

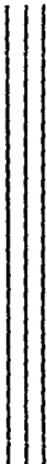
219  
201



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## CAMBIOS INMUNOLOGICOS EN LECHONES INFECTADOS CON HUEVOS DE Taenia solium.



### T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

**Francisco Javier Sierra Romero**

Asesores: M.V.Z. Aline S. de Aluja  
M.V.Z. Ada Nelly Villalobos  
M. C. Agustín Plancarte



México, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1990



## **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.

## RESUMEN

SE INOCULARON 7 LECHONES CON APROXIMADAMENTE 400.000 HUEVOS DE T. SOLIUM CADA UNO POR VIA ORAL. UN LECHÓN SE DEJO COMO TESTIGO. SE ALOJARON EN DOS CORRALES EN LAS -- INSTALACIONES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA, UNAM.

SE TOMARON MUESTRAS DE SANGRE ANTES DE LA INOCULA-  
CIÓN Y LOS DIAS 21, 35, 49, 63, 77 Y 91 POST-INFECCIÓN --  
PARA LA OBTENCION DE SUENO A TODOS LOS ANIMALES. SE TRA-  
BAJARON LOS SUEROS CON LA PRUEBA DE ELISA PARA DETECTAR-  
ANTICUERPOS CONTRA LOS HUEVOS DE T. SOLIUM.

DESPUÉS DE CONCLUIDO EL EXPERIMENTO SE ENCONTRÓ QUE-  
LOS 8 ANIMALES MOSTRARON VALORES NEGATIVOS POR LA PRUEBA  
DE ELISA ANTES DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL. SOLO 6 ANI-  
MALES MOSTHARON AL MENOS UN VALOR POSITIVO. EL CERDO TES-  
TIGO (NO INOCULADO) MOSTRÓ UN VALOR POSITIVO EL DIA 63.

DE LO ANTERIOR SE CONCLUYE QUE LOS LECHONES UTILIZA-  
DOS EN ESTE EXPERIMENTO NO HABÍAN TENIDO CONTACTO CON --  
HUEVOS DE T. SOLIUM. DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN FUE POSI-  
BLE ENCONTRAR ANTICUERPOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE --  
ELISA. LA INMUNIDAD PARA ESTA PARASITOSIS SE PRESENTA --  
DESPUÉS DE LOS 4 MESES DE EDAD O A LOS 2 MESES POST-IN-  
FECCIÓN, LOS LECHONES MÁS PEQUEÑOS NUNCA PRESENTARON VA-  
LORES POSITIVOS LO CUAL SUGIERE UNA POBRE RESPUESTA INMU-  
NE. EL LECHÓN TESTIGO MOSTRÓ UN VALOR POSITIVO PRESUMI-  
BLEMENTE POR EL CONTACTO ÍNTIMO QUE TUVO CON LOS LECHO-  
NES INFECTADOS.

CAMBIOS INMUNOLÓGICOS EN LECHONES INFLUENCIADOS  
CON HUEVOS DE Taenia solium.

INTRODUCCION.

Sinonimia de la Cisticercosis: En la República Mexicana la cisticercosis, por el aspecto que presenta el parásito macroscópicamente, se conoce con diferentes términos: zahuate, grano, granillo, tomate, tomatillo o carne ajitomatada.

Etimología: Laennec, citado por Nieto (17), designa a la enfermedad "cisticercosis" basándose en dos palabras griegas: Kistis (vejiga pequeña) y Enkeles (cola), es decir, una cola contenida en una vejiguita que es el aspecto que presenta un cisticerco a través de una lente de aumento.

