron que estas vesículas no eran más -- que la forma larvaria de Taenia solium, comprobándolo experimentalmente al reproducir el ciclo biológico, Nieto (1948, 1982).

Recientemente han aparecido numerosos trabajos en México y en el mundo sobre cisticercosis humana y porcina donde se abordan diversos aspectos como son: morfología, inmunología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento.

La cisticercosis es una enfermedad frecuente en todos aquellos países -- donde las condiciones higiénico sanitarias son deficientes y principalmente en aquellos países considerados subdesarrollados. En México es un problema de salud pública.

La cisticercosis tanto humana como porcina se ha reportado no solo en -- nuestro país sino también en Centro America: Guatemala, Costa Rica, Honduras y El Salvador, en Sudamerica: Argentina, Brasil, Chile, Peru, Venezuela y Colombia, de igual manera se ha reportado en España, India, Pakistán, China y -- Africa; en todos los países anteriores es considerada como una parasitosis de suma importancia, Mahajan (1982), Tay y cols. (1985).

La gravedad de esta parasitosis no solo se refleja en los casos humanos que repercuten socioeconómicamente sino también desde el punto de vista veterinario en donde las pérdidas económicas causadas por el decomiso de cerdos parasitados son importantes ya que el consumo de carne de cerdo es una

de las principales fuentes de proteína animal que el hombre consume, Mateos (1972).

FRECUENCIA

La prevalencia de la cisticercosis humana no puede ser evaluada con precisión por la dificultad que presenta su diagnóstico debido a la heterogeneidad de la respuesta inmune y a la presencia de individuos asintomáticos. Los estudios sobre frecuencia de esta enfermedad han sido principalmente de autopsias y estudios serológicos.

La frecuencia de la neurocisticercosis en México se inició con estudios anatomopatológicos en autopsias. Costero en 1946, encontró una frecuencia del 3.6% de cisticercosis cerebral en 3000 autopsias realizadas en el Hospital General de México (S.S.A); en otros centros hospitalarios encontraron: Briseño y cols (1961) el 3.5%, Zenteno (1965) el 3.0%, Rabiela y cols. (1979) el 3.2%; de acuerdo a los datos anteriores de cada 100 individuos aproximadamente 3 sufren de cisticercosis cerebral. Como causa de muerte, Albores y Altamirano en 1971, estableció a partir de 9412 autopsias que la frecuencia de la cisticercosis es del 1.3%. Rabiela y cols. en 1979 reportó el 0.61%, por lo tanto de acuerdo a estas casuísticas de cada 100 individuos que mueren en México el 1.0%, es debido a cisticercosis cerebral. A través de diagnósticos quirúrgicos Robles en 1944 reporta que la frecuencia de la cisticercosis del sistema nervioso central es del 25%, Olivé y Angulo en 1961, encontró el 15%, Lombardo y Mateos en 1961 el 35%, Lombardo en 1982, reportó el 28.3%, en 516 intervenciones quirúrgicas realizadas en el Hospital General del Centro Médico Nacional. I.M.S.S..

La frecuencia de la cisticercosis humana también ha sido estudiada por medio de pruebas serológicas. Flisser en 1980, reportó un estudio serológico en el que utilizó la inmunoelectroforésis en 18 471 muestras proporcionadas por el Centro Médico Nacional (I.M.S.S.) y provenientes de una población

abierta y clínicamente sana de toda la República Mexicana, encontró diferentes porcentajes de positividad en cada uno de los Estados, concluyó en forma global que el 1.0% de la población presenta anticuerpos contra la forma larvaria de Taenia solium.

Los resultados inmunológicos anteriores no se relacionan con los reportes de Briseño y cols. (1961), Rabiela y cols. (1979), Zenteno (1965) y otros - que encontraron aproximadamente el 3%, lo cual puede deberse a que existe un número elevado de individuos que presentan cisticercosis, pero sin manifestaciones clínicas, sucediendo esto cuando la localización es en tejido muscular, subcutáneo o bien que la técnica de diagnóstico utilizada es poco sensible. En 1971 Goldsmith y cols., en un estudio seroepidemiológico realizado en Oaxaca utilizando la prueba de hemaglutinación indirecta, encontró una frecuencia del 3.8% en 603 sueros estudiados.

Los datos anteriores nos pueden dar una idea aproximada de la frecuencia de la cisticercosis humana en México, aunque se desconoce la frecuencia real de esta parasitosis, por las razones antes mencionadas.

Con respecto a la frecuencia de la cisticercosis porcina, Mazzotti (1954) reportó un 4.6%. Entre 1980-1981, el promedio de cerdos decomizados a partir de una inspección en 75 rastros localizados en diferentes regiones de la República Mexicana, fué del 1.55%, probablemente este porcentaje sea mayor ya que en muchas zonas rurales no existe un debido control sanitario - por parte de las autoridades correspondientes, esto sucede sobre todo en algunas localidades, en donde aumenta el consumo de carne parasitada y en consecuencia los índices de teniasis en esas regiones, Aluja (1982).

De un estudio realizado en un rastro del Estado de México, se analizaron por inmunoelectroforésis 3000 sueros de cerdo encontrándose una positividad de 38.6%, y por inspección sanitaria únicamente el 0.3% fué decomizado, -Romero (1980); lo cual demuestra que este tipo de examen no es adecuado.

Los datos anteriores sobre la frecuencia de la cisticercosis humana y porcina en México, nos permite ubicarnos en el gran problema de salud pública que representa esta enfermedad en nuestro país.

MORFOLOGIA

La larva de Taenia solium presenta forma ovoide de color blanquecino, - de 3 a 8 mm de diámetro. Por microscopía óptica se observa una membrana delgada formada por una cutícula externa, una capa celular con gran cantidad de núcleos y en la porción interna una capa reticulofibrilar. La membrana limita una cavidad que contiene líquido (fluido vesicular), en cierta parte esta membrana se encuentra plegada hacia dentro, dando lugar al cuello que en su extremo final tiene una estructura llamada escólex, el cual presenta 4 ventosas, un roseto con una doble corona de ganchos en número de 22 a 32.

Ultraestructura. Por microscopía electrónica se observa una mayor complejidad en su estructura. Así encontramos que la superficie externa de la vesícula es un tegumento sincicial como se ha reportado para otros cisto-- dos, Lumsden (1975). Este tegumento tiene un espesor de 70 a 100 μm y se compone de tres partes fundamentales: citoplasma distal o tegumento externo, membrana o capa basal y pericardio. El citoplasma distal es la porción externa y está delimitada por una membrana protoplasmática de un grosor de 0.01 μm , además está cubierta de numerosas microvellosidades las cuales tienen una longitud de 2.0 μm , sobre las microvellosidades se encuentra una capa de glicocalix que se interconecta con éstas por medio de filamentos delgados. Bajo esta membrana plasmática hay numerosas vesículas elipsoides, algunas electrodensas de diferentes tamaños cuyo diámetro oscila entre 0.05 a 3 μm , también se encuentran mitocondrias en la porción más interna del citoplasma distal, además de que ésta es continua y sin membranas celulares. La siguiente es una capa protoplasmática la cual es soportada por una membrana basal compuesta de tejido conectivo que no es continua, sino que se encuentra interrumpida en algunas partes del sincicio formando espacios citoplasmáticos que comunican el citoplasma distal con la región nucleada o pericardio, en estos espacios se observan vesículas y mitocon -

drias. La pericardia es la capa más interna y se caracteriza por que en ella se encuentran los núcleos de las diferentes células, además que alrededor de éstos se encuentran organelos celulares como: mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y vesículas pequeñas; dentro de esta capa se localizan diferentes tipos celulares: células de almacenaje, células musculares o mioцитos las cuales están estrechamente asociadas con las fibras de colágena; estas fibras musculares se localizan entre la membrana basal y la pericardia y constituyen el sistema muscular, las células en flama y conductos celulares representan el sistema excretor. Los cilios de estas células tienen una disposición microtubular 9+2. El sistema nervioso está formado por axones nerviosos.

La función del tegumento es de nutrición ya que absorbe las sustancias nutritivas requeridas para su metabolismo, aumentando este proceso su eficiencia debido a la presencia de microvellosidades que incrementan la superficie de absorción de este tegumento. Otras funciones son de protección, eliminación de desechos y defensa contra la respuesta inmune del huésped, Ramírez y cols. (1982).

El escolex presenta tres partes: tegumento, subtegumento y parénquima. Las dos primeras son muy semejantes a la pared de la vesícula anteriormente descrita. El parénquima está compuesto de un complicado sistema celular, fibras musculares que ayudan a la evaginación del cisticerco. El escolex invaginado forma un canal espiral, el cual se caracteriza por presentar una pared plegada en toda su longitud, un tegumento homogéneo, un subtegumento con células esféricas y elongadas y un parénquima con células, fibras y numerosos corpúsculos calcáreos, siendo más denso al final del canal. Una característica importante es que sobre el tegumento del canal no se observan microvellosidades y las pocas que se observan en algunas ocasiones están atrofiadas, Slaiss (1982).

La composición química del cisticerco presenta una gran variedad de componentes. El glicocalix es de naturaleza glicoproteica, se han podido purificar cuatro glicoproteínas con un peso molecular de 180 Kd, 110-90 Kd, 55Kd,

y 45 Kd, Landa y cols. (1984). La colágena se encuentra asociada a la membrana basal y se caracteriza por carecer de hidroxiprolina, Torres-Blanco y Toledo (1981). El fluido vesicular contiene proteínas, carbohidratos, lípidos y recientemente se ha podido comprobar la presencia de porfirinas y citocromos, Larraalde y cols. (1985). Los corpúsculos calcáreos presentan carbonato de calcio, Grau y cols. (1982). Las células de almacenaje con gran cantidad de lípidos y glucógeno como material de reserva. Dentro de la pericardía se ha localizado el antígeno B, Laclette y cols. (1987). Dentro de los componentes enzimáticos cabe destacar la presencia de proteasas, fosfatasa, González-Barranco y cols. (1982) y colinesterasas, Martínez-Zedillo y cols. (1982).

Cysticercos racemosus difiere de C. cellulosae en que es de forma irregular, carece de escólex y por lo tanto de canal espiral, el tegumento es delgado e irregular, presenta lobulaciones y está cubierto de microvellosidades, su tamaño es de 5 a 90 mm de diámetro, Biagi y Briceño (1961). Por microscopía electrónica a nivel de tegumento se ha podido observar ciertas diferencias y mayor número de microvellosidades que en el cisticercos de T. solium, González-Angulo (1984).

