



11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUT
DE MEXICO

2
2ej
FACULTAD DE MEDICINA

DETECCION DE ANTIGENOS DE Taenia solium EN
HECES POR UN METODO INMUNOENZIMATICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para Obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA INMUNOLOGIA

P r e s e n t a :

QFB Guillermina Avila Ramírez



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	1
1.	MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA	2
2.	ASPECTOS CLINICOS	6
2.1.	Teniasis	6
2.2.	Cisticercosis	7
3.	INMUNOLOGIA	9
4.	EPIDEMIOLOGIA	14
5.	DIAGNOSTICO	18
5.1.	Teniasis	18
5.2.	Cisticercosis humana	19
5.3.	Cisticercosis porcina	21
6.	TRATAMIENTO	22
7.	CONTROL	24
II.	ANTECEDENTES	26
III.	HIPOTESIS	33
IV.	OBJETIVOS	33
V.	MATERIALES Y METODOS	34
1.	BTENCION DEL MODELO EXPERIMENTAL DE TENIASIS POR <u>T. solium</u> EN EL HAMSTER DORADO	34
1.1	Obtención de cisticercos de <u>T. solium</u>	34
1.2	Infección experimental del hamster dorado y administración de esteroides	35
1.3	Grupos experimentales y protocolo de infección en el modelo teniasis-hamster dorado.	35
1.4	Obtención del estadio adulto de <u>T. solium</u> .	38
2.	ESTANDARIZACION Y EVALUACION DEL ENSAYO INMUNO- ENZIMATICO PARA LA DETECCION DE COPROANTIGENOS DE <u>T. solium</u> EN HAMSTERS DORADOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE	39
2.1	Elaboración del antígeno de <u>T. solium</u>	39
2.2	Obtención de otros parásitos	40
2.3	Obtención de suero policlonal anti- <u>T. solium</u>	40

2.3.1	ELISA para la determinación de anticuerpos anti- <u>T. solium</u> en suero de conejo hiperinmune	41
2.4	Obtención de IgG de conejo anti- <u>T. solium</u>	43
2.4.1	Preparación del conjugado de IgG anti- <u>T. solium</u> con biotina	43
2.5	Toma de muestras de heces en el modelo experimental	44
2.6	Procesamiento de las muestras de heces para el ELISA	45
2.7	Estandarización del ELISA para detección de antígenos de <u>T. solium</u> en heces de hamster	46
2.7.1	Determinación del criterio de positividad en la prueba de ELISA	48
2.8	Captura de antígenos heterólogos de parásitos con el sistema de anticuerpos policlonales anti- <u>T. solium</u>	48
2.9	Evaluación del número y tamaño de las tenias y su relación con la presencia de antígenos en el ELISA	49
2.10	Especificidad del ELISA para detección de antígenos de <u>T. solium</u>	49
2.11	Efecto de la desparasitación en el ensayo de detección de antígenos	50
3.	APLICACION Y EVALUACION DEL ENSAYO INMUNO-ENZIMATICO EN LA DETERMINACION DE ANTIGENOS DE <u>T. solium</u> EN EL SER HUMANO	50
3.1	Toma de muestras en el hospedero definitivo	51
3.2	ELISA para la detección de antígenos en heces humanas	51
3.3	Sensibilidad y especificidad del ELISA para detección de antígenos de <u>T. solium</u> en el ser humano	52
4.	ANALISIS ESTADISTICO	52
VI.	RESULTADOS	55
1.	OBTENCION DEL MODELO EXPERIMENTAL	55
1.1	Susceptibilidad de los hamsters a la infección	55
1.2	Efecto del tratamiento con esteroides en la obtención del modelo experimental	55
1.3	Viabilidad de los cisticercos usados en las infecciones	58
1.4	Tenias obtenidas en el modelo experimental del hamster dorado	59

2.	ESTANDARIZACION Y EVALUACION DEL ELISA PARA LA DETECCION DE COPROANTIGENOS DE <u>T. solium</u> EN HAMSTERS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE	63
2.1	Estandarización del ensayo	63
2.2	Capacidad del ELISA para detectar concentraciones conocidas de antígeno en solución y en sobrenadantes de heces	67
2.3	Dinámica de la detección de antígenos en el modelo experimental	69
2.3.1	Infecciones con dos dosis del esteroide (Grupo III)	71
2.3.2	Infecciones con dosis única del esteroide (Grupo IV)	73
2.3.3	Infecciones sin esteroides (Grupo V)	76
2.4	Captura de antígenos heterólogos de parásitos por medio del ELISA para <u>T. solium</u>	80
2.5	Evaluación del número y tamaño de las tenias y su relación con la presencia de antígenos en el ELISA	81
2.6	Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de coproantígenos de <u>T. solium</u>	84
2.7	Efecto de la desparasitación en el ensayo de detección de coproantígenos	86
3.	APLICACION Y EVALUACION DEL ELISA EN LA DETECCION DE ANTIGENOS DE <u>T. solium</u> EN EL SER HUMANO	86
3.1	Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de coproantígenos en heces humanas	94
VII.	DISCUSION	96
VIII.	BIBLIOGRAFIA	113

RESUMEN

Se reprodujo la teniasis por Taenia solium en el modelo experimental del hamster dorado (Mesocricetus auratus) con el fin de obtener tanto parásitos como muestras de heces para desarrollar un método inmunoenzimático (ELISA) aplicable en el diagnóstico de teniasis en el ser humano. Asimismo se colectaron muestras de materia fecal humana de individuos sanos, con teniasis y con otras parasitosis. Se empleó un ELISA de doble anticuerpo homólogo acoplado al sistema biotina-avidina peroxidasa para la detección de antígenos de tenia en heces. Como primer anticuerpo de captura se usó inmunoglobulina G (IgG) sérica de un conejo inmunizado con extracto crudo de tenias obtenidas de los hamsters, esta misma IgG conjugada a biotina se empleó como anticuerpo de revelado. El método tuvo un límite de resolución de 25 ng/ml para el antígeno de T. solium en solución y de 100 ng/ml para el mismo antígeno en sobrenadante de heces humanas y de hamster. Se detectaron antígenos en las heces de los hamster desde la segunda semana de infección, por lo que fue posible descubrir la parasitosis en el período subclínico; los resultados se negativizaron cuando el parásito se eliminó. La sensibilidad y especificidad del método en el modelo experimental fue del 100%. El ELISA también detectó a todos los portadores de tenia y no se registraron falsos positivos en pacientes con parasitosis intestinales por protozoarios, otros platelmintos (Hymenolepis nana) o nemátodos. El ELISA fue más sensible en la identificación de individuos teniásicos que los estudios coproparasitológicos, sin embargo, tampoco fue posible diferenciar entre las dos especies de Taenia que parasitan al hombre. En conclusión, es posible aplicar el ELISA con alta eficiencia en la detección de coproantígenos en individuos teniásicos.

I. INTRODUCCION

Taenia solium (Linnaeus, 1758), es un parásito de cuerpo aplanado que en su ciclo de vida parasita a dos hospederos mamíferos y además presenta un estadio de vida libre. La clasificación zoológica de este parásito es la siguiente (Cheng, 1978):

PHYLUM	Platyhelminthes
CLASE	Cestoidea
SUBCLASE	Cestoda
ORDEN	Cyclophyllidea
FAMILIA	Taeniidae
GENERO	<u>Taenia</u>
ESPECIE	<u>Taenia solium</u> (Linnaeus, 1758).

Los parásitos de la familia Taeniidae, tienen una amplia distribución en el mundo y tienden a presentar una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo. Esta subclase de céstodos es importante por encontrarse en ellas varias especies zoonóticas que provocan daño a la salud del hombre así como pérdidas en su economía debido al decomiso de ganado parasitado por estas especies. De esta manera tenemos que la Taenia saginata, T. hydatigena, T. ovis y T. solium ocasionan el decomiso de ganado vacuno, ovino, caprino y porcino respectivamente (Gemmell y cols., 1983; Aluja y cols., 1987).

La teniasis es una enfermedad causada por el establecimiento de las formas adultas en el intestino delgado del hospedero. La cisticercosis es una parasitosis causada por el establecimiento del metacéstodo o larva en el tejido del hospedero intermediario.

1. MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA.

En forma natural la Taenia solium adulta habita únicamente en el intestino delgado del ser humano, en donde logra sobrevivir hasta 25 años (Aluja y cols., 1987). Este céstodo hermafrodita se alimenta del contenido intestinal del hospedero por carecer de aparato digestivo propio, la captación y asimilación del alimento se lleva a cabo en el sincicio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo y probablemente también por endocitosis moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Noble y Noble, 1976).

El cuerpo de la tenia adulta es aplanado dorsoventralmente y es de color blanco, se divide en tres regiones: el escólex u órgano de fijación en el extremo anterior del cuerpo, el cual está perfectamente adaptado para unirse a la mucosa intestinal del hospedero específico, para de esta manera poder sobrevivir en su medio ambiente, en el cual los movimientos peristálticos del intestino y el paso directo de la comida digerida, hacen un requisito indispensable el poseer una forma eficiente de anclaje (Smyth y McManus, 1989). El escólex es de forma piriforme y mide

de 1 a 2 mm, posee un rosetelo formado por dos coronas concéntricas de ganchos en número de 22 a 32, estos ganchos son de diferentes tamaños, los largos miden 160 a 180 μm y los cortos 110 a 140 μm (Cheng, 1978); además posee cuatro ventosas musculares que también sirven como órganos de fijación. El escólex sufre un adelgazamiento para dar origen a la segunda región, el cuello, es un área no segmentada y poco diferenciada, es la porción germinal donde se origina la tercera porción o estróbilo, el cual llega a medir hasta 8 m de largo (Aluja y cols., 1987). El estróbilo que constituye la mayor parte del cuerpo, está formado por una cadena de 800 a 1000 segmentos pequeños llamados proglótidos, los cuales constituyen entidades de reproducción individual. Existen proglótidos inmaduros, que son los más cercanos al cuello y no tienen órganos sexuales diferenciados. Los siguientes son ya sexualmente maduros donde se aprecian los órganos sexuales diferenciados, finalmente se encuentran los proglótidos grávidos, los cuales se encuentran llenos de huevos (Cheng, 1978; Noble y Noble, 1976). Cada proglótido grávido contiene aproximadamente 50,000 huevos en distintos grados de madurez (Heath, 1982); los proglótidos grávidos se desprenden periódicamente del resto del cuerpo, permitiendo así la salida de los huevos del hospedador mediante sus desechos fecales (Cheng, 1978).