Historia: La cisticercosis es una enfermedad muy antigua. Contreras (4) refiere que fue bien conocida por los Griegos, Asirios, Egipcios y Fenicios. Hipócrates (460 a.C.) la describe en su obra "Las Epidemias". Aristófanes en una de sus comedias escrita entre los años 380 y 375 a.C. mencionaba, en boca de uno de sus personajes, la búsqueda de vesículas (que más tarde fueron identificadas como cisticercos) bajo la lengua de un cerdo y se comparó el aspecto de tales vesículas con el granizo (20). Aristóteles en su "Historia de los Animales" hace referencia a las enfermedades del cerdo, a las cuales clasifica en tres tipos. En las del tercer tipo hace una detallada y casi perfecta descripción de la cisticercosis porcina (11). Parolini describe, en 1550, la presencia de pequeñas vesículas blancas con un fluido claro en su interior localizadas en el cuerpo caloso de un hombre que había muerto a consecuencia de ataques epilépticos (1,11) Rucolphi en 1809, clasifica al cisticerco como "cellulosae" debido a su gran afinidad por el tejido conectivo (17). Leuckart en 1856 demostró su ciclo biológico (17). Virchow, Zender y Giesinger aportaron estudios sobre el ciclo biológico del Cisticerco celluloseae (17).

A pesar de que el conocimiento de la enfermedad data de -- tiempos tan lejanos, su erradicación no se ha logrado y causa todavía grandes pérdidas, especialmente en los países llamados "en vías de desarrollo". Costero en 1946 informó una frecuencia de - 3.6% de cisticercos en autopsias realizadas durante 6 años en el Hospital General de la Ciudad de México. (5).

Descripción de la Enfermedad: El metacestodo de la Taenia solium es el agente etiológico de la cisticercosis, y el hombre por albergar tanto a ésta forma como a la adulta es a la vez -- huésped definitivo y huésped intermediario. Una persona portadora de esta tenia elimina proglótidos grávidos en la materia fecal, liberando así huevos que contaminan el medio ambiente. Con bastante frecuencia estos proglótidos son ingeridos por el cerdo - (Huésped intermediario y nunca definitivo) cuando se cria en condiciones de traspatio o cuando tiene acceso a la materia fecal humana contaminada con huevos de T. solium, en él se desarrollarán los cisticercos que se localizarán principalmente en masas musculares y encéfalo. Cuando un ser humano ingiere esta carne infectada, adquiere el cisticerco que al ubicarse en el aparato digestivo se desarrolle hasta la etapa adulta, que es la T. solium o solitaria. Aproximadamente 2 o 3 meses después de la ingestión comienza a eliminar proglótidos grávidos en la materia fecal. (19, 20).

Las inmunoglobulinas de la clase IgG anti-cisticerco, pueden ser detectadas en el suero y líquido cerebrospinal de la mayoría de los pacientes neurocisticercosos, por medio de la prueba de - ELISA (23). Otra clase de anticuerpos se encuentran con menor frecuencia. Las inmunoglobulinas IgG reaccionan con más de 8 antígenos del cisticerco de la T. solium, principalmente con el antígeno B. Este antígeno tiene afinidad por la colágena (9, 10).

Diagnóstico de la Enfermedad: Weinberg en 1909 fué el primero en aplicar una prueba de fijación de complemento en cerdos, utilizando un extracto de cisticerco como antígeno (17). Los - brasileños Pessoa y Silveria usaron la prueba de fijación de complemento en fluido cerebroespinal con buenos resultados, en 1930. (17). En el año 1942 los estudios realizados en líquido cerebroespinal y suero eran ya una prueba rutinaria (15, 16).

Se han hecho muchas investigaciones sobre pruebas serológicas que puedan ser útiles en el diagnóstico de la enfermedad en seres humanos. En cerdos, sin embargo, existen pocos trabajos al respecto (12, 13, 19, 21). En la actualidad las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de esta parasitosis, tanto en el ser humano como en el cerdo, son: fijación de complemento, precipitación en agar, inmunolectroforesis, hemaglutinación indirecta, - ensayos inmunoenzimáticos e inmunolectrotransferencia (6, 12, - 13, 19, 22, 23).

Recientemente las técnicas inmunoenzimáticas como el Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), han tenido amplia aceptación para el diagnóstico de enfermedades tanto infecciosas como endocrinológicas. Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos marcados con enzimas, que ayudan a formular un diagnóstico oportuno y confiable (2, 21, 23). Sin embargo, los estudios realizados hasta ahora no han sido suficientes para esclarecer la respuesta inmunológica que sufren los cerdos en las primeras semanas de infectados, problema de suma importancia para optimizar el inmunodiagnóstico de esta importante enfermedad.