La forma adulta de Taenia solium, alcanza una longitud que varía de 2 a 7 metros. El escólex que mide 1 mm de diámetro presenta 4 ventosas y un rostelo constituido por una doble corona de ganchos cuyo número es de 22 a 32, esta estructura se continúa por un cuello que es una región no segmentada con una gran cantidad de células germinativas, seguido por el estrobilo el cual está constituido por aproximadamente 1000 proglótidos, la porción anterior de éste, contiene a los proglótidos inmaduros o no diferenciados que son más anchos que largos, en la parte media se encuentran los proglótidos maduros los cuales ya presentan órganos sexuales masculino y femenino bien desarrollados y en la parte final los grávidos cuya cavidad es ocupada casi en su totalidad por el saco uterino el cual se encuentra distendido y lleno de huevos; los proglótidos pueden separarse del resto del cuerpo y ser expulsados con las heces, en donde por efecto del-

ambiente, se maceran o destruyen quedando libres los huevos, en algunos casos los huevos escapan del proglótido cuando aún no ha sufrido apólisis.

Al igual que la larva, el adulto presenta un tegumento sincicial cubierto por microvellosidades.

CICLO DE VIDA

El hombre o cerdo adquieren la cisticercosis al ingerir alimentos contaminados con huevos de T. solium. Mientras que el cerdo es el huésped intermediario el hombre funge tanto como huésped definitivo como intermediario, pues puede albergar a las formas adultas, pero también a las larvarias.

Si el hombre o cerdo ingieren por algun mecanismo huevos de T. solium favorecido por el fecalismo, estos pasan al duodeno y por acción de los jugos gástricos se desintegra su cubierta así como el embrióforo radial y en un lapso de 24 a 72 horas queda libre la oncosfera o embrión hexacanto el cual con ayuda de sus ganchos y por la secreción de sustancias líticas, penetra la mucosa intestinal hasta alcanzar las venas mesentéricas de donde son - arrastrados por el torrente sanguíneo a circulación menor y después a cualquier órgano o tejido, principalmente a músculo, tejido celular subcutáneo, ojo, sistema nervioso central, miocardio, hígado, intestino y peritoneo. En el transcurso de 60 a 70 días la larva se desarrolla completamente. Si el hombre ingiere carne de cerdo parasitada con cisticercos, éstos llegan al tubo digestivo y se desarrolla una tenia que se adhiere a la pared del intestino delgado, la que en aproximadamente de 5 a 12 semanas evoluciona a adulto, completándose así su ciclo de vida. En este caso el hombre es el huésped definitivo de T. solium. El cerdo como verdadero huésped intermediario juega un papel importante para la continuación del ciclo biológico, ya que en muchas regiones del mundo se consume carne de cerdo y si ésta es ingerida cruda o parcialmente cocida se corre el riesgo de adquirir teniasis.

El cerdo adquiere la cisticercosis solo si tiene acceso a la materia fe

cal humana que contenga huevos o bien proglótidos grávidos de T. solium, si tuación favorecida por el fecalismo al ras del suelo en los lugares donde se carece de una eliminación adecuada de excretas. Si por un inadecuado control sanitario la carne de estos cerdos parasitados es destinada al consumo de la población humana y tomando en cuenta que mucha gente no acostumbra la debida cocción de la carne de cerdo, el riesgo de adquirir teniasis aumenta considerablemente.

MECANISMO DE TRANSMISION

En general se reconocen tres mecanismos por medio de los cuales el hombre puede desarrollar cisticercosis y son :

Heteroinfección.-Se presenta cuando el hombre ingiere huevos de T. solium que fueron eliminados por otro individuo; generalmente ocurre por ingerir alimentos contaminados con huevos, mediante fómites, por un transmisor biológico como son las moscas que contaminan alimentos, o mediante la ingestión de legumbres que han sido regadas con aguas negras.

Autoinfección.-Consiste en la ingestión de huevos de T. solium por el propio individuo que alberga el parásito adulto ya que al no asearse adecuadamente después de la defecación quedan contaminadas las manos y la región perianal, estableciéndose el mecanismo mano-ano-boca.

Autoinfección interna.-Se presenta en individuos estreñidos que albergan al parásito adulto y al ocurrir movimientos antiperistálticos, los huevos o los proglótidos grávidos de T. solium llegan al intestino superior donde la acción de los jugos gástricos produce la liberación del embrión hexacanto. Este mecanismo se ha propuesto al encontrar individuos que presentan teniasis y cisticercosis múltiple a la vez, aunque no se ha comprobado definitivamente, por lo que muchos autores rechazan este mecanismo de infección.

SINTOMATOLOGIA

La localización de la larva de T. solium es muy variada y en base a ello produce alteraciones anatomopatológicas no bien definidas. En tejido celular subcutáneo causa problemas leves y generalmente la sintomatología es nula por lo que no se conoce su frecuencia, además de que en las autopsias no se estudia este tejido, Alvares y cols. (1975). En tejido muscular puede ser asintomático o producir ligeras molestias como alteraciones dolorosas producidas por compresión de terminaciones nerviosas; el diagnóstico puede realizarse mediante rayos X aunque generalmente esta localización pasa inadvertida, Zavala y cols. (1984). En mucosa bucal y sublingual también la sintomatología es nula y solo se presentan ligeras molestias, el diagnóstico es fácil de realizar ya que los cisticercos se observan a simple vista, López-Martínez y cols. (1974). En ojo se pueden observar fácilmente, mientras están vivos ocasionando alteraciones de la visión y su extirpación no es difícil, sobre todo los de cámara anterior, pero cuando mueren se produce una reacción inflamatoria severa, Cárdenas (1969). También se puede localizar en miocardio, hígado, intestino, mesenterio, epiplón, peritoneo y sistema nervioso central, en donde la sintomatología es muy variada y depende de la localización y número de parásitos presentes, Zenteno (1978).

En sistema nervioso central, se presentan alteraciones más severas debido a que pueden encontrarse en parénquima, en corteza, en las circunvoluciones del cerebro, en base del cerebro afectando nervios craneales, en sistema ventricular, produciendo hipertensión intracraneana que es la manifestación más común de la neurocisticercosis con cefaleas, alteraciones de la visión, vómito y convulsiones de tipo epileptiforme, hidrocefalia, trastornos sensitivos y motores, cambios mentales y trastornos cerebelosos, Lombardo (1980), Zenteno (1961), Escobar (1972), Alarcon y Olivares (1975), Shanley y Jordan (1980).

INMUNOLOGIA DE LA CISTICERCOSIS

Se han realizado numerosos trabajos acerca de la respuesta inmune en la cisticercosis, la cual involucra una compleja relación huésped-parásito. La más estudiada ha sido la respuesta humoral, aunque también se han realizado estudios sobre la respuesta celular, tanto en el hombre como en animales.

Cuando la larva de T. solium se establece en el huésped intermediario - los linfocitos T y B, los eosinófilos y las células cebadas, se ponen en contacto con los antígenos de la larva ya sean los componentes de la superficie del tegumento o bien los excretados y secretados por el parásito, iniciándose así la respuesta inmune del organismo parasitado.

Con respecto a la inmunidad celular, el cisticerco desencadena una reacción inflamatoria que varía de intensidad dependiendo de su viabilidad y localización. Willms y Merchant (1980) describen una reacción inflamatoria alrededor de la larva en músculo de cerdo, la cual se caracteriza por la presencia de eosinófilos asociados a la larva, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas en la zona más externa de la reacción, la cual es característica de un granuloma crónico. Sin embargo no se observa daño aparente a la larva, aunque por microscopía electrónica se ha descrito la formación de vesículas en el tegumento externo en el sitio donde se observan los eosinófilos unidos a este, sugiriendo que puede ser el inicio del daño producido por la respuesta inmune del huésped.

Márquez-Monter (1971) reporta que el cisticerco puede vivir durante meses o años sin mostrar un proceso inflamatorio grave alrededor de éste; lo antes mencionado hace pensar que los eosinófilos no son el principal mecanismo de defensa del huésped contra la larva de T. solium, aunque Soulé (1976), lo reporta para Cysticercus bovis. Por tal motivo en la respuesta inmune del huésped contra la larva deben estar involucrados otros mecanismos.

En el hombre también se ha descrito una reacción inflamatoria semejante a la del músculo de cerdo; a nivel subcutáneo, Alvarez y cols. (1975) reportan la presencia de linfocitos, células gigantes multinucleadas alrededor de un cisticerco muerto, formando un granuloma que posteriormente se calcifica, Zenteno (1985), González-Angulo (1984), Grau y cols. (1982), esta calcificación es de tipo ectópica con la característica de que las fibras extracelulares del parásito constituyen parte de la matriz orgánica de tejido calcificado, Grau y cols. (1982).

C. racemosus produce una reacción inflamatoria mucho más intensa, observándose alrededor del parásito linfocitos, macrófagos, células gigantes y una abundante producción de tejido conjuntivo que rodea la membrana del cisticerco, González-Angulo (1984).

Mientras el parásito está vivo se aloja en los tejidos del huésped sin causar reacción inflamatoria grave, en cambio cuando muere ocasiona una violenta respuesta inflamatoria granulomatosa debido a la liberación de gran cantidad de moléculas antigénicas, Cardenas (1969), esto se ha reportado en el caso de la cisticercosis ocular.

En el hombre es muy común observar cisticercos calcificados no así en el cerdo, hecho que puede deberse a la corta longevidad del cerdo o bien que el hombre no es el huésped adecuado.

Con respecto a la inmunidad humoral, Flisser y cols. (1980), ha demostrado que la respuesta es muy heterogénea, ya que los individuos cisticercosos producen anticuerpos contra gran variedad de antígenos (A, B, C, D, E, F, G, H) y el que reconoce con mayor frecuencia es el antígeno B, por lo que ha sido objeto de estudios más finos, es reconocido por el 84% de los individuos cisticercosos; por estudios inmunológicos se ha demostrado que es una glicoproteína compuesta de dos polipéptidos inmunológicamente idénticos los cuales tienen un peso molecular de 95 y 105 Kd, Guerra y cols. (1982), tiene característica de fibronectina ya que se adhiere a los tejidos del cerebro del hombre y del cerdo tanto parasitados como sanos, Plancarte y cols. (1982). Este antígeno se produce a nivel tegumentario y es excretado-

continuamente hacia el tejido del huésped, lo cual puede explicar que sea el antígeno mayormente reconocido por los individuos cisticercosos, Laclette y cols. (1987).

Por estudios de inmunoelectroforésis realizados con sueros humanos se encontró que las inmunoglobulinas anti-antígeno de cisticerco que se forman son las siguientes: IgG (98%), IgM (80%), IgE (55%), IgA (39%) y la IgD (35%), Flisser y cols. (1980).

A pesar de la importancia del antígeno B no es específico de especie ya que muestra reacción cruzada con otros céstodos principalmente con Echinococcus granulosus, por tal motivo Gottstein y cols. (1986), han tratado de purificar antígenos específicos de especie, reportando dos polipéptidos de 26 y 8 Kd que no presentan reacción cruzada con E. granulosus.

La velocidad de aparición de los anticuerpos durante la respuesta inmune en la cisticercosis, dependen del número de huevos ingeridos y del número de larvas que se logran desarrollar dentro del huésped.