Los huevos de T. solium miden de 30 a 40 μm de diámetro, poseen varias envolturas que le permiten al embrión sobrevivir en el medio ambiente. La capa más externa que rodea al huevo es una

membrana delgada hialina conocida como vitelo que usualmente se pierde en las heces; la siguiente envoltura es el embrióforo denso formado por pequeños bloques de queratina unidos entre si por un cemento que le da a los huevos su aspecto radiado característico y resistencia en el medio ambiente; finalmente se encuentra la membrana oncosferral que rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto (Laclette y cols., 1982). La oncosfera está formada por un epitelio delgado con extensiones citoplásmicas, un complejo sistema muscular que opera los tres pares de ganchos, un par de glándulas que le ayudan a penetrar dentro del hospedero, células germinativas a partir de las cuales se desarrollará el siguiente estadio larvario y un sistema nervioso primitivo (Smyth y McManus, 1989). El huevo es el único estadio del parásito que está expuesto al medio ambiente, por lo que la desecación y las altas temperaturas son factores que disminuyen su sobrevivencia, no obstante, en estudios hechos con huevos de T. hydatigena y T. saginata se observó que pueden permanecer viables e infectantes en aguas negras, ríos o pasturas por semanas o meses (Gemell y cols., 1983).

Tanto el hombre como el cerdo adquieren cisticercosis por comer huevos de T. solium provenientes de materia fecal humana contaminada. La eclosión del huevo de T. solium ingerido por el hombre y el cerdo ocurre cuando es afectado por el jugo gástrico y posteriormente por el jugo intestinal (Cheng, 1978). En la primera fase de la eclosión del huevo, el cemento que une a los

bloques del embrióforo es digerido por las enzimas proteolíticas intestinales y ocasiona la disgregación del embrióforo restableciendo de esta manera la comunicación de la oncosfera con el medio exterior (Laclette y cols., 1982). Las oncosferas aún rodeadas por la membrana oncosferal se mantienen inactivas, no se observan movimientos en ellas, pero si se les adiciona jugo duodenal humano o jugo intestinal artificial comienzan a moverse activamente los ganchos, el cuerpo se contrae o expande en forma alternada hasta lograr liberarse de la membrana oncosferal (Yoshino, 1933). Con ayuda de sus ganchos y posiblemente por sus secreciones enzimáticas, penetran a través de la pared intestinal hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos por cuya corriente son transportadas a cualquier tejido del organismo (Yoshino, 1933). En el cerdo, la oncosfera requiere de 60 a 70 días para convertirse en un cisticerco completamente desarrollado, el cual puede sobrevivir varios años en los tejidos del hospedero, e inducir una reacción inflamatoria granulomatosa (Yoshino, 1933). En el hombre y en el cerdo los cisticercos se localizan principalmente en el sistema nervioso, músculo esquelético y ojos (Schenone y cols., 1982).

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovalada, transparente que mide de 0.5 a 2 cm de diámetro, con un escólex invaginado dentro de la vesícula. Al igual que la tenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo con doble

corona de ganchos en número de 22 a 32 (Aluja y cols., 1987). La superficie de la pared vesicular está cubierta de unas estructuras denominadas microtricas (Ramírez-Bon y cols., 1982). A través de esta superficie ocurre el intercambio metabólico entre el hospedero intermediario y el parásito, ya que tampoco tiene sistema digestivo (Lumsden y cols., 1982). En los cisticercos de *T. taeniaeformis* las microtricas también le sirven como mecanismo de protección contra la respuesta inmune del hospedero (Williams y cols., 1982).

El ciclo biológico de este parásito se completa cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida que contiene cisticercos vivos. En el estómago, el cisticerco viable con su escólex invaginado es activado por las enzimas digestivas pepsina y tripsina, así como las sales biliares, lo que ocasiona la evaginación del escólex y posteriormente este se fija a la pared intestinal, convirtiéndose paulatinamente en una tenia adulta (Cheng, 1978).

2. ASPECTOS CLINICOS.

2.1. Teniasis.

La teniasis tiene un curso clínico benigno, o es asintomática, aunque se cuenta con un reporte clínico de perforación del intestino delgado por *T. saginata* (Lenoble y Dumontier, 1988). Cuando llega a manifestarse esta parasitosis, los síntomas pueden consistir en dolor abdominal, anorexia, náusea, indigestión

crónica, períodos alternos de diarrea y constipación, síntomas nerviosos de origen tóxico y eosinofilia moderada del 10% al 12%. Este cuadro leve hace difícil el diagnóstico y así, la parasitosis puede pasar desapercibida por muchos años (Chester y col., 1986). En estudios realizados en individuos parasitados con *T. saginata*, se reportaron además anormalidades en la actividad secretoria de la mucosa gástrica e hipoclorhidria en un 57.7% y 49.7% respectivamente; al realizar cortes histológicos de biopsias de los pacientes teniásicos con hipoclorhidria se encontró menor cantidad de células parietales y un infiltrado de células mononucleares, posterior al tratamiento cestocida, se observó regeneración de la actividad secretoria, disminución en el infiltrado celular y aumento en el número de células parietales en la mayoría de los pacientes (Stefaniak, 1989). La teniasis también puede ocasionar apendicitis (Panzeri y cols., 1965) y pancreatitis (Plane y cols., 1980).

2.2. Cisticercosis.

Debido a la complejidad clínica de la cisticercosis en humanos, se han realizado varios trabajos con el objetivo de agrupar y clasificar esta enfermedad. En el ser humano la cisticercosis mas frecuente es la cerebral, debido al establecimiento de la larva en el sistema nervioso central (SNC). Las manifestaciones clínicas dependen del número y localización de las larvas, del tiempo de evolución y de la extensión y gravedad de la respuesta inflamatoria del hospedero (Rabiela-Cervantes y

cols., 1982; Zenteno-Alanís, 1982). La neurocisticercosis cursa principalmente con epilepsia, meningitis e hipertensión intracraneal con sus signos de cefalea, náusea, vómito y vértigo (Estañol y cols., 1989; Rabiela-Cervantes y cols., 1982; Zenteno-Alanís, 1982). Cabe señalar que la cisticercosis del SNC puede cursar en forma asintomática, se han reportado entre un 25% y 80% de casos asintomáticos en hallazgos de autopsias (Albores y Altamirano, 1971; Rabiela-Cervantes y cols., 1982).

La oftalmocisticercosis se debe al establecimiento de los parásitos dentro del globo ocular o detrás de la retina, le sigue en frecuencia a la neurocisticercosis, mientras que la cisticercosis espinal, la subcutánea y la muscular se encuentran con menor frecuencia (Schenone y cols., 1982). La localización intraocular del parásito vivo o muerto produce una reacción inflamatoria, que puede ocasionar la pérdida de la visión (Cárdenas y cols., 1989). Los cisticercos en el tejido subcutáneo y músculo estriado provocan trastornos ligeros de dolor y debilidad muscular o bien, pueden pasar desapercibidos (Zenteno-Alanís, 1982). En el continente asiático la cisticercosis muscular es muy frecuente y debido al gran número de parásitos puede ocasionar pseudohipertrofia muscular (Zhi-biao y cols., 1985).

En el cerdo el cisticerco se distribuye prácticamente en todo el tejido muscular, también puede localizarse en el SNC, en corazón y en ojos (Vargas y cols., 1986; Aluja y cols., 1987). Por lo general no se observan alteraciones clínicas en los cerdos

parasitados. La ausencia aparente de síntomas en los cerdos puede deberse a que los animales son sacrificados en el primer año de vida, cuando la parasitosis tiene poco tiempo de haberse establecido (Gemmell y cols., 1983)

3. INMUNOLOGIA.

El estudio de la respuesta inmune en diversas relaciones hospedero-parásito ha demostrado ser de gran utilidad, no solo para ayudar al diagnóstico de la enfermedad, sino también para determinar los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, los componentes del sistema inmune que confieren inmunidad y los mecanismos responsables, así como las acciones que emplean los parásitos para evadir al sistema inmune. Esta información permite en muchos casos tomar medidas de control que alteren favorablemente el equilibrio de la parasitosis y proveer mayores datos sobre la historia natural de la enfermedad.

La información que se tiene sobre inmunidad y teniasis, se ha obtenido de la infección por T. saginata principalmente. En el suero de los individuos portadores de la forma adulta de T. saginata se ha observado incremento significativo de inmunoglobulinas (Ig) E y A, los niveles de IgE se tornan normales después de la eliminación del parásito. Aunque esta aumentado el nivel de inmunoglobulinas, éste incremento no se ha asociado con especificidad de los anticuerpos anti-tenia (Gemmell y cols.,

1983). Se ha detectado una respuesta inmune celular en pacientes infectados con T. saginata mediante ensayos de inhibición de la migración de leucocitos y macrófagos, por otro lado, se observó disminución de la reactividad de los linfocitos a la estimulación con fitohemaglutinina; una vez que el parásito fue expulsado, la respuesta volvió a la normalidad (Gemmell y cols., 1983).