#### HIPOTESIS.

Los cerdos infectados experimentalmente con huevos de T. so lium desarrollarán anticuerpos específicos contra este parásito.

## OBJETIVO.

Realizar pruebas de ELISA para detectar anticuerpos contra larvas de T. solium después de la infección experimental y compararlos con los controles negativos.

## MATERIAL Y METODOS.

### 1) Obtención de los animales:

Se adquirieron 8 lechones destetados de una granja tecnificada, donde no se han encontrado casos de cisticercosis. Se escogieron aleatoriamente de varias razas y ambos sexos. Se alojaron en corrales aislados (dos) dentro de las instalaciones de la Facultad de Veterinaria, UNAM.

### 2) Inoculación:

Después de un periodo de adaptación de 10 días se inocularon 7 animales cada uno con 8 proglóstitos de T. solium por vía oral. Aceptando que cada proglóstito tiene entre 50,000 y 60,000 huevos (19), la cantidad de huevos ingeridos por cada lechón fue entre 400,000 y 480,000. La inoculación se hizo suspendiendo los proglóstitos en solución salina fisiológica y administrándola directamente en la boca del animal. El lechón restante quedó como testigo.

### 3) Toma de Muestras:

La toma de sangre para la obtención de suero se realizó de la vena yugular en todos los animales, en una ocasión antes de la inoculación y seis veces posteriores a ésta, con intervalos de 21, 35, 49, 63, 77 y 91 días. Al finalizar el experimento (13 semanas) se les practicó la eutanasia.

### 4) Técnica de ELISA:

El procedimiento a seguir para la prueba de ELISA fue el descrito por Voller et. al. (24) con ligeras modificaciones; brevemente:

- a) Se incubó cada pozo con 100  $\mu$ l de antígeno a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de buffer de carbonatos<sup>+</sup> durante toda la noche a 4°C.
- b) Al día siguiente se lavó 3x con 200  $\mu$ l de PBS tween-20<sup>+</sup>/pozo reposando 5 minutos cada ocasión.
- c) Se incubó 2 horas a 37°C 100  $\mu$ l/pozo de suero de cerdo diluido 1:10 en PBS-Tween-20. Tanto de los animales experimentales como de los controles negativos.
- d) Se lavó igual que en b).
- e) Se incubó durante 2 horas a 37°C 100  $\mu$ l/pozo de IgG de cáprido anti-IgG de cerdo conjugado con fosfatasa alcalina - diluido 1:1000 con PBS Tween-20.
- f) Se lavó igual que en b).
- g) Se incubó durante 30 min. a 37°C 100  $\mu$ l/Pozo del sustrato (p-nitrofenil fosfato)<sup>+</sup> que se prepara en el buffer antes mencionado para sustrato.
- h) Se hizo la lectura en un espectrofotómetro para placas de - ELISA a 405 nm.

El punto de corte para considerar valores de absorbancia positivos y negativos se obtuvo del promedio de los controles negativos  $\pm$  3 su desviación estandar.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## RESULTADOS.

Por medio de la necropsia se comprobó que los 7 animales inoculados estaban altamente infectados. En el cerdo control no se encontraron cisticercos.

Los sueros obtenidos de los lechones infectados con proglótidios de T. solium, analizados con la prueba de ELISA mostraron lo siguiente: (Figs. 1 y 2)

Las muestras pre-infección fueron negativas con valores de absorbancia a 405 nm no mayores de 0.001.

Con Base en los resultados obtenidos en los sueros de los lechones testigos negativos se obtuvo un punto de corte de 0.146. Los valores arriba de éste punto se consideran positivos.

En las primeras 5 semanas post-infección los valores de absorbancia no variaron significativamente de los iniciales, obteniéndose valores entre 0.00 y 0.086 con promedio de 0.015.

El lechón número 1 mostró en las 7 primeras semanas de infección, valores de absorbancia de 0.00. En la 9a semana elevó sus valores a 0.156 y siguió elevandose hasta 0.179.