Es bien conocido que algunos parásitos se caracterizan por evadir la respuesta inmune del huésped dirigida contra ellos; en la cisticercosis se han propuesto varias hipótesis para tratar de explicar por que algunos individuos son asintomáticos y otros sintomáticos y por que la respuesta celular aparentemente no es grave y pueden vivir los cisticercos durante meses, sin sufrir daño aparente y solo se presenta una fuerte respuesta cuando el parásito muere debido a la liberación de sustancias antigénicas al medio circundante. La primera hipótesis se refiere al efecto de pantalla, que consiste en la formación de complejos inmunes a distancia, evitando un daño directo al parásito. La segunda está relacionada con el mimetismo, condición en que el parásito se rodea de anticuerpos del huésped, desviando la respuesta inmune del mismo, Wilms y cols. (1977), Díaz y cols. (1984). La tercera, por la naturaleza química de antígeno B (fibronectina), hace que este no sea dañado por los anticuerpos específicos y por lo tanto no dañan al cisticerco, Laclette y cols. (1987). Cuarta: inmunosupresión inducida por el parásito.

Como la localización de los cisticercos en el huésped es variada la sintomatología es diversa y el diagnóstico es difícil, ya que depende del número y lugar donde se establezcan los cisticercos. Es posible su diagnóstico utilizando diversos métodos como : radiografías, tomografía axial computada y pruebas inmunológicas.

Para valorar la respuesta inmune humoral se han utilizado diferentes antígenos, como son: el cisticercos completo, el de excolex, de membrana o pared vesicular, líquido o fluido vesicular, de excreciones y secreciones, el antígeno somático incompleto en el cual se utilizan tanto el excolex como la pared vesicular, estos antígenos han servido para detectar anticuerpos tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo.

Las técnicas inmunológicas que se han empleado son: inmunodifusión, inmunoelectroforesis, Flisser y cols. (1975), reacción de fijación del complemento, Nieto (1956), precipitación en gel y tubo capilar, Biagi y Tay (1964), inmunofluorescencia, González-Barranco y cols. (1978), Rydzewski y cols. (1975), aglutinación en partículas de latex, Velasco y cols. (1983), Castañón (1986) y hemaglutinación indirecta, Proctor y cols. (1966), Villanueva y González (1980); la mayoría de estas pruebas han ayudado a detectar anticuerpos anticisticercos pero en ninguna se ha obtenido una sensibilidad y especificidad del 100% ya que entre la población de cisticercosos aparecen tanto falsas positivas como negativas.

La prueba de fijación del complemento fue empleada por Nieto (1956), para detectar cisticercosis del sistema nervioso central y requiere necesariamente de líquido cefalorraquídeo, tiene la desventaja de ser inespecífica - en un rango del 50 %, además de ser laboriosa y costosa.

Flisser y cols. (1975), determinó que la inmunoelectroforesis solo detecta un 50 % de los enfermos, debido aparentemente a que la mitad de ellos carecen de anticuerpos anticisticercos circulantes para dar resultados positivos, o que el agente etiológico no es siempre la larva de T. solium, por lo que esta técnica es muy poco sensible.

González-Barranco y cols. (1978), reportaron para la inmunofluorescencia

(IF), solo un 12 % de falsas positivas; en esta prueba se utilizan anti - cuerpos marcados con sustancias fluorescentes, que al formar un complejo - permiten la rápida identificación del organismo o fracciones del mismo.

La prueba de hemaglutinación indirecta fué empleada por primera vez en el diagnóstico de la cisticercosis por Biagi y cols.(1961), posteriormente por Proctor y cols.(1966) y Rydzexki y cols.(1975). Esta técnica ha sido comparada con otras pruebas y se ha comprobado que su sensibilidad aumenta al usar sueros en lugar de líquido cefalorraquídeo; aunque se reporta una sensibilidad mayor del 65 % tiene la desventaja que con los antígenos utilizados se presentan reacciones cruzadas con otras parasitosis como: hidatidosis, fasciolosis, teniasis y ascariasis.

El radioinmunoensayo (RIA), es otra prueba en la cual se utilizan antígenos marcados con isótopos radiactivos, es un método sensible que permite detectar moléculas de alto y bajo peso molecular, pero tiene la desventaja de que la vida media de los reactivos es muy corta, además de que es necesario un equipo sofisticado para su implementación y el uso de isótopos requiere de un estricto control oficial, Miller y cols.(1984).

En los últimos años ha tenido gran auge las pruebas inmunoenzimáticas - análogas a la IF y RIA. En 1971, dos grupos trabajando por separado con esta técnica uno en Holanda, Van Weenen y Schrs (1971), y otro en Suecia, - Engvall y Perlman (1972), introdujeron la idea de usar enzimas conjugadas para detectar y cuantificar antígenos y anticuerpos. Desde 1974 estas técnicas inmunoenzimáticas se han utilizado ampliamente en parasitología en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, Voller y cols.(1976,1978), - Ruitenber(1976,1975), y especialmente en: Hidatidosis, Guisantes y cols. - (1981), Coltorti (1986), Amibiasis, Bols y cols. (1980), Oncocercosis, Ambroise-Thomas y cols.(1980), Esquistosomiasis, Janitschke y cols.(1981), Tripanosomiasis, Voller y cols.(1975), Triquinosis, Ruitenber y cols. - (1975) y Malaria, Ambroise-Thomas and Desgeorges (1978).

II OBJETIVOS.

Por la problemática que representa el diagnóstico de la cisticercosis - en nuestro país y ante la necesidad de contar con una técnica mas sensible y de fácil aplicación así como de estudios epidemiológicos en la población, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Implementar y estandarizar la técnica de ELISA con antígenos de C. cellulosae y sueros controles positivo y negativo.
- 2.- Comparar los valores entre las pruebas de Hemaglutinación y ELISA.
- 3.- Determinar sensibilidad y especificidad de la prueba.
- 4.- Determinar la utilidad de cuatro diferentes antígenos del cisticercos, - Excreciones y secreciones (ES), Fluido vesicular (FV), Antígeno somático incompleto (ASI) y Antígeno somático completo(ASC) con la técnica - de ELISA.
- 5.- Comparar la técnica en diferentes grupos de pacientes.

HIPOTESIS.

De acuerdo a la mayor sensibilidad reportada para la prueba de ELISA - en algunas parasitosis, es de esperar que al ser empleada para el diagnóstico de la cisticercosis, utilizando antígenos del parásito, también resulte más sensible que las técnicas habitualmente empleadas en la actualidad para el diagnóstico de este problema de salud pública.

III MATERIAL Y METODO.

Sueros

Se utilizaron 100 sueros humanos como control positivo, se estudiaron - 38 sueros que correspondieron a pacientes con cisticercosis cerebral diagnóstica por tomografía axial computada (TAC) los que se dividieron en - cuatro grupos (I al IV) de acuerdo a la localización de los cisticercos. El quinto grupo lo constituyeron 52 pacientes sospechosos de presentar cisticercosis y finalmente el grupo VI constituido por 10 individuos sanos, - que forman el grupo control negativo.

GRUPO

I	Cisticercosis parenquimatosa calcificada	7 casos.
II	Cisticercosis parenquimatosa quística	16 casos.
III	Cisticercosis parenquimatosa quística y calcificada.	12 casos.
IV	Cisticercosis parenquimatosa basal mixta y espinal	3 casos.
V	Pacientes sospechosos de presentar cisticercosis.	52 casos
VI	Individuos sanos.	10 casos.

Antígenos.

Para la realización de la técnica de ELISA y hemaglutinación indirecta se utilizaron cuatro diferentes antígenos: Excreciones y secreciones (ES), Fluido vesicular (FV), somático incompleto (ASI, y somático completo (ASC).

Los antígenos utilizados se elaboraron a partir de larvas de T. solium, extraídos mediante disección de carne de cerdo parasitadas, la cual fué - proporcionada por el rastro ABC de los Reyes Estado de México.

Técnicas

Debido a la experiencia en el uso de hemaglutinación indirecta para el diagnóstico de las diferentes parasitosis de nuestro medio y a que es una-

técnica sensible y de fácil realización, se utilizó como prueba comparativa para ELISA.

En base a la previa estandarización de las técnicas de hemaglutinación y ELISA, se ha tomado como parametro de positividad el título de dilución de- 1:16 y 1:128 respectivamente.

PREPARACION DE ANTIGENOS

Material

Liofilizadora.
Espectrofotómetro.
Agitador magnético.
Autoclave.
Balanza granataria.
Centrífuga.
Cuba para baño de hielo.
Pinzas de disección.
Frascos de boca ancha estériles.
Frascos para liofilizar.
Homogenizador.
Jeringa de 50 ml y aguja del # 16.
Matraz erlenmeyer.
Cajas de petri.
Pipetas graduadas.
Micropipetas.
Probetas.
Tubos de cetrífuga estériles.
Vaso de precipitados.

Reactivos.

Acetona a -20°C .
Buffer de fosfatos salino (PBS), PH 7.2, estéril.
Sacarosa al 0.25 M, estéril.
Solución de antibióticos (penicilina y estreptomfina)
Solución salina estéril al 0.85%.

Metodo

Con ayuda de pinzas de disección y bisturí, extraer y depositar los cisticercos en solución salina estéril al 0.85%. Se lavan perfectamente bien con esta solución hasta quedar completamente desengrasados.

Colocar los cisticercos en solución de antibióticos al 0.01% (penicilina y estreptomcina) diluida volumen a volumen en agua destilada estéril, dejar reposar durante 1 hora.

En condiciones de esterilidad depositar los cisticercos uno a uno en un matraz erlenmeyer conteniendo solución salina estéril al 0.85%.

Los cisticercos se dividen en cuatro lotes para la elaboración de:

- 1.- Antígeno de Excreciones y Secreciones (ES).
- 2.- Antígeno de Fluido vesicular (FV).
- 3.- Antígeno Somático Incompleto (ASI).
- 4.- Antígeno Somático Completo (ASC).

Obtención de antígeno de excreciones y secreciones.

Colocar los cisticercos tratados con solución de antibióticos en un matraz Erlenmeyer y agregar 0.1 ml de solución salina estéril al 0.85% por cada cisticerco.

Incubar a 37°C por 22 horas. En este tiempo el cisticerco produce sus sustancias metabólicas con propiedades antigénicas, las cuales son liberadas al medio en que se encuentran ya que el cisticerco es aun viable.

Se separan los cisticercos del matraz y el líquido colectado se almacena en congelación en alícuotas de 1 ml.

Se determina la concentración de proteínas por el método de Lowry y cols. (1951), y de carbohidratos por el de antrona, Teller y Keidding (1954).

Obtención de antígeno de fluido vesicular

Con ayuda de una aguja de disección, romper la membrana cuidadosamente y extraer el líquido vesicular.

Colectar el líquido y centrifugar a 10 000 rpm durante 15 min.

Obtener el sobrenadante en alícuotas de 1 ml y almacenarlo en congelación.

Determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y carbohidratos por el de antrona.

Obtención de antígeno somático incompleto.

Descrito por Beltran y cols. (1974). Se utilizan cisticercos incompletos (sin fluido vesicular), previamente desengrasados y tratados con antibióticos.

Depositar los cisticercos en un homogenizador estéril y agregar 4 ml de solución de sacarosa al 0.25 M por gramo de cisticerco (peso húmedo).