El hecho de que la cisticercosis sea una parasitosis que afecta a varios mamíferos, ha permitido realizar estudios y ensayos experimentales con el propósito de evaluar si se puede inducir inmunidad contra esta parasitosis (Aluja y cols., 1987); los trabajos realizados con varias especies de Taenia y de sus hospederos, así como diferentes protocolos de inmunización empleados, indican que sí es factible evitar que se produzca la cisticercosis experimental con eficiencia variable, y reducir el número de cisticercos implantados a través de métodos inmunológicos (Flisser y cols., 1979). En ratas y ratones infectados con T. taeniaeformis y conejos con T. pisiformis se ha demostrado que la respuesta inmune humoral, específicamente los anticuerpos de clase IgG y el sistema del complemento, son capaces de proteger a los animales de la infección (Musoke y Williams, 1975; Németh, 1970). Algunos estudios in vitro han demostrado que el complemento es capaz de dañar al parásito por vía alterna, esto es, aun sin la cooperación de la respuesta específica (Conder y col., 1983). Por otra parte, en trabajos recientes se ha visto que las células T cooperadoras juegan un papel importante en la resistencia de los

ratones a la infección con cisticercos de T. taeniaeformis, la eliminación de estas células provoca que no se forme el infiltrado celular por eosinófilos alrededor del cisticerco y por ende no haya mortalidad en los cisticercos (Lentoja y cols., 1988). En borregos parasitados con T. hydatigena, se ha visto también la participación de células CD4+ y esonófilos en los infiltrados celulares que rodean al cisticerco, en hígados de animales con una infección secundaria (Meeusen y cols., 1990). Ante la existencia de uno o varios cisticercos en los tejidos del hospedero, se crea una respuesta inmune específica que le protege en contra de una segunda infección; sin embargo, los cisticercos establecidos en la primera infección no son afectados por la respuesta del hospedero y logran sobrevivir por largos períodos (Flisser y cols., 1979; Willms y cols., 1982).

En ensayos realizados con cerdos, se observó una disminución en el número de cisticercos implantados, así como una reacción inflamatoria mas intensa y mayor número de cisticercos infiltrados por eosinófilos en animales que fueron inmunizados con extracto crudo del parásito y desafiados posteriormente con huevos (Molinari y cols., 1983a). De la misma manera, se logró un aumento en la intensidad de la reacción inflamatoria contra los cisticercos, en cerdos infectados naturalmente e inmunizados con antígeno crudo del parásito, ésta reacción se hizo mas intensa conforme transcurrieron las semanas postinmunización (Molinari y cols., 1983b). Esta información es alentadora para continuar estudios acerca del

desarrollo de posibles vacunas para esta parasitosis (Aluja y cols., 1987).

La respuesta inmune humoral en el ser humano se ha estudiado mas ampliamente; se ha visto que los pacientes con neurocisticercosis tienen anticuerpos contra el parásito. Utilizando la técnica de inmunolectroforesis (IEF), se caracterizó inicialmente la respuesta inmune humoral, se enfrentó un extracto crudo del parásito con los sueros de los pacientes y se determinó que la respuesta era heterogénea, ya que los sueros reaccionaron con un número y tipo variable de antígenos, (Flisser y cols., 1980). Mediante IEF se pudo clasificar a los antígenos del cisticerco de acuerdo a su movilidad electroforética; de esta manera se han definido ocho antígenos denominados con las primeras letras del alfabeto. El antígeno mas reconocido en el suero de los pacientes fue el denominado antígeno B (AgB), éste antígeno es una proteína de secreción del parásito, formada por dos subunidades de 95-105 KDa (Guerra y cols., 1982; Laclette y cols., 1987).

La secreción del AgB es congruente con el hecho de que sea el antígeno más reconocido por los sueros de pacientes pues éste entra en contacto con el sistema inmune del hospedero. A pesar de ello, la respuesta específica anti-B es incapaz de dañar al cisticerco por estar dirigida contra un antígeno que se libera (Laclette, 1985) y no permite la interacción de los anticuerpos anti-B con el parásito.

Los anticuerpos presentes en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con neurocisticercosis se analizaron por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA), en donde se estableció que la IgG es la más frecuente, seguida por la IgM e IgA. También se encontraron anticuerpos de la clase IgE únicamente en un suero y un LCR que provenían de distintos pacientes. De manera similar que en la IEF, también se encontraron anticuerpos IgG contra el antígeno B tanto en el suero como en el LCR en la mayoría de los pacientes (Espinoza y cols., 1986). Recientemente, con la aplicación de la inmunoelectrotransferencia enzimática (IET) para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana, se corroboró la heterogeneidad de la respuesta inmune de los pacientes (Tsang y cols., 1989; Feldman y cols., 1990), en ambos trabajos se usaron como antígenos glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* purificadas por cromatografía de afinidad con lenti-lectina, el ensayo tiene una sensibilidad del 98% y la especificidad es del 100%. Se identificaron siete glicoproteínas del parásito que son reconocidas por el suero o LCR de los pacientes con neurocisticercosis confirmada (Tsang y cols., 1989). Cuando se usó la IET en saliva y suero de enfermos con neurocisticercosis, la sensibilidad del método fue de 100% para el suero y de 70% en saliva; en ambos líquidos los anticuerpos reconocieron las siete glicoproteínas del parásito (Feldman y cols., 1990).

La respuesta inmune celular en los pacientes con neurocisticercosis ha sido pobremente caracterizada pues sólo se cuenta con datos escasos. Esta respuesta se evaluó por medio de la reactividad de los enfermos hacia el PPD (derivado protéico purificado de Mycobacterium tuberculosis); por ensayos de transformación blastoide de linfocitos de sangre periférica con los mitógenos fitohemaglutinina, concanavalina A y fitolaca americana; por medio de la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y la relación T4/T8. El promedio de los valores, tanto de reactividad a PPD como de transformación blastoide con los tres mitógenos, están disminuidos en los enfermos con neurocisticercosis. Además resalta la gran elevación en la población de linfocitos T8 supresores/citotóxicos y la relación T4/T8 mucho mas baja si se compara con la de los individuos normales. También se detectó en los enfermos con cisticercosis, mayor susceptibilidad a padecimientos asociados con una mala regulación de la respuesta inmune (Flisser, 1987).

4. EPIDEMIOLOGIA.

La teniasis-cisticercosis es una parasitosis ampliamente distribuída en países en vías de desarrollo donde predominan las malas condiciones higiénicas y una incipiente industria porcina, además de una deficiente educación. Es endémica en el sureste de Asia no islámico, la parte central y sur de Africa y en América Latina (Schenone y cols., 1982 y Mahajan, 1982) y son México y

Brasil los países mas afectados en el continente americano (Sarti, 1989). Las características propias de esta enfermedad hacen que se considere un problema severo para la salud pública y la economía ganadera de estos países (Aluja y cols., 1987; Acha y Szifres, 1986), ya que los costos de hospitalización, atención médica, cirugía, medicamentos y la pérdida de la producción laboral que ocasiona la neurocisticercosis son muy elevados; por ejemplo, en 1982 se reportó que el cuidado de un paciente con esta enfermedad en nuestro país era de 2,173 dólares y la erogación anual en los pacientes con neurocisticercosis ascendía a 255 millones de dólares (Velasco-Suárez y cols., 1982).

Stoll (1947) estimó que en el mundo existían cerca de 39 millones de personas infectadas por T. saginata y 2.5 millones con T. solium. Acha y Szifres (1986) suponen que desde entonces el número de individuos teniásicos ha aumentado con el crecimiento de la población humana y animal, por su parte, Cook (1986) reporta que existen aproximadamente tres millones de personas infectadas por T. solium, sin embargo, no se puede precisar con exactitud la incidencia de teniasis por esta especie, debido a que no se han realizado estudios longitudinales para determinar la frecuencia de esta parasitosis (Correa, 1991); por otro lado, los exámenes coproparasitológicos que se utilizan rutinariamente para su diagnóstico son de baja sensibilidad y especificidad (Schantz y Sarti, 1989). La información disponible se basa en estudios aislados de algunos sectores específicos de la población, se estima

que la prevalencia de teniasis en México se encuentra entre el 0.1% y 1.5% (Aluja y cols., 1987). Tay y cols. (1976), reportaron frecuencias de teniasis sin definir especie, que oscilaron entre el 0.1% a 4.5% y una frecuencia en la población total estudiada de 1.52%. Por otro lado, los casos de teniasis se han notificado en forma irregular a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, sin embargo éste organismo informó que la prevalencia de teniasis varió de 0.5% al 6% durante el último lustro (Sarti, 1989).

La neurocisticercosis humana se ha reportado en 18 países de Latinoamérica con una tasa de 0.43% en autopsias. Brasil, Chile Perú, El Salvador, Guatemala y México registran las tasas mas altas de morbilidad en el continente (Acha y Szifres, 1986 y Schenone y cols., 1982). La frecuencia de neurocisticercosis en México es alta comparada con la reportada para otros países de latinoamérica. Las tasas de prevalencia e incidencia de neurocisticercosis se han calculado a partir de estudios hechos en pacientes hospitalizados y en series de autopsias de algunos hospitales (Schenone y cols., 1982; Velsco-Suárez y cols., 1982); esta información presenta sesgos en la elección de la muestra estudiada lo que no permite aceptarlos como una medida real de la enfermedad, sólo brindan una idea aproximada de la magnitud del problema, debido a que la población analizada no puede considerarse representativa del total, por tratarse de casos que requirieron y tuvieron acceso a un hospital (Correa, 1991); además debe tenerse presente el gran

porcentaje de casos asintomáticos en la neurocisticercosis y la localización del parásito en otros tejidos del hospedero (Rabiela-Cervantes y cols., 1982; Zenteno-Alanís, 1982). Los estados de la República Mexicana que registraron las frecuencias mas altas de neurocisticercosis durante los años de 1983 a 1985 fueron Guerrero (24.4%), Michoacán (12.7%), Estado de México (12.0%), San Luis Potosí (7.8%) y Puebla (7.1%) (Sarti, 1989).

Otra fuente de información para el conocimiento de esta parasitosis, proviene de los registros de la inspección sanitaria de la carne que se efectúa en rastros, mataderos y frigoríficos. Desgraciadamente esta información no es lo suficientemente confiable, ya que los métodos usuales de inspección sanitaria basados en cortes hechos en los lugares de localización preferente del parásito, no descubren la totalidad de las canales infectadas, además que no todos los cerdos son sacrificados en rastros oficiales (Vargas y cols., 1986; Vergara, 1970; Aluja y cols., 1987).