El lechón No. 2 tuvo valores de absorbancia de 0.001 -- hasta 0.143. Estos valores aumentaron en cada prueba pero nunca fueron mayores del punto de corte. (0.001, 0.005, 0.0026, 0.063, 0.090, 0.128 y 0.143).

El lechón número 3 obtuvo valores bajos hasta la 9a semana cuando rebasó el punto de corte, después disminuyó en la 11a y volvió a elevarse en la 13a semana.

El lechón número 4 tampoco rebasó la línea de corte, el valor más alto fue de 0.141 en la 9a semana.

El lechón número 5 mostró valores positivos a partir de la 9a semana los que se mantuvieron elevados hasta el final del trabajo.

El lechón número 6 obtuvo valores positivos (0.148) desde la 7a semana y siguieron incrementándose hasta la 13a (0.234). Fig. 2.

El lechón número 7 (control negativo) mostró un solo valor positivo en la 9a semana (0.296) y después disminuyó sus valores de absorbancia para obtener en la 13a semana el valor más bajo al final del trabajo. (0.081). Fig. 2.

El lechón número 8 mostró valores de absorbancia muy bajos hasta la 9a semana. En la 11a obtuvo el valor más alto registrado en el presente trabajo (0.327) disminuyendo ligeramente en la 13a semana (0.289).

En la semana número 13 (última de este trabajo) el lechón número 7 mostró el valor más bajo (0.081) y el lechón número 8 el valor de absorbancia más alto (0.289).

#### DISCUSION:

Los lechones de dos meses de edad que fueron utilizados para el presente trabajo provenían de una granja donde no tuvieron contacto con seres humanos portadores de T. solium o cerdos con cisticercosis y las pruebas de ELISA fueron negativas antes de la infección experimental.

Después de la infección con huevos de T. solium se detectaron anticuerpos en los sueros de los lechones estudiados por medio de la prueba de ELISA (23, 24, 26).

De los ocho animales estudiados cinco presentaron valores de absorbancia positivos a las nueve semanas (incluyendo el lechón testigo). Esto sugiere que el desarrollo de la inmunidad para esta parasitosis se presenta después de los cuatro meses de edad o de los dos meses post-infección.

Dos de los ocho lechones nunca presentaron valores de absorbancia positivos durante las trece semanas que abarcó el -- trabajo, lo cual se puede deber a un pobre respuesta inmune -- por parte de los animales. Cabe señalar que uno de estos anima les era el más pequeño de todos, lo cual sugiere que los lecho nes pequeños además de tardar más tiempo en alcanzar el peso óptimo para el mercado presentan una escasa respuesta inmune a las parasitosis.

El lechón número siete (control) mostró en la novena sema na un valor de absorbancia positivo (0.298) aún cuando no se le infectó experimentalmente y en la necropsia no se detecta-- ron cisticercos. Sin embargo convivió todo el tiempo que duró el experimento con los animales infectados. Esta observación -- es análoga a lo informado en medicina humana, donde se ha vis to que en las familias con portadores de T. solium se encuen-- tra una seropositividad del 50% con respecto a toda la pobla-- ción (6). En otros informes se señala una seropositividad de -- 6.85% a 43% en individuos que viven en una familia con portado res de T. solium. (7).

Serán necesarios estudios posteriores a este respecto, -- tanto en seres humanos como en animales, para poder afirmar -- que los individuos que conviven con portadores de T. solium su fren una infección por el parásito capaz de desarrollar una -- respuesta inmune, y lo mismo de los cerdos sanos que conviven con animales infectados.

ANEXO N° 1

REACTIVOS:

Buffer de Carbonatos:

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.159 g	
$\text{NaHCO}_3$	0.293 g	en 50 ml.
$\text{NaN}_3$	0.020 g	pH 9.6

PBS-TWLEN-20:

$\text{NaCl}$	16 g/2 lit	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4 g	"
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5.8 g	"
$\text{KCl}$	0.4 g	"
$\text{NaN}_3$	0.4 g	" pH 7.2
Tween-20	1 ml	

Buffer de Dietanolamina 10%:

$\text{H}_2\text{O}$	800 ml
$\text{NaN}_3$	0.2 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Dietanolamina	97 ml

Ajustar el pH a 9.8 con HCl 1N.