Homogenizar la mezcla en baño helado.

Transferir el homogenizado en un frasco de boca ancha conteniendo acetona fría (-20°C), en proporción de 16 volúmenes por homogenizado inicial, el homogenizado se deposita lentamente por debajo de la superficie de la acetona, tapar y agitar vigorosamente durante 5 min hasta que quede perfectamente homogenizado.

Decantar la acetona y agregar el mismo volumen de acetona fría, agitar vigorosamente y dejar reposar durante 1 hora.

Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en acetona fría, homogenizar nuevamente y centrifugar durante 15 min a 3000 rpm.

Decantar el sobrenadante y liofilizar.

Resuspender el liofilizado en buffer de fosfatos salino (PBS) PH 7.2 estéril y frío en proporción de 0.4 ml por volumen de homogenizado inicial.

Centrifugar durante una hora a 10 000 rpm a 4 °C.

Colectar el sobrenadante y almacenar en alícuotas de 1 ml en congelación.

Determinar el contenido de proteínas por el método de Lowry y de carbohidratos por el de antrona.

Si la cantidad de carbohidratos es superior a 3 mg/ml, dializar contra PBS PH 7.2 durante 24 horas, realizando cambios cada 6 hrs.

La concentración de proteínas se estandariza a 3 mg/ml.

Obtención de antígeno somático completo

Colocar los cisticercos completos con antibióticos en un homogenizador y agregar por cada gramo de cisticerco (peso húmedo) 4 ml de solución de sacarosa 0.25 M.

Homogenizar en baño helado.

Transferir el homogenizado en frascos de boca ancha conteniendo acetona fría en proporción de 16 volúmenes por volumen de homogenizado inicial, depositar el homogenizado por debajo de la superficie de la acetona, tapar el frasco y agitar vigorosamente hasta homogenizar perfectamente. Dejar reposar durante 20 min. en baño helado.

Decantar la acetona y resuspender el homogenizado en acetona fría con el mismo volumen del paso anterior, agitar vigorosamente hasta homogenizar y dejar reposar durante 1 hora en baño helado.

Decantar la acetona y resuspender el sedimento en acetona fría, homogenizar y centrifugar durante 15 min. a 3000 rpm.

Decantar el sobrenadante y liofilizar.

Resuspender el liofilizado en PBS PH 7.2 en una proporción de 0.4 ml - por volumen de homogenizado inicial.

Agitar en frío durante 16 horas.

Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 hora a 4 °C.

Obtener el sobrenadante y almacenar en alícuotas de 1 ml.

Determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y carbohidratos por el de antrona. Si la concentración de carbohidratos es superior a 3 mg/ml, dializar contra PBS PH 7.2 durante 24 horas, con cambios cada 6 horas.

La concentración de proteínas se ajusta a una concentración de 3 mg/ml.

Determinación de Proteínas.

Método de Lowry.

Es un método colorimétrico mediante el cual se mide el color que se produce al agregar el reactivo de folin-ciocalteu a una solución alcalina de proteínas. Este reactivo oxida compuestos fenólicos en condiciones alcalinas, y se reduce de color amarillo inicial a un color azul intenso; por lo cual se emplea para medir compuestos fenólicos, así como para determinar estos en aminoácidos como la tirosina: como todas las proteínas contienen tirosina es posible determinar cuantitativamente las proteínas existentes en una muestra determinada. Los grupos indol e imidazol del triptófano e histidina reaccionan también con el reactivo pero muy débilmente.

La intensidad del color depende del contenido de tirosina principalmente y triptófano de la muestra problema.

Este método es muy sensible y permite determinar cantidades pequeñas de

proteína del orden de microgramos.

Materia

Balanza analítica.

Espectrofotómetro.

Gradilla.

Matraz aforado.

Probeta.

Pipetas volumétricas.

Micropipetas.

Tubos de ensaye.

Reactivos

Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1%.

Solución de tartrato de sodio y potasio al 2%.

Solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio al 0.1 N.

Folin-ciocalteau 1 N.

Solución de albúmina sérica bovina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Agua destilada.

Reactivo A

1.0 ml de solución de sulfato de cobre al 1 %, más 1.0 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 %, disuelto en 100 ml de solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N.

Método

Preparar la curva estándar de la siguiente manera:

Se preparan a partir de la albúmina sérica bovina diluciones que conten gan 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína, en agua destilada.

El blanco contiene únicamente agua destilada.

En otro tubo, medir 100 μl de la muestra problema y completar el volumen con agua destilada.

Añadir 3.0 ml del reactivo A a todos los tubos.

Agitar y dejar reposar durante 10 min a temperatura ambiente.

Agregar 0.3 ml de folin-ciocalteau 1 N a todos los tubos.

Agitar y dejar reposar durante 30 min a temperatura ambiente.

Leer en el espectrofotómetro a 500 nm de longitud de onda (D.O).

Interpretación de los resultados.

Se grafica la D.O contra la concentración y por interpolación de los valores de la D.O en la curva estándar, se obtiene la concentración de proteínas de la muestra problema.

Determinación de Carbohidratos.

Método de Antrona.

La antrona en ácido sulfúrico es un reactivo para determinar carbohidratos y ésteres.

Este método se basa en la formación de derivados del furfural por deshidratación y cicloación de la molécula.

Material

Balanza analítica

Baño de agua.

Espectrofotómetro.

Matraz aforado.

Micropipeta.

Pipetas volumétricas.

Probeta.

Tubos de ensaye.

Reactivos

Solución de antrona al 0.2% en ácido sulfúrico al 95% (se prepara antes de ser utilizado).

Solución estándar de glucosa 100 mg/ml.

Agua destilada.

Método

Preparar la curva estándar de la siguiente manera:

En una serie de tubos que contengan 2.0 ml del reactivo de antrona y - manteniendolos en baño de hielo, agregar el volumen de la solución patrón de glucosa para obtener concentraciones de 20,40,60,80 y 100 $\mu\text{g/ml}$, completar el volumen a 3.0 ml con agua destilada.

En otro tubo conteniendo 2.0 ml del reactivo de antrona manteniendolo en baño de hielo, agregar 100 μl de la muestra problema y completar a un volumen de 3.0 ml con agua destilada.

El blanco consiste de 2.0 ml de antrona y 1.0 ml de agua destilada.

Agitar vigorosamente todos los tubos sin sacarlos del baño de hielo, hasta que se homogenizen perfectamente.

Colocar los tubos en baño de agua a ebullición durante 15 min.

Colocarlos en baño de agua fría.

Realizar la lectura de D.0 en el espectrofotómetro a 625 nm de longitud de onda.

Interpretación de resultados:

Los valores de D.0 de los tubos de la curva estándar se grafican contra la concentración. Por interpolación de los valores de D.0 en la curva patrón se obtiene la concentración de carbohidratos de la muestra problema.

Técnicas Inmunológicas

Homaglutinación indirecta.

Método de Boyden

Esta prueba se basa en la propiedad que tienen los eritrocitos de adsorber sobre su membrana algunas moléculas como polisacáridos y proteínas con propiedades antigénicas y su posterior aglutinación con las inmunoglobulinas específicas.

Se utilizan globulos rojos de carnero o humano tipo "0" ; al ponerlos en contacto con un antígeno determinado, lo adsorben espontáneamente en su superficie, incrementandose esta propiedad al tratarlos con ácido tánico - ya que se establece una atracción electrostática entre la membrana del eritrocito y el antígeno proteico; al poner en contacto estos eritrocitos sensibilizados con inmunoglobulinas específicas se produce aglutinación.

Para semicuantificar las inmunoglobulinas contenidas en una muestra, se hacen diluciones seriadas del suero con cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con un antígeno específico, la dilución más alta del suero que determina aglutinación clara, se considera como punto final de la reacción, que representa el titulo de la dilución.

Material

Balanza analítica.

Centrífuga.

Microdilutores de 50 μ l.

Micropipetas

Pipetas graduadas.

Baño de agua.

Placas de microtitulación de fondo en forma de U .
Matraz erlenmeyer.
Probeta graduada.
Tubos de centrifuga cónicos graduados.
Tubos de ensaye.

Reactivos

Buffer de fosfatos salino (PBS) PH 7.2 y 6.4.
Acido tánico 1:20 000.
Citrato de sodio al 3.8%.
Suero normal de conejo.
Eritrocitos de carnero.
Antígenos: Excreciones y secreciones (ES), Fluido vesicular (FV), antígeno -
somático incompleto (ASI), antígeno somático completo (ASC).
Suero control negativo.
Suero control positivo.

Método

Tanado de eritrocitos

Suspender los eritrocitos de carnero en solución de citrato de sodio al 3.8% y lavar con buffer de fosfatos salino (PBS) PH 7.2, tres veces por - centrifugación a 2000 rpm durante 5 min.

Decantar y medir el paquete celular, hacer una suspensión al 2.5%, agregando 4 ml de PBS PH 7.2 por cada 0.1 ml de eritrocitos.

Agregar un volumen igual de ácido tánico 1:20 000 (vol a vol).

Incubar la mezcla en baño de agua a 37 °C durante 15 min.

Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min.

Decantar el sobrenadante y resuspender en PBS PH 7.2, centrifugar nuevamente a 2000 rpm durante 5 min.

Decantar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos en proporción - de 4 ml de PBS por cada 0.1 ml de eritrocitos.

Determinación de la concentración óptima de antígeno y sensibilización de eritrocitos

Los eritrocitos tanados se sensibilizan agregando en una proporción 1:1 eritrocitos más antígeno diluido en PBS 6.4 en diferentes diluciones 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640. Estas diluciones se realizan para cada - uno de los antígenos utilizados (ES, FV, ASI, ASC).

Incubar la mezcla en baño de agua durante 15 min a 37 °C.

Retirar y centrifugar durante 5 min a 2000 rpm.

Decantar el sobrenadante y lavar los eritrocitos 3 veces con suero normal de conejo al 1.0% en PBS PH 7.2 por centrifugación a 2000 rpm durante - 5 min.

Decantar el sobrenadante, y ajustar el paquete de eritrocitos a una sus - pensión de 1.5% en suero normal de conejo al 1.0% en PBS PH 7.2 .

Desarrollo de la prueba:

Agregar a todas las excavaciones de la placa de microtitulación 50 µl - de suero normal de conejo al 1.0% en PBS PH 7.2 .

Añadir con un microdilutor, 50 µl del suero problema y colocarlo en el - primer pozo, mezclar perfectamente y transferir el microdilutor y su carga al siguiente pozo, repitiéndose este procedimiento hasta la última excava - ción y se desecha el contenido.

Se incluye un suero control positivo, con un título conocido y un con - trol negativo de suero humano normal.

Se agrega a todos los pozos 25 µl de la suspensión de eritrocitos sensi - bilizados con el antígeno.

Agitar la placa en un rotor durante 3 min.

Dejar reposar la placa a temperatura ambiente durante 3 horas.