En latinoamérica, el país con mayor tasa de infección por cisticercosis porcina es Brasil, con un 0.83%. Tasas menores se observaron en México, Chile, Colombia, Panamá y Honduras. En Sudáfrica está por debajo del 1.5%. También se encuentra presente en países del continente asiático como China, India, Tailandia e Indonesia (Mahajan, 1982). En Europa, la cisticercosis porcina ha desaparecido (Acha y Szifres, 1986; Gemmell y cols., 1983). En

México, al estudiar la frecuencia de cisticercosis porcina registrada en 75 rastros de la República en el año de 1980 y primer semestre de 1981, se observó un promedio nacional de 1.55%, con un rango del 0.005% al 10%, destacando los estados de Guanajuato y Michoacán con 10% de prevalencia (Aluja, 1982). En 1981 se decomisaron 264 mil canales y las pérdidas económicas que ocasionó el decomiso de cerdos cisticercosos fué de alrededor de 43 millones de dólares (Acevedo-Hernández, 1982).

5. DIAGNOSTICO.

5.1. Teniasis.

El diagnóstico de teniasis se hace habitualmente por la observación de proglótidos en tamizados de heces o por la observación de huevos en exámenes coproparasitoscópicos de concentración o flotación donde solo se identifica hasta género, ya que no pueden diferenciarse morfológicamente los huevos de T. solium y T. saginata (Chenq, 1978 y Gemmell y cols., 1983). Debido a que la eliminación de proglótidos no es cotidiana y a que las técnicas carecen de especificidad y la sensibilidad es cercana al 50% (Schantz y Sarti, 1989), es necesario repetir los exámenes si los resultados fueran negativos, asimismo es aconsejable utilizar varias técnicas para lograr un mejor diagnóstico (Straka y cols., 1989; Gemmell y cols., 1983).

Recientemente se ha impulsado el desarrollo de métodos mas sensibles y específicos para el diagnóstico de teniasis humana, Flisser y cols. (1988a), desarrollaron un método de hibridación directa utilizando sondas de DNA marcadas radiactivamente, mediante el cual pudo detectarse hasta un huevo del parásito y diferenciar entre dos especies de Taenia; y en colaboración con parasitólogos de la Escuela de Medicina Tropical en Liverpool, G.B. desarrollamos un método inmunoenzimático para la detección de productos antigénicos de la tenia en heces de hamsters infectados experimentalmente, y también se determinaron 11 casos de teniasis humana por T. solium o por T. saginata (Allan y cols., 1990); la presente tesis forma parte de este trabajo en colaboración.

5.2. Cisticercosis humana.

El diagnóstico clínico de la cisticercosis humana es difícil de realizar debido a que los signos y síntomas corresponden a varios cuadros clínicos. Las pruebas inmunodiagnósticas y el uso de procedimientos imagenológicos pueden apoyar el diagnóstico en los pacientes sintomáticos (Aluja y cols., 1987; Flisser, 1988b). La cisticercosis subcutánea se determina mediante una biopsia de los nódulos o en el material de autopsia donde se demuestra la presencia del parásito (Gemell y cols., 1983); la cisticercosis ocular puede evidenciarse por medio del oftalmoscopio (Acha y Szifres, 1986).

Los estudios de tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear son de elección para lograr un diagnóstico preciso de la neurocisticercosis (Aluja y cols., 1987), estos métodos hacen posible la detección de la larva y se pueden correlacionar con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Rodríguez-Carbajal y cols., 1989). Los exámenes inmunológicos en LCR permiten confirmar el diagnóstico clínico e imagenológico (Alarcón de Noya y cols., 1989). Se han utilizado diversas pruebas para la búsqueda de anticuerpos anticisticercos tanto en el suero como en el LCR de los individuos con cisticercosis. En México se emplea la técnica de fijación de complemento (FC) en LCR desde 1948 (Nieto, 1956). En 1975, se estandarizó la inmunolectroforesis en suero de pacientes con neurocisticercosis. También se utilizan otras pruebas como la hemaglutinación pasiva (HA), la inmunofluorescencia (IF), la doble inmunodifusión (DID) y más recientemente el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunolectrotransferencia (IET) (Flisser y cols., 1979; Aluja y cols., 1987; Espinoza y cols., 1986; Tsang y cols., 1989). Estas dos últimas pruebas han mostrado buenos resultados, pues sus niveles de sensibilidad son del orden del 90% y 98% respectivamente; en cuanto a la especificidad, ésta es del 100% para IET (Tsang y cols., 1989)

En cuanto a los antígenos empleados en las pruebas inmunodiagnósticas, en la mayoría de los estudios realizados se usan extractos crudos de cisticercos extirpados de cerdos. La

presencia de diversos componentes proteicos u otras macromoléculas en los extractos crudos, puede interferir o bloquear las reacciones antígeno-anticuerpo, lo que ocasiona que disminuya la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Aluja y cols., 1987). En la actualidad se está trabajando en la obtención de antígenos puros con objeto de disminuir las reacciones cruzadas que frecuentemente se presentan entre el cisticercos de T. solium y otros helmintos (Schantz y Sarti, 1989).

La sola presencia de anticuerpos en los fluidos orgánicos no es demostración de la presencia del agente causal, sino solamente indica que el individuo ha estado en contacto con este u otro organismo de reacción cruzada. Ante este hecho, se han empezado a describir métodos que informan de la presencia de antígenos del parásito, la sensibilidad de los mismos oscila entre 70 y 90% (Tellez-Girón y cols., 1987; Correa y cols., 1989). Sin embargo, ninguno de ellos está estandarizado para realizarse en suero humano, sino solamente para LCR y en ningún caso se han analizado las reacciones cruzadas con otros parásitos o incluso con otros agentes infecciosos (Correa, 1991).

5.3. Cisticercosis porcina.

El diagnóstico de la cisticercosis porcina puede realizarse en el cerdo ante-mortem por medio del examen visual y palpación de las caras lateral e inferior de la lengua. Con este método se detecta de un 40% a 70% de los animales parasitados (Vergara, 1970;

Vargas y cols., 1986; Aluja y cols., 1987). En los rastros donde se realiza la inspección sanitaria, el diagnóstico de esta parasitosis se hace en el cerdo ya sacrificado; se efectúa un corte doble en los músculos tríceps y ancóneo derecho, evidenciando de esta manera la presencia del parásito en la masa muscular (Contreras, 1989). La eficiencia de este método de inspección sanitaria varía del 70 al 85% (Vargas y cols., 1986); por otra parte, en un estudio realizado en 1000 cerdos negativos a una primera inspección, se observó que el 1.1% eran positivos a cisticercosis en una segunda inspección, lo que pone de manifiesto que mediante esta técnica las infecciones leves pasan desapercibidas (Vergara, 1970).

Se han ensayado diferentes pruebas inmunodiagnósticas para la cisticercosis porcina como son: fijación de complemento, hemaglutinación indirecta, intradermoreacción, inmunodifusión en gel y precipitación capilar; los resultados obtenidos son variables y no satisfactorios (Proctor y Elsdon, 1966; Aluja y cols., 1987). En trabajos recientes se ha aplicado el ELISA y IET para el diagnóstico de esta parasitosis; y, al igual que en la cisticercosis humana, la IET muestra una sensibilidad alta, en cambio el ELISA es menos sensible y específico (Torres, 1990). En cuanto al desarrollo de pruebas inmunológicas que detecten la presencia del parásito en el suero de cerdos infectados, existe un reporte en donde se usaron anticuerpos monoclonales a través de un sistema

inmunoenzimático, por este método se detectó al 80% de los animales parasitados (Rodríguez del Rosal y cols., 1989).

6. TRATAMIENTO.

En el tratamiento de teniasis se han usado drogas cestocidas con resultados satisfactorios. El albendazol, el praziquantel y la niclosamida son los medicamentos de elección en esta parasitosis (Gemmell y cols., 1983; Escobedo, 1989).

El tratamiento de la neurocisticercosis humana puede ser quirúrgico o medicamentoso. El quirúrgico depende de la localización y características anatomopatológicas de la cisticercosis del sistema nervioso; éste consiste en reducir la hipertensión intracraneal o en la extirpación del cisticerco (Escobedo y cols., 1982; Escobedo, 1989). También se pueden administrar medicamentos anticonvulsivos, analgésicos, esteroides, diuréticos y psicodrogas para controlar la sintomatología de los pacientes (Escobedo y cols., 1982; Flisser, 1988b). Un avance importante en el tratamiento de la cisticercosis son las drogas que atacan al parásito. Los antiparasitarios utilizados son el praziquantel y el albendazol (Escobedo, 1989); estos medicamentos son eficientes contra los parásitos vivos localizados en el parénquima cerebral y en posición subaracnoidea (Sotelo y cols., 1984; Vasconcelos y cols., 1987; Escobedo, 1989). Sin embargo la droga no se usa cuando los cisticercos están en los ventrículos o en el ojo (Flisser, 1988b).

Entre los medicamentos probados en la cisticercosis porcina se encuentra el albendazol, el flubendazol, el mebendazol y el praziquantel (Chavarría y cols., 1978; Téllez-Girón y cols., 1984; Aluja y cols., 1987; Escobedo, 1989); la eficacia de éstas drogas para destruir a los parásitos es variable. Estudios recientes hechos con praziquantel muestran que los cisticercos musculares se destruyen mas rápidamente que los cisticercos cerebrales (Flisser y cols., 1990; Torres, 1990).

7. CONTROL.

Todo programa de control que intente lograr la erradicación de la teniasis-cisticercosis en humanos y en animales debe tener presente que el hombre es el único hospedero del parásito adulto y es la fuente de cisticercosis tanto para el hombre como para el cerdo (Aluja y cols., 1987). Recientemente se postula que existe otro mecanismo para adquirir la cisticercosis, el cual consiste en ingerir formas embrionarias muy jóvenes (posoncosferas) de T. solium que se encuentran en el tejido muscular de cerdos con cisticercosis (Salazar-Schettino y cols., 1984). Las medidas de control deben ser dirigidas en primer lugar al diagnóstico y tratamiento de la población humana infectada con el parásito adulto de T. solium. La eliminación de cerdos cisticercosos no logrará resolver el problema mientras existan personas portadoras de la tenia y mientras se practique el fecalismo al aire libre (Gemmell y cols., 1983).