Guardar a 4°C protegido de la luz.

Preparación del Sustrato:

$\text{H}_2\text{O}$ desionizada	5 ml
Fosfatasa Alcalina	20 ml
buffer Dietanolamina	15 ml

Debe estar a temperatura ambiente y prepararse inmediatamente antes de agregarse a los pozos.

## ELISA EN SUEROS DE CERDO INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE

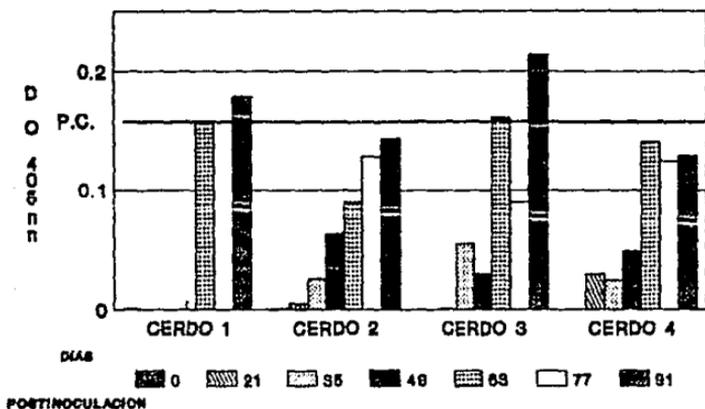


Fig. 1. Valores de absorbancia por ELISA en 4 diferentes cerdos empleados para evaluar la respuesta por anticuerpos séricos al inocularlos con 400,000 huevecillos de *T. solium*.

P.C. = Punto de Corte =  $\bar{X} + 3$  D.S. de los valores de absorbancia obtenidos de 8 cerdos que estuvieron libres de la infección.

## ELISA EN SUEROS DE CERDO INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE

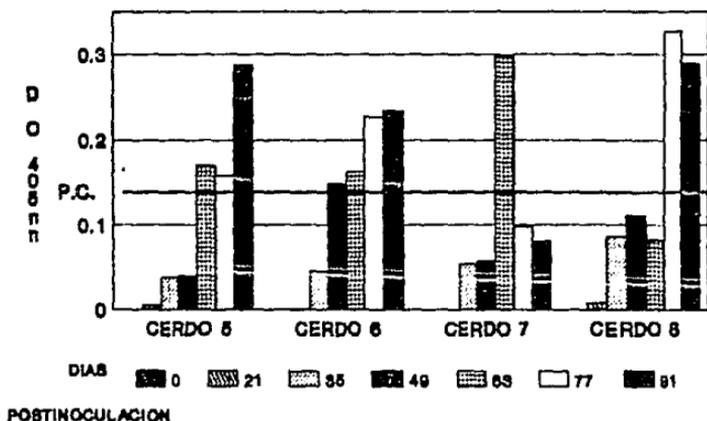


Fig. 2. Valores de absorbancia por ELISA en 4 diferentes cerdos empleados para evaluar la respuesta por anticuerpos séricos al inocularlos con 400,000 huevecillos de *T. solium*.

P.C. = Punto de Corte =  $\bar{X} + 3$  D.S. de los valores de absorbancia obtenidos de 8 cerdos que estuvieron libres de la infección.