Efectuar la lectura de los resultados los que se interpretan de la siguiente manera: la dilución más baja del antígeno que proporcione el título más elevado de hemaglutinación con el suero control positivo y no exista reacción con el suero control negativo se considera como la dilución óptima de trabajo.

Los sueros problema se probaron con cada uno de los antígenos a la dilución óptima anteriormente determinada.

Se incluyó en cada placa un suero control positivo y un negativo.

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: La dilución más alta en que se presenta aglutinación indica el título de anticuerpos existentes en la muestra problema.

E.L.I.S.A.

Esta prueba se realizó según el método de Walls y Kenneth (1977).

El principio del ensayo de la enzima ligada a un inmunoadsorbente (ELISA) se basa en la observación hecha en la década pasada acerca de que un antígeno o anticuerpo se puede unir químicamente a una enzima por medio de enlaces covalentes, dando como resultado un conjugado que conserva gran parte de su actividad enzimática e inmunológica. El usar una enzima tiene la ventaja de que esta presenta una propiedad catalítica natural, la cual es capaz de degradar un sustrato específico; tal efecto se hace manifiesto por un cambio de coloración, el cual a su vez es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra problema.

El método indirecto permite cuantificar anticuerpos. En este caso el antígeno se inmoviliza por adsorción pasiva a una fase sólida (placa de poliesti

reno); posteriormente al agregar la muestra del suero problema que contiene anticuerpos específicos estos se uniran con el antígeno inmovilizado, - después se añade un segundo anticuerpo conjugado con una enzima (anti-irmu noglobulina humana unida a peroxidasa), el cual se une al primer anticuerpo y finalmente al agregar el sustrato apropiado, este reacciona con la enzima del conjugado dando como resultado un cambio de coloración, el cual es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra problema. Por el contrario si no hay anticuerpos presentes en el suero problema - no habrá coloración.

Material.

Balanza analítica.

Centrífuga.

Microdilutores de 50 μ l.

Micropipeta.

Placas de poliestireno para cultivo de tejido de fondo plano (NacIon Inc).

Matraz erlemeyer.

Probetas.

Vaso de precipitados.

Pizeta.

Reactivos

Acido sulfúrico 8 N.

Albumina sérica bovina al 0.1%.

Conjugado (Anti IgG humana-peroxidasa) diluido 1:2000 en PBS/tween.

Ortofenilendiamina 10 mg/ 1 ml de metanol.

Solución de trabajo: 1 ml de ortofenilendiamina, más 0.1 ml de H₂O₂ al 3% en 99 ml de agua destilada.

Solución amortiguadora de fosfatos PH 9.4 (PBS).

Solución amortiguadora de fosfatos PH 7.2 (PBS).

Solución PBS/tween 20 al 0.05% en PBS PH 7.2 .

Agua destilada.

Antígenos: Excreciones y secreciones (ES), Fluido vesicular (FV), antígeno somático incompleto (ASI), antígeno somático completo (ASC).

Suero humano control negativo.

Suero humano control positivo.

Método

Estandarización de la dilución óptima de antígeno

La estandarización de la dilución óptima de antígeno se llevó a cabo - con los cuatro antígenos utilizados en esta prueba (ES,FV,ASI,ASC).

El antígeno se diluye en PBS PH 9.4, realizando diferentes diluciones: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, se prueban con el suero - control positivo y con un control negativo, realizando el procedimiento siguiente:

Desarrollo de la prueba

Añadir 200 μ l de la dilución de antígeno a cada uno de los pozos de la placa de poliestireno.

Incubar la placa durante 3 horas a 37 °C.

Desechar y lavar con PBS/tween tres veces durante 3 min en cada una de ellas.

Añadir 200 μ l de albúmina sérica bovina al 0.1% e incubar durante 1 hora.

Desechar y lavar con PBS/tween tres veces durante 3 min en cada ocasión.

Agregar 200 μ l de PBS/tween a todos los pozos, y posteriormente adicionar con un microdilutor de 50 μ l suero en el primer pozo, mezclar perfectamente y transferir sucesivamente a los siguientes pozos hasta la última excavación donde se desecha 50 μ l.

Incubar 30 min a 37 °C.

Desechar y lavar con PBS/tween durante 3 min tres veces consecutivas.

Añadir 200 µl de conjugado (dilución óptima 1:2000) a todos los pozos e incubar durante 45 min a 37 °C.

Desechar y lavar con PBS/tween durante tres min, tres veces.

Agregar 200 µl de la solución de trabajo (sustrato) a todos los pozos e incubar durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad.

Adicionar 25 µl de ácido sulfúrico 8 N para detener la reacción.

Se incluye en la prueba un suero humano control positivo, con título conocido y un control negativo de suero humano normal, además se incluye un control que no contiene suero, únicamente PBS/tween.

Efectuar la lectura de los resultados: se determina mediante la aparición de un color anaranjado el cual se acentúa por la adición de ácido; - en una prueba negativa se observa la permanencia de un color amarillo débil semejante a el control negativo. El título final, será el inverso de la dilución más alta en donde se observa un cambio de color. La dilución más baja del antígeno que proporcione el título más elevado con el suero control positivo y no exista reacción con el suero control negativo se considera - como la dilución óptima del antígeno.

Los sueros problemas se probaron con cada uno de los antígenos a la dilución óptima correspondiente para cada uno de ellos.

De igual manera se incluyó en cada prueba un suero control positivo y - uno negativo, además del control del PBS/tween.

FIG 1 METODO INDIRECTO DE ELISA

1 ADSORCION DEL ANTIGENO
(ASC, ASI, FV, ES)

LAVADO



2 ADICION DEL ANTISUERO

LAVADO



3 ADICION DE LA ENZIMA
(PEROXIDASA)
UNIDA A UNA ANTI IgG-HUMANA

LAVADO



4 ADICION DEL SUSTRATO
(PEROXIDO DE HIDROGENO) Y
DEL INDICADOR (O.F.D.)



LA INTENSIDAD DE COLOR SERA PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE ANTICUERPOS ANTICISTICERCO PRESENTES.

IV RESULTADOS.

Los resultados obtenidos para cada uno de los grupos estudiados con los diferentes antígenos, en la prueba de hemaglutinación y ELISA están representados en los cuadros 1,2,3,4,5 y 6. El título de dilución considerado como positivo en hemaglutinación es de 1:16 y en ELISA 1:128.

En el cuadro 1 se observan los resultados del grupo I formado por 7 pacientes con cisticercosis parenquimatosa calcificada y muestra la frecuencia con que se presentaron los títulos de dilución en hemaglutinación y ELISA con los cuatro antígenos utilizados; ASC,ASI,FV y ES. Para el antígeno somático completo (ASC), solo cuatro casos fueron positivos en hemaglutinación, al igual que en ELISA: para el antígeno somático incompleto (ASI), 5 casos positivos en hemaglutinación y en ELISA 4 positivos: para el antígeno de fluido vesicular (FV),3 positivos en hemaglutinación y 4 en ELISA: y con antígeno de excreciones y secreciones. (ES), cero positivos en hemaglutinación y 2 en ELISA. El número total de títulos positivos en hemaglutinación fué de 12 en cambio para ELISA fué de 14. Hay que hacer resaltar que no todos los pacientes presentaron títulos positivos para los cuatro antígenos ya que para algunos fueron positivos y negativos para otros; solo en dos casos el mismo paciente presentó títulos positivos para los cuatro antígenos en la prueba de ELISA.

En el cuadro 2 se muestran los resultados del grupo II, formado por 16 pacientes con cisticercosis parenquimatosa quística, observándose las frecuencias de los títulos en hemaglutinación y ELISA para los cuatro antígenos empleados. En cuanto a hemaglutinación se observa que para ASC hay 8 títulos positivos, para ASI 10, para FV 11 y para ES 7; en ELISA se presentaron 8 positivos para ASC al igual que en ASI,FV y ES. El mayor número de casos positivos en hemaglutinación se observó con el antígeno FV, en cambio con ELISA no hay diferencia entre los títulos positivos para los cuatro antígenos.

En este grupo se presentaron 7 pacientes con títulos positivos para los

cuatro antígenos tanto en hemaglutinación como en ELISA.

En el cuadro 3 se observan los resultados del grupo III que comprende 12 pacientes con cisticercosis parenquimatosa quística y calcificada, mostrando la frecuencia de los títulos en hemaglutinación y ELISA con los cuatro antígenos probados. En hemaglutinación se observa que con el ASC hay 7 positivos al igual que para ASI, para FV 8 y para ES 5; en ELISA hay 11 para ASC, 7 para ASI, 10 para FV y 11 para ES. El número total de títulos positivos fué de 28 en hemaglutinación y 39 en ELISA. En cuanto a la positividad encontrada para cada antígeno, en hemaglutinación no hay diferencia entre ASC, ASI y FV (7 y 8), y en ES 5 casos; en ELISA los antígenos ASC, FV y ES tienen mayor número de títulos positivos (10 y 11) en cambio para ASI solo 5.

En este grupo observamos que en hemaglutinación tres pacientes presentaron títulos positivos para los cuatro antígenos y en ELISA 7.

En el cuadro 4 se muestran los resultados del grupo IV formado por tres pacientes con cisticercosis parenquimatosa basal mixta y espinal, en donde se observa la frecuencia de los títulos tanto en hemaglutinación como en ELISA con los cuatro diferentes antígenos. En hemaglutinación los títulos positivos fueron para ASC 2, para ASI 2, para FV 3 y para ES 1; en ELISA, 3 para ASC, 2 para ASI, 3 para FV y ES. En relación al número de pacientes que resultaron positivos en hemaglutinación fué de 3, al igual que en ELISA.

En este grupo se presentó un paciente con títulos positivos para los cuatro antígenos en hemaglutinación y 2 en ELISA.

En el cuadro 5 se presentan los resultados del grupo V formado por 52 pacientes sospechosos de presentar cisticercosis. En hemaglutinación el número de títulos positivos para ASC fué de 17, para ASI 18, para FV 24 y para ES 16; en ELISA fué 28 para ASC, 16 para ASI, 22 para FV y ES. El antígeno que determinó mayor número de casos en hemaglutinación fué el FV con 24 y en ELISA el ASC con 28.

En relación al número de pacientes que presentaron títulos positivos para los cuatro antígenos fué de 11 en hemaglutinación y 13 casos en ELISA.

En el cuadro 6 se observan los resultados del grupo IV que corresponden a 10 individuos sanos, sin antecedentes de cisticercosis ni de ninguna otra parasitosis, en hemaglutinación solo se presentó un título positivo 1:16 para ASC y todos negativos para los antígenos restantes, ASI, FV, ES. En ELISA, se observó dos casos positivos con ASC (uno de los cuales correspondió al caso positivo en hemaglutinación) y negativo para ASI, FV y ES.