Estudios epidemiológicos recientes muestran una asociación entre el individuo teniásico y las personas con evidencias clínicas o serológicas de cisticercosis (Sarti y cols., 1988; Díaz y cols., 1990). Sarti y cols. (1988), al estudiar la prevalencia de teniasis humana y cisticercosis humana y porcina en una comunidad rural del Edo. de Hidalgo encontraron que la distribución de individuos teniásicos, de personas con evidencia clínica o serológica de cisticercosis y de cerdos infectados sugieren una transmisión intradomiciliaria. Por su parte, Díaz y cols. (1990), al realizar un estudio epidemiológico cuyo objetivo era determinar el problema de salud que representa la teniasis-cisticercosis en una comunidad del Estado de Sinaloa, observaron que en las familias con portadores de *T. solium* la seropositividad a cisticercosis aumentaba 4 veces con respecto a la seropositividad de toda la población.

Finalmente, las medidas de control y prevención que deben seguirse para que los cerdos no se infecten y en forma análoga el hombre tampoco enferme, están dirigidas principalmente al mejoramiento de la higiene y al conocimiento de este problema. Una estrategia alternativa para la prevención de la cisticercosis consiste en la identificación y tratamiento de los individuos portadores de la forma adulta de *T. solium*, lo que requiere de métodos diagnósticos mas eficientes y confiables para poder interrumpir el ciclo de vida de este parásito.

II. ANTECEDENTES.

El diagnóstico de las parasitosis gastrointestinales en los hospitales y laboratorios de análisis clínicos se hace en forma rutinaria mediante exámenes coproparasitológicos, donde se puede observar al parásito en sus diferentes estadios de desarrollo según el método empleado. Estos exámenes tienen baja sensibilidad, razón por la cual se recomienda practicar exámenes coproparasitológicos seriados, sin embargo, la sensibilidad máxima alcanzada oscila entre el 50-70% (Rosoff y Stibbs, 1986; Schantz y Sarti, 1989; Deplazes y cols., 1990) y se ve aún mas disminuída en las infecciones crónicas (Rosoff y Stibbs, 1986; Del Muro y cols., 1987). Por otro lado, la aplicación de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias se viene realizando desde hace varias décadas, en un principio se puntualizó en el desarrollo de pruebas que determinarían unicamente la presencia de una respuesta inmune del hospedero, sin embargo, la interpretación de los resultados se tornaba difícil debido a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos, así como a la falta de antígenos bien caracterizados (Bidwell y cols., 1976). El esfuerzo de diferentes laboratorios de investigación y el avance tecnológico han permitido el desarrollo de pruebas inmunológicas mas sensibles y específicas para el diagnóstico de agentes infecciosos. En este contexto, las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) tienen un fuerte impacto, se han usado ampliamente tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos en diferentes fluidos del organismo (Viscidi y cols., 1984); las características de alta sensibilidad,

reproducibilidad, estabilidad y larga duración de los reactivos, la lectura de resultados de manera cuantificable o directa, y la automatización, hacen de este ensayo una prueba versátil para el diagnóstico de las parasitosis intestinales (Voller y cols., 1976).

La detección de antígenos de parásitos intestinales por medio del ELISA se logró a finales de la década de los setentas. Root y cols. (1978), aplicaron este método para la detección de coproantígenos de Entamoeba histolytica en humanos, estos autores reportaron que el ELISA fue dos veces más sensible que la microscopía en el diagnóstico de amibiasis en la población mexicana. Posteriormente Randall y cols. (1984), probaron este mismo método en la ciudad de San Francisco, California y observaron que la microscopía fue mucho más sensible que el ELISA para el diagnóstico de amibiasis: de 12 muestras positivas por microscopía, solo 5 fueron positivas por ELISA y no hubo ninguna que fuera positiva en ELISA y negativa en la microscopía; sin embargo, ambas pruebas concordaron en un 93%, en este estudio se discuten posibles diferencias etiológicas y técnicas como posible explicación a la disparidad de resultados. Del Muro y cols. (1987), desarrollaron una prueba diagnóstica para la amibiasis intestinal por medio del ELISA y con el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la membrana de la amiba. La sensibilidad del ensayo fue de 100 ng de antígeno de membrana y de 10 trofozoitos/ml, al comparar el ELISA con microscopía e historias clínicas, al igual que en el estudio de Roots y cols, se observó que el ELISA fue dos veces más sensible

que la microscopía; en cuanto a la especificidad, no hubo reacción cruzada con otras especies de Entamoeba, ni con protozoarios y nemátodos intestinales; adicionalmente, mediante este ensayo pudieron detectarse quistes o trofozoitos del parásito. En ese mismo año Grundy y cols. (1987), desarrollan un ELISA para el diagnóstico de E. histolytica, utilizando dos diferentes anticuerpos policlonales para captura del parásito; la sensibilidad del método fue de 20 ng/ml, y aunque se determinó un número pequeño de falsos negativos, no hubo reactividad cruzada significativa con otros parásitos como E. nana, Hymenolepis nana, E. coli, Giardia lamblia, Strongyloides, Trichomonas, Ascaris y E. hartmanni; sin embargo, una muestra (6%) positiva a Iodamoeba, pero negativa a E. histolytica en microscopía se detectó como positiva en el ELISA. Por su parte Baumann y Gottstein (1987), reportaron haber obtenido una sensibilidad y especificidad del 93% en muestras de pacientes con amebiasis y otras protozoosis, pero este ensayo solo detectó el estadio de trofozoito de la ameba.

Otra protozoosis muy estudiada es la giardiasis, el coproinmudiagnóstico de esta parasitosis se logró desde 1982 por métodos no inmunoenzimáticos (Craft y Nelson 1982). Posteriormente, Ungar y cols. (1984), establecieron el inmudiagnóstico de giardiasis mediante el ensayo inmunoenzimático en heces humanas; por medio del ELISA pudieron detectar entre 37 y 375 trofozoitos de G. lamblia en cultivo y de 12.5 a 125 quistes en heces. Se obtuvieron 39 muestras de individuos con giardiasis, de los cuales

36 (92%) fueron positivos por ELISA, los falsos negativos correspondieron a muestras de individuos con pocos parásitos en el excremento; la especificidad fué del 98%. Green y cols. (1985) estandarizaron otro ELISA para la detección de coproantígenos de giardia en humanos; la sensibilidad del método excedió el 98% y su especificidad fué del 100% tanto por colorimetría como en interpretación directa visual. Las investigaciones en el inmunodiagnóstico de esta parasitosis continuaron, Rosoff y Stibbs (1986) identificaron un antígeno específico de G. lamblia de 65 Kd en el excremento de individuos con giardiasis, esta proteína se detectó en el 90% de los casos clínicos analizados y en el 11% de individuos con diarrea crónica, quienes fueron negativos en la observación microscópica.

En cestodiasis, se tienen informes del desarrollo de métodos inmunoenzimáticos para detección de coproantígenos para H. diminuta, Taenia hydatigena, T. solium y para T. saginata. Allan y Craig (1989), reportan un ELISA para la detección de coproantígenos de Hymenolepis diminuta en ratas infectadas experimentalmente; el ensayo detectó 400 ng de proteína de H. diminuta/ml de sobrenadante de heces y 30 ng/ml de antígeno en solución; los niveles de antígenos comenzaron a detectarse desde los 7 días y presentan un máximo a los 20 días postinfección. Posterior al tratamiento con praziquantel, se presentó un incremento en los niveles de antígenos, el cual decreció hasta valores normales en el día 7 postratamiento. Cuando se probaron

sobrenadantes de heces de animales parasitados con H. microstoma, H. citelli, D. ditrenum, Necator americanus, Strongyloides rati y Nematospiroides dubius, todos resultaron negativos en el ELISA. Por su parte Deplazes y cols. (1990), desarrollaron un ELISA para la detección de antígenos solubles de T. hydatigena en heces de perros, utilizaron un anticuerpo policlonal dirigido contra antígenos de excreción y secreción del parásito para la captura del antígeno; el ensayo permitió detectar 200 ng de antígeno de T. hydatigena por gramo de heces. El ELISA se comparó con la observación al microscopio de huevos y/o proglotidos del parásito en animales infectados experimentalmente; mediante ELISA se detectaron los animales infectados a partir del día 18, mientras que por microscopía, únicamente desde el día 57 postinfección. Al eliminar al parásito mediante drogas cestocidas, la detección de antígenos se negativizó en el sexto día postratamiento. La especificidad del ensayo se evaluó probando antígenos de excreción-secreción de T. saginata, T. taeniaeformis, T. solium, T. crassiceps, Echinococcus granulosus, E. multilocularis, Mesocestoides corti, Dipylidium caninum, Diphyllobothrium latum, Toxocara canis, Salmonella typhimurium y Escherichia coli; hubo reacción cruzada con las cuatro especies de Taenia, dicha reacción no se presentó con antígenos derivados de E. granulosus, E. multilocularis, D. caninum, M. corti, D. latum, T. canis y antígenos de enterobacterias; en muestras de perros infectados naturalmente con Trichuris vulpis, T. canis y acantocéfalos tampoco hubo reacción cruzada; adicionalmente, estos autores informaron que

los antígenos en las heces no permanecen inmunológicamente estables por mas de 5 días cuando el excremento se mantuvo a +25°C ó 4°C (Deplazes y cols., 1990).