## LITERATURA CITADA.

- 1.- Banks, M.: Detection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by Elisa disc. J. Virological Methods. 8: 7-23 (1985).
- 2.- Behymer, D., Ruppenar, R., Brooks, D., Williams, J. and Pranti, C.: Enzyme immunoassay for surveillance of Q fever. Am. J. Vet. Res. 46: 2414-2417 (1985).
- 7.- Blanchart, E.: La Cisticercosis Porcina como Problema de Salud Pública en la Ciudad de Texcoco, Estado de México y Zonas Aledañas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM México, D. F., 1974.
- 4.- Contreras, E.: Cisticercosis del Cerdo y Ciclo Evolutivo. Tesis de Licenciatura. Esc. Mac. Med. Vet. UNAM México, D. F., 1919.
- 5.- Costero, I.: Tratado de Anatomía Patológica. Vol II. Atlas te México, D. F., 1946.
- 6.- Díaz, C., Ruiz, F., Perez, S., Ramos, Z., Medina, F., Iozano, K. y Williams, K.: Epidemiología de triacis/cisticercosis en una comunidad del estado de Sinaloa. En: Cisticercosis Humana y Porcina. Ed. Limusa México, D.F. (1989).
- 7.- Díaz, C., Ruiz, D., Beltrán, V. and Williams, K.: Serology as an indicator of T. solium infection in a rural community of México. Submitted for publication. Trans Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 1990.
- 8.- Espinoza, B., Ruiz-Palacio, G., Tovar, A., Godoy, P., Flancarte, A. and Blisser, A.: Characterization by Fluorescein-labeled immunoserbert assay of the immune response in patients -

with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 24:536-541. (1986).

9.- Flisser, A.: Inmunología de la cisticercosis humana. Bol. Est. Med. Biol. 32:143-176. (1983).

10.- Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A. and Correa, A.: Host-Parasite relationship in Cysticercosis: immunologic study different compartments of the host. Vet. Parasit. 20:95-102. (1982).

11.- Flisser, A., Gemmell, M., Larralde, C., Machnicka, B., Mahaja, R., Mann, L., Mantovani, A., Matyas, A., Frokopic, J., Kosick, B., Smyth, D. and Soulsby, E.: Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Teniasis-Cysticercosis. -- World Health Organization, Geneva, Suiza, 1982.

12.- Gutierrez, R.: Determinación de Anticuerpos Séricos por Inmunolectroforesis en Cerdos Infectados con Cysticercus cellulosae. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. - UNAM, México, D.F. 1981.

13.- Inclán, M.: Comparación de la Técnica de Inspección Sanitaria e Inmunolectroforesis en el Diagnóstico de la Cisticercosis Porcina. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F. 1981.

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

15.- Nieto, D.: Sobre la histopatología de la cisticercosis cerebral. Bol. Est. Med. Biol. 2:73. (1943).

- 16.- Nieto, D.: Diagnóstico de la cisticercosis del sistema -- nervioso. Archivos de Neurología y Psiquiatría de México. -- 9:179. (1946).
- 17.- Nieto, D.: Historical notes on cysticercosis, En: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Edited by: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J., Larralde, C., and - Beltran, F. pp 1-7. Academic Press. New York, 1982.
- 18.- Quiroz, H.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Limusa. México, D.F. (1986).
- 19.- Rodríguez, E.: Estudio de Dos Reacciones Serológicas para el Diagnóstico de la Cisticercosis Porcina por Cysticercus cellulosae. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. - UNAM. México, D.F. 1969.
- 20.- Smyth, J.: The Biology of Cestode Life Cycles. Common- - wealth Agricultural Bureau. New York. (1963).
- 21.- Solís, E.: Inmuno-diagnóstico de la Cisticercosis Porcina por ELISA, Evaluando el Papel Filtro como Contenedor de Sangre. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, D.F. 1988.
- 22.- Speiser, P.: Serodiagnosis of tissue dwelling parasites: Application of a Multi-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent -- Assay (ELISA) for Screening. Ann. Soc. Belge. Trop. 62:103-120. (1982).
- 23.- Tsang, V., Brand, J. and Boyer, A.: An enzyme-linked immu noelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for -- diagnosing human cysticercosis (Taenia solium) J. Infect. Dis. 159:50-59. (1989).

24.- Voller, A., Bidwell, D. and Barlett, A.: Enzyme Immuno--  
assay in Diagnostic Medicine. Bull. WHO. 53:55-56. (1976).

25.- Willms, K. and Arcos, I.: Taenia solium: Host serum pro-  
teins on the cysticercus surface identified by an ultrastruc-  
tural immunoenzyme technique. Exper. Paras. 43:396-406. (1977)