En la grafica 1 y 2 se observa con más detalle la frecuencia con que se presentaron los sueros de los pacientes de los grupos I, II, III, IV, V y VI respectivamente tanto en hemaglutinación como en ELISA y con los diferentes antígenos utilizados. La línea continua separa los títulos positivos de los negativos. El número total de resultados positivos con cualquiera de los cuatro antígenos utilizados fué de: en el grupo I formado por 7 casos en hemaglutinación 12 títulos positivos y en ELISA 14; en el grupo II formado por 16 casos se presentaron 36 positivos en hemaglutinación y 32 en ELISA; en el grupo III formado por 12 casos en hemaglutinación hubo 27 positivos y en ELISA 39; en el grupo IV formado por tres casos se presentaron en hemaglutinación 8 positivos y en ELISA 11; en el grupo V formado por 52 casos en hemaglutinación 74 positivos y en ELISA 158, y por último en el grupo VI formado por 10 casos se presenta 1 positivo en hemaglutinación y 2 en ELISA.

En el cuadro 7 se resume la frecuencia de positividad de los sueros para cada uno de los antígenos utilizados, en los diferentes grupos y con las dos pruebas, observándose que en hemaglutinación con el antígeno de FV se presentó el mayor número de casos positivos en el grupo control positivo (I al IV), siguiendo en importancia el ASI, ASC y ES, en ELISA se obtuvieron resultados semejantes con ASC y FV: En el grupo V (grupo de sospechosos), en hemaglutinación el FV fué el antígeno con el que se determinó el mayor número de casos y en ELISA con el ASC; en el grupo de individuos sanos (grupo V) solo un resultado positivo con hemaglutinación y dos con ELISA para

el mismo antígeno ASC.

En el cuadro 8 se muestra la positividad (igual o mayor de 1:16 en hemaglutinación y 1:128 en ELISA), de los sueros de los pacientes de los seis grupos, para los cuatro antígenos con las dos pruebas. Con la técnica de hemaglutinación se observa que el grupo I el número de casos positivos fué de 5 y dos negativos representando un 71% de positividad al igual que en ELISA. En el grupo II formado por 16 pacientes con hemaglutinación el número de casos positivos fué de 11 (68.75%) y 5 negativos, en ELISA fueron 12 positivos (75%) y 4 negativos. En el grupo III, formado por 12 pacientes, para hemaglutinación el número de casos positivos fué de 9 (75%) y 3 negativos, en cambio en ELISA 12 (100%). En el grupo IV, formado por 3 pacientes, tanto en hemaglutinación como en ELISA se obtuvo un 100% de positividad. En el grupo V constituido por 52 pacientes sospechosos de presentar cisticercosis con hemaglutinación el número de casos positivos fué 25 (48%) y 27 negativos, con ELISA el número de positivos fué de 36 (69%) y 16 negativos. En el grupo VI formado por 10 pacientes sanos, en hemaglutinación solo se encontró un caso positivo (10%) y 9 negativos, en ELISA 2 fueron positivos (20%) y 8 negativos.

La sensibilidad nos indica la frecuencia de resultados positivos de la prueba en pacientes con una enfermedad en particular. El porcentaje de sensibilidad se obtiene de la relación de pacientes enfermos que son correctamente clasificados por la prueba (verdaderos positivos), con los pacientes que estando enfermos son mal clasificados por la prueba (falsos negativos). La sensibilidad se obtuvo a partir del grupo de enfermos (grupo control positivo) de la siguiente manera:

$$\% \text{ de sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

La sensibilidad de una prueba serológica se puede considerar como el porcentaje de positividad.

Existe en la actualidad polémica sobre la definición de especificidad. Algunos autores la consideran como una medida de reacción cruzada que presenta una determinada prueba ya sea con otros antígenos parasitarios o por la intervención de otros factores inespecíficos. También la consideran como la magnitud en el título de anticuerpos. En términos serológicos la especificidad se considera como el porcentaje de negatividad de la prueba en un grupo de individuos sanos, es decir nos determina el número de individuos sanos (verdaderos positivos) que son correctamente clasificados por la prueba, en relación con los individuos sanos mal clasificados como enfermos (falsos positivos). La especificidad se estimó en base al grupo de individuos sanos de la siguiente manera:

$$\% \text{ de especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

En el cuadro 9 se presenta el porcentaje de sensibilidad y especificidad tanto de la prueba de hemaglutinación como de ELISA. En hemaglutinación se obtuvo un 73% de sensibilidad y 90% de especificidad y en ELISA 84% de sensibilidad y 80% de especificidad.

CUADRO 1

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO I.
EN LOS DIFERENTES TITULOS DE DILUCION TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN
ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &						ELISA &					
	2	4	8	16	32	64	32	64	128	256	512	1024
ASC	1		2	1	1	2	1	2	1	1	2	
ASI	1		1	2	1	2	1	2	3		1	
FV		4		2		1	2	1	3			1
ES	1	1	5				2	3	2			
TOTAL	3	5	8	5	2	5	6	8	9	1	3	1

& Reciproco del titulo.

CUADRO 2

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO II, EN LOS DIFERENTES TITULOS TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &							ELISA &							
	4	8	16	32	64	128	256	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
ASC	2	6	1	1	3	1	2	0	3		1	2	1	1	
ASI	1	5	2	2	3	1	2	3	5	2	1	2	3		
FV	2	3	1	2	3	2	3	1	7	2		5	1		
ES	2	7	1	2	3		1	3	5	3	1	1	3		
TOTAL	7	21	5	7	12	4	8	7	25	10	2	9	9	1	1

& Reciproco del título.

CUADRO 3

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO III, EN LOS DIFERENTES TITULOS DE DILUCION TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &								ELISA &								
	2	4	8	16	32	64	128	256	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
ASC	1	3	1	1	3	1	1	1	1	3	1	4	2	1			
ASI	2	3	1	1	2	2	1		5	2	4						1
FV	2	2		3	1	1	3	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
ES	2	5		2	2		1		1	4	3	2	2				
TOTAL	1	9	11	2	9	6	4	6	1	8	11	10	7	6	2	1	2

& Recíproco del título.

CUADRO 4

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO IV, EN LOS DIFERENTES TITULOS DE DILUCION, TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &							ELISA &					
	2	4	8	16	32	64	128	32	64	128	256	512	1024
ASC		1		1	1						1		2
ASI			1		1	1			1	2			
FV					1		2			1	1	1	
ES		1	1		1					1			2
TOTAL		2	2	1	4	1	2		1	4	2	1	4

& Reciproco del titulo.

CUADRO 5

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS 52 SUEROS DE LOS PACIENTES DEL GRUPO V (SOSPECHOSOS DE CISTICERCOSIS), EN LOS DIFERENTES TITULOS DE DILUCION, TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &								ELISA &										
	2	4	8	16	32	64	128	256	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
ASC	4	18	13	9	3	5								5	19	12	10	5	1
ASI	1	8	25	7	6	3	1	1			1	2	17	16	9	5	1	1	
FV	2	6	20	9	6	6	2	1	2		3	9	16	9	8	3	1	1	
ES	8	10	18	11	3	2					1	10	19	14	4	4			
TOTAL	15	42	76	36	18	16	3	2	2	0	2	5	41	70	44	27	13	3	1

& Recíproco del título.

CUADRO 6

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS 10 SUEROS DEL GRUPO VI (INDIVIDUOS SANOS), EN LOS DIFERENTES TITULOS DE DILUCION, TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

ANTI GENO	HEMAGLUTINACION &					ELISA &					
	2	4	8	16	32	4	8	16	32	64	128
ASC	4	5		1			4	4			2
ASI	8	2				1	5	4			
FV	7	3				1	4	4	1		
ES	6	4				2	5	3			
TOTAL	25	14	0	1	0	4	18	15	1		2

& Reciproco del título.

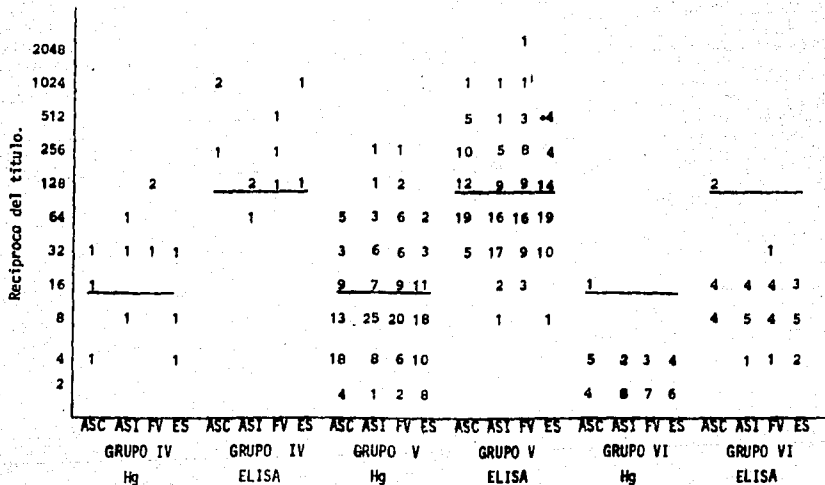
GRAFICA 1

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS DE LOS PACIENTES DE LOS GRUPOS I, II, Y III, EN HEMAGLUTINACION Y ELISA CON LOS DIFERENTES ANTIGENOS.

Reciproco del titulo.	GRUPO I				GRUPO I				GRUPO II				GRUPO II				GRUPO III				GRUPO III			
	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES
8192																							1	1
4096													1											1
2048													1								1		1	
1024							1						2	3	1	3					2	2	2	2
512					2	1							1	2	5	1					4	1	2	
256					1				2	2	3	1	1	1			1	3	1		1	4	2	3
128					<u>1</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	1	2		<u>3</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	1	2	1		<u>3</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>4</u>
64	2	2	1		2	2	1	3	3	3	3	3	8	5	7	5	1	2	1	2	1	5	1	1
32	1	1			1	1	2	2	1	2	2	2		3	1	3	3	1	3	2				1
16	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>2</u>						<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>1</u>					<u>1</u>	<u>1</u>						
8	2	1		5					6	5	3	7					1	3	2	5				
4			4	1					2	1	2	2					3	2	2	2				
2	1	1		1													1							

GRAFICA 2

FRECUENCIA CON QUE SE PRESENTARON LOS SUEROS DE LOS PACIENTES DE LOS GRUPOS IV, V Y VI, EN HEMAGLUTINACION Y ELISA CON LOS DIFERENTES ANTIGENOS.



CUADRO 7

FRECUENCIA DE POSITIVIDAD DE LOS SUEROS A CADA UNO DE LOS ANTIGENOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA

Antígeno	HEMAGLUTINACION				ELISA			
	ASC	ASI	FV	ES	ASC	ASI	FV	ES
GRUPO								
I	4	5	3	0	4	4	4	2
II	8	10	11	7	8	8	8	8
III	7	7	8	5	11	7	10	11
IV	2	2	3	1	3	2	3	2
<u>TOTAL</u>	21	24	25	13	26	21	25	23
V	17	18	24	16	28	16	22	22
VI	1				2			

CUADRO 8

PORCIENTO DE POSITIVIDAD DE SUEROS DE LOS PACIENTES EN
LOS DIFERENTES GRUPOS, AL USAR CUATRO ANTIGENOS DIFEREN
TES TANTO EN HEMAGLUTINACION COMO EN ELISA.