En cuanto al inmunodiagnóstico de la teniasis por T. solium, Allan y cols. (1990), estandarizaron un ELISA utilizando el modelo de teniasis en el hamster dorado, se demostró que mediante este ensayo se pudo detectar productos antigénicos de la tenia en las heces de los animales desde el décimo día postinfección. Al probar el ELISA en once individuos con teniasis confirmada, se vió que el método también sirvió para detectar los casos de teniasis humana, dos de estos portadores fueron sometidos a tratamiento cestocida, se volvieron negativos en el ELISA a los seis días de haber recibido el tratamiento. Sin embargo, mediante este método no fue posible distinguir entre ambas especies de Taenia. Recientemente se publicó un trabajo de detección de coproantígenos de T. saginata en humanos, por medio del ELISA; se probaron muestras de heces de 23 personas parasitadas con T. saginata, 40 de individuos sanos y 100 muestras de personas con otras parasitosis intestinales. El ensayo detectó 70 ng del antígeno de T. saginata en solución y 140 ng/ml del mismo en heces; la sensibilidad y especificidad del método fue del 87% y 95% respectivamente, hubo falsos positivos en cuatro muestras libres de helmintos y en una mas con huevos de Ascaris lumbricoides y Trichuris trichiura; por microscopía, la teniasis se diagnosticó en el 62% de los portadores (Deplazes y cols., 1991).

En nuestro país no se han desarrollado pruebas inmunológicas que detecten antígenos en heces para identificar a los portadores de la T. solium, dada la importancia que tiene la identificación temprana de los individuos teniásicos para el control y/o erradicación de esta parasitosis, es imperativo desarrollar pruebas confiables para poder diagnosticar a los portadores de la forma adulta de T. solium con alta eficiencia.

III. HIPOTESIS.

1. La teniasis por T. solium se puede mantener en el hamster dorado por tiempo prolongado mediante el uso de esteroides.
2. En el modelo experimental con T. solium en el hamster dorado se pueden detectar coproantígenos de la tenia por medio de pruebas inmunoenzimáticas (ELISA).
3. El ELISA desarrollado para el modelo experimental puede emplearse para el diagnóstico de la infección natural por T. solium en el ser humano.

IV. OBJETIVOS

1. Reproducir la teniasis por T. solium en el hamster dorado y evaluar su duración con o sin esteroides.
2. Estandarizar y evaluar el ensayo inmunoenzimático para la detección de coproantígenos de T. solium en hamsters infectados experimentalmente.
3. Aplicar y evaluar el ensayo inmunoenzimático para la detección de antígenos de T. solium en el humano.

V. MATERIALES Y METODOS.

1. OBTENCION DEL MODELO EXPERIMENTAL DE TENIASIS POR T. solium EN EL HAMSTER DORADO.

La teniasis inducida por Taenia solium en el presente trabajo fue realizada en el hamster dorado (Mesocricetus auratus) y se siguió el procedimiento descrito por Verster (1971) con algunas modificaciones. Se emplearon 56 machos y 43 hembras de 7 a 38 semanas de edad, los cuales fueron previamente desparasitados con un tratamiento con mebendazole y praziquantel por vía oral mediante cánula durante tres días consecutivos con dosis de 20 mg y 30 mg/kg de peso respectivamente. Desde el momento de su recepción y hasta el final del experimento los animales se mantuvieron en jaulas lavadas meticulosamente que contenían un colchón de aserrín esterilizado en autoclave, su alimentación consistió en agua destilada acidificada y alimento comercial balanceado para roedores.

1.1 Obtención de cisticercos de T. solium.

Los cisticercos de T. solium se extrajeron por disección del músculo esquelético de cerdos cisticercosos recién decomisados por el Departamento de Inspección Sanitaria del rastro de Ferrería de la Ciudad de México, D.F. y del Rastro Municipal de Morelia, Mich. Con los cisticercos se formaron dos grupos, uno se empleó para la infección de los hamsters y el segundo grupo se sometió a la prueba de evaginación in vitro utilizando 25% de bilis de bovino en RPMI

(Gibco) según técnica adaptada por Correa y cols. (1987), para cuantificar la proporción de cisticercos viables.

1.2 Infección experimental en el hamster dorado y administración de esteroides.

Durante el transcurso de este trabajo se tuvieron algunas dificultades para conseguir carne de cerdo con cisticercos, debido a esto la infección en el modelo experimental se hizo con hamsters de diferentes lotes que estuvieron disponibles en el momento en que se consiguió el material infectante. Cinco grupos de animales se infectaron por vía oral con 5 ó 8 cisticercos de T. solium, a continuación se les aplicó una dosis de 4 mg de acetato de metil prednisolona (Depo-medrol, Upjohn) por animal por vía intramuscular.

1.3 Grupos experimentales y protocolo de infección en el modelo teniasis-hamster dorado (Cuadro 1).

Grupo I.

El primer grupo experimental estuvo formado por 20 animales, 10 machos y 10 hembras de 13 semanas de edad, los cuales se infectaron con cinco cisticercos por animal; se le aplicaron tres inyecciones intramusculares de acetato de metil prednisolona, cada una de 4 mg en los días 1 (día de la infección), 14 y 28 postinfección (Cuadro 1).

CUADRO No. 1. GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLO DE INFECCION DE LOS HAMSTERS DORADOS CON T. solium

Grupo	No. animales	sexo	Edad semanas	Cisticercos ingeridos	Esteroide* aplicación	día	Duración de la infección																																																																																																
I	10		13	5	3	1,14,28	45																																																																																																
	10		13					II	13		38	8	2	1, 14	45	3		19	10		38	8		19	2		7	III	15		9	8	2	1, 14	40	IV	6		13	8	1	1	100	1		23	8		13	V	6		13	8	0		60	1		23	CONTROL							Tiempo de sacrificio		3		13	0	4		100		3		13					TOTAL 99									56								43	
II	13		38	8	2	1, 14	45																																																																																																
	3		19																																																																																																				
	10		38																																																																																																				
	8		19																																																																																																				
	2		7																																																																																																				
III	15		9	8	2	1, 14	40																																																																																																
IV	6		13	8	1	1	100																																																																																																
	1		23																																																																																																				
	8		13																																																																																																				
V	6		13	8	0		60																																																																																																
	1		23																																																																																																				
CONTROL							Tiempo de sacrificio																																																																																																
	3		13	0	4		100																																																																																																
	3		13																																																																																																				
TOTAL 99																																																																																																							
	56																																																																																																						
	43																																																																																																						

* acetato de metil prednisolona (4 mg/animal).

Grupo II.

Este segundo grupo se formó con 36 animales, 16 machos y 20 hembras de diferentes edades (Cuadro 1). Los hamsters se infectaron con ocho cisticercos por vía oral; además se les aplicaron dos dosis de esteroide, cada una de 4 mg en los días 1 y 14 de la infección.

Grupo III.

El tercer grupo de experimentación se formó con 15 hamsters machos de 9 semanas de edad, se emplearon ocho cisticercos para infectar a cada animal y se les aplicó 4 mg del esteroide el día 1 y la segunda dosis 14 días postinfección (Cuadro 1).

Grupo IV.

Este grupo se formó con 15 animales, seis machos y nueve hembras de diferentes edades (Cuadro 1); estos animales también se infectaron con ocho cisticercos por vía oral y se les aplicó una dosis única del esteroide (4 mg) en el día de la infección (Cuadro 1).

Grupo V.

Este último grupo de animales infectados lo conformaron siete hamsters, seis machos de 13 semanas de edad y una hembra de 23 semanas de edad; en este grupo no se aplicó esteroide, los animales se infectaron solamente con ochos cisticercos por vía oral (Cuadro 1).

Grupo Control.

Este grupo quedo formado por seis animales, tres machos y tres hembras de 13 semanas de edad. Estos hamsters no se infectaron con T. solium pero si recibieron una dosis única de esteroides (4 mg) en el primer día de experimentación.

1.4 Obtención del estadio adulto de T. solium.

Las tenias adultas se obtuvieron de animales de los grupos I y II infectados experimentalmente en diferentes días postinfección. Los hamsters se sacrificaron en cámara letal con éter, se les extrajo el intestino delgado, se colocó en una caja de petri con solución salina (0.15M NaCl) amortiguada con fosfatos de sodio (0.02M NaH_2PO_4 , 0.0014M KH_2PO_4), pH 7.2 (SSAF) y se abrió a todo lo largo para liberar a las tenias y verificar que no estuviera parasitado con otros géneros. En la identificación de las tenias se consideraron las siguientes características morfológicas: escólex provisto con cuatro ventosas musculares inermes, la presencia de un rosetelo armado con doble corona de ganchos, el largo y ancho del estróbilo, y cuando fue posible se observó, la disposición alterna de de los poros genitales en proglótidos sucesivos (Lapage, 1976).

2. ESTANDARIZACION Y EVALUACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO PARA LA DETECCION DE COPROANTIGENOS DE T. solium EN HAMSTERS DORADOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

En la estandarización del ELISA para antígenos de T. solium se siguió el método descrito por Engvall y Perlmann (1972) con modificaciones; la detección de antígenos del parásito se hizo por medio del ensayo de captura con doble anticuerpo policlonal. Las heces de los animales se disolvieron en SSAF adicionada con detergente para solubilizar a los antígenos. Se determinó la sensibilidad y especificidad del método, así como el efecto de la desparasitación en la dinámica de detección de coproantígenos.

2.1 Elaboración del antígeno de T. solium.

Se preparó un extracto crudo de tenias adultas completas, según técnica descrita por Espinoza y cols. (1982) con ligeras modificaciones: las tenias adultas obtenidas del intestino delgado de los hamsters, se lavaron cinco veces en solución salina fisiológica (0.15M NaCl, SSF) y se homogenizaron con un Polytron (Brinkman Instruments) en SSAF conteniendo cloruro de potasio 3 M durante 1 minuto, manteniendo el extracto en un baño de hielo. Este procedimiento se repitió hasta que los parásitos quedaron perfectamente homogenizados. El extracto se mantuvo durante toda la noche en agitación ligera a 4°C; posteriormente se centrifugó (Sorvall RT6000) a 2000g durante 30 minutos a 4°C, se dializó contra SSAF y se volvió a centrifugar (Beckman J2-21) a 24000g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta

su utilización. Esta misma metodología se empleó para preparar extractos crudos de los diferentes parásitos colectados. El contenido de proteína total de los extractos antigénicos se determinó siguiendo el método de Lowry y cols. (1951), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

2.2 Obtención de otros parásitos.

Se obtuvieron fasciolas adultas de hígados de bovinos recién decomisados en el rastro de la Ciudad de Toluca, Edo. de México, las cuales se extrajeron por disección, se lavaron en SSF y se transportaron en refrigeración hasta el laboratorio. Se sacrificaron hamsters infectados naturalmente con Hymenolepis nana, se extrajo el intestino delgado y se procedió a abrirlo para separar las hymenolepis que se lavaron con SSF. También se obtuvo un espécimen de T. saginata por desparasitación con niclosamida de un individuo adulto, algunas porciones de la tenia se lavaron con SSF. Todos estos parásitos se mantuvieron en congelación a -20°C hasta el momento de su uso.

2.3 Obtención de suero policlonal anti-T. solium.

Con el objeto de obtener anticuerpos anti-T. solium, se inmunizó un conejo blanco Nueva Zelanda de 2 kg peso y 3 meses de edad con extracto antigénico de tenias adultas, obtenidas de la infección experimental de los hamsters. Los conejos se sangraron antes de ser inmunizados, se obtuvieron 10 ml de sangre; los que

fueron procesados para obtener suero; se hicieron alícuotas de éste y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

En cada inmunización se emplearon 5 mg/ml de antígeno de T. solium. La primera dosis se aplicó en el día uno; se empleó un 1 ml de antígeno y 1 ml de adyuvante completo de Freund, los que se mezclaron perfectamente hasta formar una sola fase. El segundo refuerzo se inyectó en el día 15, se mezcló 1 ml de antígeno y 1 ml de adyuvante incompleto de Freund; ambas dosis se aplicaron por vía subcutánea en varias partes del dorso. Los 5 mg de antígeno de la tercera y cuarta inmunización se aplicaron solos por vía intramuscular en los días 30 y 45. Los sangrados se hicieron a partir del segundo refuerzo con antígeno y siete días después de cada inmunización, estos sueros también se almacenaron en alícuotas en congelación a -20°C .

2.3.1 ELISA para la determinación de anticuerpos anti-T. solium en suero de conejo hiperinmune.

Para comprobar la presencia de anticuerpos específicos contra T. solium en el suero del conejo hiperinmunizado, se probó la actividad del mismo por medio de un ELISA según técnica descrita por Engvall y Perlmann (1972) con ligeras modificaciones:

a. Acoplamiento del antígeno a un soporte sólido. Se usaron placas para microtitulación de 96 pozos (Inmulon I, Dynatech Labs. Inc.). Se colocó en cada pozo de la placa 100 μl del

antígeno de *T. solium* a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador de carbonatos (0.03M Na_2CO_3 , 0.069M NaHCO_3), pH 9.6. Se incubó toda la noche a 4°C.

b. Lavado de la placa. Se lavaron los pozos tres veces con 200 μl de SSAF adicionada con tween 20 al 0.05% (SSAF-T) durante cinco minutos cada vez.

c. Adición del primer anticuerpo. Se prepararon diluciones 1:1000 en SSAF-T de las diferentes muestras de suero del conejo hiperinmune, se adicionaron 100 μl /pozo de cada dilución por duplicado y se incubaron durante dos horas a 37°C.

d. Se repitió el paso del inciso b.

e. Adición del segundo anticuerpo. Se empleó como segundo anticuerpo el conjugado anti-IgG de conejo producido en cabra (Sigma, Chem. Co.), acoplado a fosfatasa alcalina. Se adicionó a cada pozo 100 μl del conjugado diluido 1:500 en SSAF-T y se incubó por dos horas a 37°C.

f. Se repitió el paso del inciso b.

g. Adición del sustrato. Como sustrato se empleó p-nitrofenilfosfato disódico (Sigma Chem. Co.); se disolvieron 10 mg del sustrato en 2.5 ml de agua y se aforó a 10 ml con amortiguador

de dietanolamina al 10% pH 9.8, se adicionaron 100 μ l/pozo del sustrato y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

h. Se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro para ELISA (Bio-Rad, modelo 2550) con un filtro para 405 nm.

2.4 Obtención de IgG de conejo anti-T. solium.

La purificación de la IgG del suero hiperinmune, se realizó por cromatografía de afinidad en una columna de Proteína A sefarosa CL 4B (Sigma Chem. Co.) de 1.5x2.5 cm. Antes de correr la columna ésta se lavó y equilibró con SSAF, se adicionaron 2 ml de suero de conejo y se dejó adsorber la IgG en la columna durante toda la noche a 4°C; la IgG se eluyó con glicina 0.1 M pH 2.8. Se colectaron fracciones de 1.3 ml, la densidad óptica de las fracciones se leyó en un espectrofotómetro (Beckman DU-65) a 280 nm para determinar la presencia de proteínas. Se graficó la densidad óptica contra el número de fracción y se unieron las fracciones correspondientes al pico de elución que contenía el material unido a la columna. La IgG se dializó exhaustivamente contra SSAF, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y cols. (1951) y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta el momento de su uso.

2.4.1 Preparación del conjugado de IgG anti-T. solium con biotina.

Se ajustó la concentración de proteína de la IgG a 1 mg/ml, posteriormente se dializó contra bicarbonato de sodio (0.1M NaHCO₃)

pH 8.0 durante 12 horas a 4°C. Por cada miligramo de IgG se adicionaron 200 μ l de una solución 6 mM del ester de N-hidroxisuccinimida biotina (Pierce Chem. Co.). La mezcla se dejó reaccionar en la obscuridad a temperatura ambiente durante 4 horas con agitación lenta. La IgG biotinilada se dializó exhaustivamente contra SSAF y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta el momento de su uso.

La actividad de la IgG biotinilada se probó adsorbiendo el anticuerpo marcado con biotina en placas de microtitulación de 96 pozos (Inmulon I, Dynatech Labs. Inc.). Se prepararon diluciones 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:2000 de la IgG marcada en amortiguador de carbonatos, se adicionaron 100 μ l/pozo de cada dilución por duplicado y se incubó toda la noche a 4°C; al día siguiente se lavaron los pozos con SSAF-T, posteriormente se adicionó 100 μ l/pozo de avidina peroxidasa (Cappel Organon Tek. Co.) diluída 1:2000 en SSAF-T suplementado con albúmina humana al 1% (SSAF-TA), se incubó por dos horas a 37°C. Finalmente se agregó el sustrato o-fenilendiamina (Sigma Chem. Co.) en amortiguador de citratos (0.1 M) pH 4.5, conteniendo 0.4 μ l/ml de peróxido de hidrógeno al 30%; la reacción colorida se detuvo adicionando 50 μ l/pozo de ácido sulfúrico. Los valores de absorbancia se leyeron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 492 nm.

2.5 Toma de muestras de heces en el modelo experimental.

Durante el transcurso de las infecciones los hamsters se

mantuvieron separados en forma individual en jaulas para ratón, la materia fecal de 24 horas de cada animal se tomó directamente de la cama y se procesó para obtener el sobrenadante. Las muestras de heces se colectaron diariamente, comenzando desde un día previo a la infección hasta el momento del sacrificio de los animales. Las muestras de los grupos I y II fueron empleadas por el grupo de parasitólogos de Liverpool, G.B. y las de los grupos restantes se utilizaron en esta tesis.

2.6 Procesamiento de las muestras de heces para el ELISA.

Con el objeto de solubilizar los antígenos parasitarios presentes en las muestras individuales de excremento, se hizo inicialmente un ensayo en heces de hamsters desparasitados y no infectados (control negativo) para determinar los parámetros óptimos de dilución y centrifugación; las muestras control negativo se solubilizaron en SSAF adicionado con Tween 20 al 0.3% (SSAF-T.3%) con diferentes proporciones peso a volumen (p/v): 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5, se les adicionó 100 μ g/ml del antígeno de T solium; las heces se homogenizaron mediante agitación manual y posteriormente se sometieron a las siguientes fuerzas centrífugas: 200g, 950g, 1400g, 2000g y 4000g; el sobrenadante se colectó y probó posteriormente en el ELISA. Una vez conocidos los parámetros óptimos de dilución y centrifugación, las heces frescas de los animales infectados se trabajaron bajo estas condiciones.

2.7 Estandarización del ELISA para detección de antígenos de T. solium en heces de hamster.

a. Acoplamiento del primer anticuerpo a un soporte sólido. Se usaron placas para microtitulación de 96 pozos (Costar EIA/RIA), de fondo plano. Se diluyó la IgG anti-T. solium en amortiguador de boratos (0.1 M) salino (0.07M) pH 8.2 (ABS) hasta obtener concentraciones de 20, 30 y 40 µg/ml; se cubrió cada pozo con 100 µl del anticuerpo por duplicado y se incubó toda la noche a 4°C.

b. Lavado de la placa. Se realizaron tres lavados de los pozos con 200 µl de SSF adicionada con Tween 20 al 0.05% (SST) durante cinco minutos cada vez.

c. Bloqueo de la placa. Se agregó 200 µl/pozo de SSAF-T.3% durante 60 minutos a temperatura ambiente.

d. Se repitió el paso del inciso b.

e. Adición de la muestra problema. Antígeno en solución, antígeno en heces y muestras de individuos o hamsters infectados. Se prepararon diluciones seriadas del antígeno de T. solium en SSAF-T.3%, se adicionaron 100 µl/pozo de cada dilución por duplicado y se incubó durante dos horas a 37°C. Este mismo procedimiento se realizó con muestras de heces de humanos y de hamsters no parasitados, adicionadas con antígeno de T. solium.