GRUPO	HEMAGLUTINACION		ELISA	
	Nº de casos (+)	%	Nº de casos (+)	%
I	7/5	71	7/5	71
II	16/11	68.8	16/12	75
III	12/9	75	12/12	100
IV	3/3	100	3/3	100
V	52/25	48	52/36	69
VI	10/1	10	10/2	20

Hg (+) = 1:16

ELISA (+) = 1:128

CUADRO 9

PORCIENTO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EN LAS
PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION Y ELISA.

	<u>HEMAGLUTINACION</u>	<u>ELISA</u>
SENSIBILIDAD	73 %	84 %
ESPECIFICIDAD	90 %	80 %

V DISCUSION Y CONCLUSION.

En el presente estudio la técnica de ELISA mostró una sensibilidad del 84% utilizando cuatro antígenos de cisticercos, en el grupo de 38 pacientes cisticercosos diagnosticados por TAC o por cirugía, en cambio la prueba de hemaglutinación indirecta presentó 73%, por lo tanto se encontró mayor sensibilidad con la técnica de ELISA que con la hemaglutinación indirecta.

En cuanto a la especificidad de la prueba encontramos en hemaglutinación 90%, lo cual representa un 10% de falsas positivas, es decir pacientes "sanos" que son mal diagnosticados por la prueba. En ELISA se encontró un 80% de especificidad y por lo tanto un 20% de falsas positivas. Sin embargo aunque la hemaglutinación es más específica la sensibilidad es menor en comparación con ELISA que es más sensible pero menos específica.

En relación a los resultados obtenidos con los diferentes antígenos utilizados en ELISA se obtuvieron mejores resultados con el antígeno FV, ASC y en menor grado con ES y ASI. En cambio con hemaglutinación los mejores resultados fueron con FV siguiendo en importancia ASI, ASC y ES. De acuerdo a estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando únicamente la técnica de hemaglutinación, se ha podido observar que la positividad hacia cualquiera de los antígenos depende del estado de viabilidad del cisticercos; ya que cuando el o los cisticercos se encuentran aun vivos se presenta una mayor positividad hacia los antígenos (ES y FV) en cambio cuando el cisticercos ya está muerto la positividad es mayor contra los antígenos (ASC y ASI). Este hecho puede explicar el por que se obtuvieron diferentes porcentajes de positividad con los distintos antígenos utilizados tanto en ELISA como en hemaglutinación.

También se observaron diferencias en la positividad entre los diferentes grupos estudiados lo cual puede deberse a varios factores como son: La respuesta inmune de cada paciente contra el parásito. El número de cisticercos presentes en el individuo. La viabilidad del parásito y su localización,

dando como resultado una respuesta heterogénea contra el parásito. Por lo anteriormente mencionado no se encontró relación entre la localización del parásito, el cuadro clínico del paciente y el título de anticuerpos detectados por ambas pruebas, ya que algunos pacientes presentaron títulos positivos no tan altos, en cambio otros presentaron títulos muy altos contra uno o varios antígenos.

En relación al grupo de sospechosos, en hemaglutinación solo se obtuvo un 48% de positividad y en ELISA un 69%. En este grupo no se confirmó si alguno de estos pacientes era realmente cisticercoso ya que el diagnóstico solo se basó en estudios clínico.

Los resultados obtenidos en este trabajo en comparación con los de otros grupos de investigación, presentan cierta discrepancia, tales como: Arambulo y cols.(1976), encuentran 77.5% de positividad en ELISA y en hemaglutinación 73.4%, probando sueros de pacientes sospechosos de presentar cisticercosis. Diwan y cols.(1982), reportan 79% de positividad en sueros y 80% en LCR de pacientes mexicanos unicamente por ELISA. Espinoza y cols.(1982), en ELISA utilizando sueros encuentran 73% de positividad y en LCR 85%. Tellez-Giron y cols.(1984), determinaron un 100% de positividad en ELISA tanto en suero como en LCR y en hemaglutinación 71% para LCR y 79% en suero. Mohammad y cols.(1984), reportan sensibilidad del 89.5% en ELISA utilizando suero y especificidad del 100%, en cambio en LCR 94.7% tanto de sensibilidad como de especificidad. Larralde y cols.(1986) reportan resultados positivos tanto en hemaglutinación como en ELISA del 95% de muestras de sueros tanto de individuos probables de presentar cisticercosis como de confirmados procedentes de áreas no endémicas, en cambio en áreas endémicas obtuvieron 91% de positividad en hemaglutinación y 80% en ELISA; en un grupo de sospechosos reporta el 70% de positividad para hemaglutinación y 50% para ELISA. De acuerdo a los trabajos anteriores, el promedio general de positividad tanto en hemaglutinación como en ELISA varía entre el 73% al 100% en los casos confirmados, utilizando tanto suero como LCR.

Una explicación que podemos dar a la variación de resultados en los diferentes trabajos es la gran variación que existe en la elaboración de antígenos utilizados, ya que en los distintos trabajos se utilizan tanto antígenos crudos, semicrudos o parcialmente purificados como es el caso del antígeno B, sin embargo, los resultados obtenidos con este último antígeno no incrementa notablemente la sensibilidad de la prueba como era de esperarse, ya que se reporta mayor sensibilidad con antígenos crudos y semicrudos (deslipidizados) como son los antígenos utilizados en este y otros trabajos. Otra explicación es la utilización de diferentes variantes en la técnica de ELISA. Además de las diferentes técnicas de obtención de antígenos y por tanto de los antígenos utilizados en los diferentes trabajos. Es importante señalar que se han reportado variaciones antigénicas entre cada larva de cisticerco, Yakoleff y cols.(1982) y Correa y cols.(1987), dando como resultado que cada lote de antígeno producido tenga características antigénicas diferentes, lo cual puede contribuir a tratar de explicar los diferentes resultados obtenidos.

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que apesar de que la técnica de hemaglutinación presenta menor sensibilidad que ELISA, ésta diferencia no es tan grande, por lo que la hemaglutinación es una prueba que debe seguir siendo utilizada como prueba diagnóstica de rutina, ya que si bien la técnica de ELISA es mas sensible, su costo es mayor, debido al empleo de reactivos que son de importación, lo cual no sucede con la hemaglutinación.

Sin embargo es posible incrementar aun mas la sensibilidad de estas técnicas diagnósticas, tratando de mejorar los antígenos utilizados en estas pruebas.

VI BIBLIOGRAFIA

Alarcon,G.T y Olivares,L. Cisticercosis cerebral. Rev.invest.clin.(Mex) . 1975; 27 : 209-215.

Albores, S.J. y Altamirano,D.M. Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el Hos.Gen. de Mex. Rev. Invest.Sal.Publ. 1971 ; 31 :- 1-10 .

Aluja,A.S. Frequency of porcine Cysticercosis in Mexico.In:Flisser,A. et al. Cysticercosis:Present state of knowledge and perspective. N.Y.Acad. - Press. 1982; 53-62.

Alvarez,CH.R.Gaytan,B.E.y De Leon,B.Cisticercosis cutánea.Bol.Med.Hosp. - Inf.Mex. 1975; 32: 1115-1122.

Ambroise-Thomas,P.Daveau.C . and Desgeorges,P.T. Serodiagnosis of Onchocercosis using Micro ELISA.Study immunofluorescence. Bull.Soc.Pathol.Exot. 1980; 73: 430-442.

Ambroise-Thomas,P. et Desgeorges,P.T.Diagnostic-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée.Bull.Org.Mun.de la Santé.1978; 56; 609-613.

Arambulo,P.V.Walls,K.W.Bullock,S.and Kagan,I.G.Serodiagnosis of Human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA).Act.-Trop. 1978; 35; 63-67.

Beltrán,H.F.Gómez, P.A. y Figueroa,V.V.Immunological characterization of antigenic fractions of Trichinella spiralis larvae.Trichinellosis,Edited by Charles,W.K. Intext Educational publisher.N.Y. 1974; 175-186.

Biagi, F. y Briceño, C. Diferencias entre Cysticercus cellulosae y Cysticercus racemosus. Rev. Biol. Trop. 1961; 9 : 141-151.

Biagi, F., Navarrete, F., Píña, A., Santiago, A. M. y Tapia, L. Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. Rev. Med. Hosp. Gen. Mex. 1961; 25; 501-508.

Biagi, F. and Tay, J. A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1964; 7; 63-65.

Bos, H. J., Schouten, J., Noordpool, H., Marbín, M. and Oostburg, F. A seroepidemiological study of amebiasis in Surinam by ELISA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1980; 20; 358 - 363.

Boyden, S. V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med. 1951; 93: 107-120.

Briceño, C., Biagi, F. y Martínez, B. Cisticercosis. Observación sobre 97 casos de autopsias. Prem. Med. Mex. 1961; 26: 193-197.

Cardenas, R. L. Patología de las lesiones oculares causadas por algunos parásitos. Rev. Fac. Med. Mex. 1969; 12: 351-358.

Castañon, O. L. R. Detección de antígeno de Cysticercus cellulosae en líquido cefaloraquídeo, mediante IgG acoplada a latex. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. 1986.

Coltorti, A. E. Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human Hydatidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1986; 35: 1000-1005.

Correa, D. Dalma, D. Espinoza, B. Plancarte, A. Rabiela, M. T. Madrazo, I. Gorodezky, C. and Flisser, A. Heterogeneity of Taenia solium obtained from different naturally infected pigs. *J. Parasitol.* 1987; 73: 443-445.

Costero, I. Tratado de Anatomía Patológica. Ed. Atlante, S.A. México. 1946; 2 ; -1485.

Díaz, A. Lacllette, J. P. Willms, K. y Mancilla, R. Demostración de IgG porcina - en la superficie externa del cisticerco de Taenia solium. Memorias del XV-Congreso de Bioquímica. Morelia, México. 1984.

Diwan, R. A. Coker-Vann, M. Brown, P. Subianto, D. Yolken, R. Desowitz, R. Escobar, A. - Gibbs, C. J. and Gajdusek, C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for - the detection of antibody to cysticerci of Taenia solium. *Am. J. Trop. Med. - Hyg.* 1982; 31: 364-369.

Envall, E. and Perlmann. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemis- try.* 1972; 8: 871-874.

Escobar, A. Algunos datos pertinentes a la cisticercosis cerebral. *Rev. Fac. Med. Mex.* 1977; 20: 26-30.

Espinoza, B. Flisser, A. Plancarte and Larralde, C. Immunodiagnosis of human - cysticercosis; ELISA and Immunoelectrophoresis. In: Flisser, A, et al. *Cysti- cercosis: present state of knowledge and perspective.* N.Y. Acad. Press. 1982; -163-170.

Flisser, A. Tarrab, R. Willms, K y Larralde, C. Immunoelectroforésis y doble in- munodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. Med. Mex.* 1975; 6: 1-12.

Flisser, A. Immunología de la cisticercosis humana. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. 1978.

Flisser, A. Woodhouse, E. and Larralde, C. Human Cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. 1980; 39: 27-37.

Goldsmith, R.S. Kagan, I.G. Reyes, G. y Cedeño, F. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca México. I. Encuesta de enfermedades parasitarias mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. of. Sanit. Panam. 1971; 71: 500-518.

González-Angulo, A. La cisticercosis en México; III. Patología de la cisticercosis. Gac. Med. Mex. 1984; 120: 315-318.

González-Barranco, D. Sandoval y Trujillo. Reacción de inmunofluorescencia directa en la cisticercosis. Arch. Invest. Med. Mex. 1978; 9: 51-58.

González-Barranco, D. Zedillo, M.G y Pérez, G.M. Perfil enzimático de la vesícula de *Cysticercus cellulosae*. Memorias del V Congreso Nacional de Parasitología. Puebla. México. 1982.

Gottstein, B. Tsang, C.W. and Schantz, P.M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1986; 35: 308-313.

Grau, E. Garrido, F. and Cañedo, L. Calcification of the Cysticercus of *Taenia solium* in the human brain. In: Flisser, A. et al. Cysticercosis: present state of knowledge and perspective. N.Y. Acad. Press. 1982; 449-513.

Guerra, G. Flisser, A. Cañedo, L. and Laclette, J.P. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticercus de *Taenia so* -

lium. In: Flisser, A. et al. Cysticercosis: present state of knowledge and - perspective. N.Y. Acad. Press. 1982; 437-454.

Guisantes, J.A. Rubio, F.M. y Díaz. Aplicación de un método inmunoenzimático- (ELISA) al diagnóstico de la hidatidosis humana. Bol. of Sanit. Panam. 1981; 90: 160-168.

Janitschke, K.A. El-Kalouby, R.A. Braun-Monzinger, H. El-Baz. & Mohmoud, M. Evaluation of the ELISA test as an epidemiological in Schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1981; 84: 147-154.

Laclette, J.P. Merchant, T.M. and Willms, K. Histological and ultraestructural localization of antigen B in the metacestode of Taenia solium. J. Parasitology. 1987; 73: 121-129.

Landa, A. Merchant, M.T. Willms, K. y Laclette, J.P. Purificación, caracterización y localización de las glicoproteínas tegumentales del cisticerco de - Taenia solium. Memorias del XV Congreso Nacional de Bioquímica. Morelia, México. 1984.

Larraalde, C. Martínez, Z.G. Lagunoff, D. Ludonyke, R. Montoya, R.M. Goodsaid, F. Dreyfus. G. Sciutto, E. Covezensky, T. Diaz. M.L. Porphyrin content of the cysticercos of Taenia solium. J. Parasitology. 1986; 72: 569-577.

Larraalde, C. Laclette, J.P. Owen, CH. S. Madrazo, I. Sandoval, M. Bojalil, R. Sciutto. E. Contreras, L. Arzate, J. Diaz. M.L. Govezensky, T. Montoya, R.M. and Goodsaid, F. Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst fluid: ELISA and hemagglutination tests. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1986; 35: 965-973.

Lombardo, L. y Mateos, J.H. Cerebral cysticercosis in Mexico. Neurology. 1961; 11: 824-828.

- Lombardo, L. La cisticercosis cerebral en México. *Gac. Med. Mex.* 1982; 118: 1-16.
- López-Martínez, R. Nájera, O.O. y Macotela, R.E. Cisticercosis cutánea. *Pren. Med. Mex.* 1974; 39: 1-4.
- Lowry, O.H. Rosebrough, J.N. Farr, A.L. Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Lumsden, D.R. Parasitology Review: Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp. Parasitol.* 1975; 37: 267-339.
- Mahajan, R.C. Geographical distribution of cysticercosis. In: Flisser, A. et al. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspective.* N.Y. Acad. Press. 1982; 39-46.
- Mohammad, N. I. Heiner, C.D. Miller, B.L. Goldberg, M.A. and Kagan, I.G. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 775-779.
- Marquez-Monter, H. Cysticercosis in: Pathology of protozoal and helminthic diseases. Marcial-Rojas et al Eds. Baltimore. 1971: 595-610.
- Martínez-Zedillo, G. González, B.D. Pérez, G.M. González, A.A. Cholinesterase of Cysticercus cellulosae. In: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspective.* N.Y. Acad. Press. 1982: 413-422.
- Mateos, J.H. Cisticercosis cerebral como problema de salud pública. *Gac. Med. Mex.* 1972; 103: 225-227.
- Mazzotti, L. Incidencia de Cysticercus cellulosae en cerdos de diferentes -

localidades de la República Mexicana. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. 1954; 14: 53-54.

Miller, B.M. Goldgerg, A.M. Heiner, D. Myers, A. Goldberg, A.A. A new immunologic test for CNS cysticercosis. Neurology. 1984; 34: 695-697.

Nieto, D. Diagnóstico de la cisticercosis del sistema nervioso. Pren. Med - Mex. 1949; 13: 226-230.

Nieto, D. Cysticercosis of the nervous system diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology. 1956; 6: 725-738.

Nieto, D. Historical notes on cysticercosis. In Flisser, A. et al. Cysticercosis: present state of knowledge and perspective. N.Y. Acad. Press. 1982: 1-10.

Olivé, I.J. and Angulo, R.P. Cysticercosis of the Nervous system. J. Neurosurg. 1962; 19: 632- 638.

Piñacarte, A. Flisser, A. and Larralde, C. Fibronectinlike properties of antigen B from cysticerci of Taenia solium. In: Cysticercosis: present state of knowledge and perspective. N.Y. Acad. Press. 1982: 453-464.

Proctor, E.M. Powell, S.J. and Elsdon, D.R. The serological diagnosis of cysticercus. Ann. Trop. Med. Parasit. 1966; 60: 146-152.

Rabiela, M.T. Rivas, H.A. y Rodriguez, J. Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. Patología (Mex). 1979; 17: 119-125.

Ramírez-Bon, E. Merchant, M.T. Gonzalez-del Piiego, M. Cañedo, L. Ultrastructure of the bladder wall of Metacystode of Taenia solium. In: Flisser, A. et al. Cysticercosis: present state of knowledge and perspective. N.Y. Acad. Press. - 1982: 261-280.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Robles, C. Consideraciones a cerca de 100 casos de tumor cerebral operados. *Pren. Med. Mex.* 1944; 9 : 67-68.

Romero, C.E. Frecuencia de anticuerpos séricos anti-Cysticercus cellulosae por inmunoelectroforésis en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Ecatepec. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. 1980.

Ruitenberg, E.J. Brosi, B.J. Steerenberg, P.A. Direct measurement of microplantes and application to enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Clin. Microbiol.* 1976; 3: 541-550.

Ruitenberg, E.J. Steerenberg, P.A. and Brosi, B.J. Micro-system for the application of ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections. *Medikon. Ned.* 1975; 4: 30-31.

Ruitenberg, E.J. Capron, A. Bout, D. and Van-Kanapen, F. Enzyme immunoassay for the serodiagnosis of parasitic infections. *Biomedicine.* 1977; 26: 311-314.

Rydzewski, A.K. Chisholm, E.S. and Kagan, I.G. Comparación of serologic test for human cysticercosis by indirect hemagglutination indirect immunofluorescent antibody and precipitation test. *J. Parasit.* 1975; 61: 154-155.

Shanley, D.J. and Jordan, C.M. Clinical aspects of CNS cysticercosis. *Arch. Inter. Med.* 1980; 140: 1309-1313.

Slais, J. morphology of the scolex of Cysticercus cellulosae in brain cysticercosis. In: Flisser, A. et al. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspective.* N.Y. Acad. Press. 1982: 235-279.

Soulé, C. Clia cysticercose bovine experimental. Aspects parasitologique, immunologique et hematologique. Revue. Med. Vet. 1976; 122: 1247-1357.

Tay, J. Lara, A. Velasco, C. O. Gutiérrez, Q. M. Parasitología Médica. Fco. Méndez - Cervantes Ed. México. 1985; 216-226.

Tellez-Girón, E. Ramos, M. C. Dufour, L. y Montante, M. Aplicación del método - ELISA para el diagnóstico de la cisticercosis. Bol. of Sanit Panam. 1984; 97: 8-13.

Torres-Blanco, A. and Toledo, I. The isolation, purification, and characterization of the collagen of Cysticercus cellulosae. J. Biol. Chem. 1981; 256: 5926.

Tuller, E. F. and Keiding, N. R. Determination of protein bound carbohydrates - by the anthrone reaction. Effect of tryptophan. Anal. Chem. 1954; 26: 875-881.

Van Weemen, B. K. and Schrs, A. H. Immunossay using antigen enzyme conjugates. Federation of European Biochemical societies letters. 1971; 15: 232.

Velasco, C. O. Guzmán, C. Romero, R. y Gutiérrez, Q. M. Comparación de una técnica de detección de antígenos solubles de Cysticercus cellulosae. Sal. Publ. Mex. 1983; 25: 205-208.

Villanueva, D. y González-Barranco, D. Aplicación de la prueba de hemaglutinación indirecta en la cisticercosis humana. Rev. Med. Hosp. Gen. Mex. 1980; 43: 253-256.

Voller, A. Draper, C. Bidwell, D. and Bartlett, A. Microplate enzyme linked immunosorbent assay for Chagas disease. Lancet. 1975; 1426-1427.

Voller, A. Bartlett, A. Bidwell, D. Enzyme immunoassay for parasitic diseases. - Trns. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1976; 70: 98-106.

Voller, A. Bartlett, A. and Bidwell, D. Enzyme immunoassay special reference to ELISA technique. J. Clin. Pathol. 1978; 31: 507-520.

Wall, M. K. and Kenneth, P. D. Procedural guide for ELISA microtitration test. - Center Diseases control Atlanta, Georgia.. (Manual). 1977.

Willms, K. and Arcos, L. Taenia solium: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp - Parasitol. 1977; 43: 396-406.

Willms, K. and Merchant, M. T. The inflammatory reaction surrounding Taenia solium larvae in pig muscle: ultrastructural and light and microscopic observations. Parasite immunol. 1980; 2: 261-275.

Yakoleff-Greenhouse, V. Flisser, A. Sierra, A. and Larralde, C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of Taenia solium. J. Parasitol. 1982; 68: 39-47.

Zavala, V. J. Bolio, C. A. y Suárez, H. G. Cisticercosis por Cysticercus racemosus de localización muscular. Patología (Mex) 1984; 22: 99-103.

Zenteno, A. G. Observaciones sobre la cisticercosis humana. Rev. Fac. Med. Mex. 1961; 3: 617-633.

Zenteno, A. G. Aspectos Neuroquirúrgicos de 2000 enfermos. Rev. Med. Hosp. Gen. Mex. 1965; 28: 515-528.

Zenteno, A. G. Sintomatología de la cisticercosis humana. Rev. Fac. Med. Mex. - 1968; 11: 41-45.

Zenteno, A. G. y Mateos, G. J. Mecanismos de acción del cisticerco en el sistema nervioso del ser humano. Rev. Med. IMSS. (Mex). 1985; 23: 351-352.