- f. Se repitió el paso del inciso b.
- g. Adición del segundo anticuerpo. Se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo biotinilado en SSAF-TA hasta obtener concentraciones de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$, se adicionaron 100 μl /pozo de cada dilución por duplicado y se incubó durante dos horas a 37°C.
- h. Se repitió el paso del inciso b.
- i. Adición de la enzima. Se diluyó la enzima peroxidasa conjugada con avidina (Cappel Organon Tek. Co.) 1:2000 en SSAF-TA, se adicionaron 100 μl /pozo y se incubó durante dos horas a 37°C.
- j. Se repitió el paso del inciso b.
- k. Adición del sustrato. Como sustrato se empleó o-fenilendiamina en amortiguador de citratos (0.1 M) pH 4.5 conteniendo 0.4 $\mu\text{l/ml}$ de peróxido de hidrógeno al 30%, se adicionaron 100 μl /pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en la obscuridad, posteriormente se detuvo la reacción colorida con la adición de 50 μl /pozo de ácido sulfúrico (1 M).
- l. Los valores de absorbancia se midieron en un lector de ELISA (Bio-Rad modelo 2550) a 492 nm.

m. Controles empleados en la prueba. Como controles negativos se usaron sobrenadantes de heces de hamsters desparasitados y no infectados; los controles positivos fueron sobrenadantes de heces de hamsters no parasitados, a las cuales se les añadió antígeno de T. solium a una concentración de 100 ug/ml.

2.7.1 Determinación del criterio de positividad en la prueba de ELISA.

El criterio de positividad de una muestra individual se determinó cuando su valor de absorbancia fué igual o mayor al punto de corte del ensayo. El punto de corte se obtuvo al sumar la media mas tres veces la desviación estandar de los valores de absorbancia observados en un grupo de 64 hamster libres de parásitos gastroentéricos y en el grupo control.

2.8 Captura de antígenos heterólogos de parásitos con el sistema de anticuerpos policlonales anti-T. solium.

Con la finalidad de verificar si mediante el ensayo desarrollado se podían capturar antígenos de parásitos diferentes a T. solium, se probaron los siguiente extractos antigénicos: T. saginata, T. solium, Fasciola hepatica, H. nana, Wellcomeia evoluta, Monoecocestus americana, T. cracisseps, T. pisiformis, fluido vesicular de T. hydatigena, Echinococcus granulosus, y Echinorhyncus gadi a una concentración de 25 µg/ml en el ELISA. Los cuatro primeros extractos antigénicos se elaboraron en el

laboratorio (ver inciso 2.1), los restantes fueron donados por el Dr. Emilio Coltorti del Centro Panamericano de Zoonosis.

2.9 Evaluación del número y tamaño de las tenias y su relación con la presencia de antígenos en el ELISA.

Durante el transcurso de las infecciones experimentales, se sacrificaron hamsters al azar en diferentes días postinfección para comprobar la parasitosis; se extrajo el intestino delgado, se procedió a liberar a los céstodos y se realizó la identificación de los mismos (ver inciso 1.4). Por otra parte, se registró el número de tenias implantadas en el intestino y el tamaño de las mismas. Se colectó la materia fecal contenida en el intestino grueso, se procesó para obtener el sobrenadante y éste se empleó en el ELISA para antígenos de T. solium.

2.10 Sensibilidad y especificidad del ELISA para detección de antígenos de T. solium en el modelo experimental.

Los parámetros de sensibilidad y especificidad del ensayo se determinaron en los animales de los grupos III, IV y V con teniasis comprobada mediante necropsia o por tratamiento cestocida; también se incluyeron a los animales del grupo control no infectado y a un grupo extra de 13 hamsters infectados naturalmente con H. nana (ver inciso 4).

2.11 Efecto de la desparasitación en el ensayo de detección de antígenos.

La acción de antiparasitarios sobre la dinámica de detección de antígenos de T. solium en el modelo experimental, se estudió al administrar una droga cestocida por vía oral. Se seleccionaron tres animales del grupo III y seis hamsters del grupo IV, los cuales fueron diagnosticados como teniásicos mediante el ELISA para antígenos, se formaron tres grupos con estos nueve animales y se les administró una sola toma de praziquantel/animal por vía oral mediante cánula a dosis de 30 mg/kg de peso, en el día 21, 29 o el día 39 postinfección. El excremento se colectó diariamente desde el día de la infección de los hamsters, hasta el momento en que se administró la droga, y en los siguientes 14 días después del tratamiento; las muestras de heces se procesaron para obtener el sobrenadante y éste se usó en el ensayo, el precipitado de materia fecal se revisó por la técnica macroscópica de tamizado de heces. Los hamsters se sacrificaron a los 14 días post-desparasitación, se extrajo el intestino delgado y se revisó para comprobar la presencia o ausencia de parásitos.

3. APLICACION Y EVALUACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN LA DETECCION DE ANTIGENOS DE T. solium EN EL SER HUMANO.

Una vez que se tuvo estandarizado y evaluado el ELISA para antígenos de T. solium en heces de hamster, y que se probó en

infecciones experimentales controladas, se procedió a aplicar el método en el hospedero natural del parásito, el ser humano.

3.1 Toma de muestras en el hospedero definitivo.

Se colectaron muestras de excremento de personas que acudieron a los servicios de Medicina Preventiva del Hospital Infantil de la Secretaría de Salud y al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Químico Farmacobiólogo de la Universidad Michoacana, en la Ciudad de Morelia, Mich. durante tres meses. A todas las personas incluidas en este estudio se les solicitó una porción de materia fecal correspondiente a la primera evacuación del día; las muestras se procesaron por los siguientes estudios coproparasitoscópicos (CPS): CPS directo con solución salina fisiológica (0.15 M) y lugol, CPS por flotación con sulfato de zinc y CPS por sedimentación con formol-éter (Salazar y De Haro, 1980). Por otra parte, el grupo de Parasitología de la Escuela de Medicina Tropical de Liverpool, U.K. obtuvo 11 muestras de heces de ciudadanos Chinos residentes de una zona endémica para *T. solium*. Se trabajaron un total de 127 muestras, las cuales se procesaron para obtener el sobrenadante y éste se usó en el ELISA.

3.2 ELISA para la detección de antígenos en heces humanas.

El ELISA con los sobrenadantes de las muestras de heces humanas, se hizo igual al ensayo con heces de hamsters; en el estudio para humanos se adicionaron dos controles más. Control negativo humano: sobrenadante del excremento de un menor de ocho

meses que no consumía carne de cerdo y negativo a parásitos gastroentéricos según los exámenes CPS realizados. Control positivo humano: sobrenadante de heces del mismo menor, adicionado con 100 µg/ml de antígeno de T. solium. En el ensayo para humanos también se calculó el punto de corte, éste se obtuvo a partir de los valores de absorbancia obtenidos en el grupo de individuos parasitológicamente sanos (ver inciso 2.7.1); las muestras de pacientes que fueron igual o mayores al punto de corte se consideraron como positivas.

3.3 Sensibilidad y especificidad del ELISA para detección de antígenos de T. solium en el ser humano.

Para determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA en el hospedero definitivo, se tomaron en cuenta los valores de absorbancia de las muestras de materia fecal humana analizadas en este estudio, con excepción de la muestra del portador de Taenia sp. que fue descartada (ver inciso 4).

4. ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de cisticercos viables, en la reproducción del modelo experimental y en el tamaño y número de tenias recuperadas, se organizaron y resumieron por medio de técnicas estadísticas descriptivas (Daniel, 1987). La evaluación del ELISA desarrollado se realizó siguiendo los

procedimientos descritos por Schwabe y cols. (1977), determinando los parámetros de la prueba como sigue:

Sensibilidad: proporción de enfermos que fueron positivos en la prueba (verdaderos positivos), obtenida al dividir el número de verdaderos positivos entre el número total de verdaderos positivos mas el número de enfermos que fueron negativos a la prueba (Cuadro 2).

Especificidad: es la proporción de individuos sanos que fueron negativos a la prueba (verdaderos negativos), obtenida al dividir el número de casos verdaderos negativos entre el número de individuos sanos que fueron positivos a la prueba (falsos positivos) mas el número de verdaderos negativos (Cuadro 2).

CUADRO No. 2 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE UNA PRUEBA SEROLOGICA

Resultado de la prueba	Diagnóstico enfermos	verdadero sanos	Total
Positivo	a	b	a + b
Negativo	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

- a. Animales enfermos que fueron positivos a la prueba.
 - b. Animales sanos que fueron positivos a la prueba (falsos positivos).
 - c. Animales enfermos que fueron negativos a la prueba (falsos negativos).
 - d. Animales sanos que fueron negativos a la prueba.
- a + c Población afectada (verdadera prevalencia).
- b + d Población sana (1-P).
- a + b Falsa prevalencia.

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

Los resultados del ELISA obtenidos en los diferentes grupos experimentales se analizaron por medio del análisis de varianza. La relación entre absorbancia con el número y tamaño de las tenias se determinó mediante el análisis de regresión lineal simple (Daniel, 1977).

VI. RESULTADOS.

1. OBTENCION DEL MODELO EXPERIMENTAL DE TENIASIS EN EL HAMSTER DORADO.

1.1 Susceptibilidad de los hamsters a la infección.

La teniasis en los hamsters se confirmó mediante necropsia de los animales, por desparasitación con tratamiento cestocida y/o mediante el ELISA para antígenos; debido al tratamiento con esteroide al que fueron sometidos los hamsters hubo animales que fallecieron y no fue posible revisar el intestino delgado para comprobar la presencia o ausencia de tenias, por lo cual fueron excluidos del estudio. La teniasis se implantó en el 97% de los hamsters utilizados; el mayor porcentaje de infección se obtuvo en hembras (100%), mientras que los machos presentaron la parasitosis en el 94% de los casos, solo tres de los machos inoculados no se infectaron (Cuadro 3). En cuanto a la infección de los hamsters con respecto a la edad, ésta se logró tanto en animales jóvenes de siete semanas como en adultos de 38 semanas, de los tres machos que no se infectaron, dos eran de 19 semanas y uno de 38 semanas.

1.2 Efecto del tratamiento con esteroides en la obtención del modelo experimental.

En el Grupo I de animales infectados con tres dosis de esteroide, la susceptibilidad a la infección y la mortalidad obtenida a los 40 días de experimentación fue de 100% y 90% respectivamente (Cuadro 3). Debido a la alta mortalidad registrada, se decidió probar con menos dosis de esteroide, para lo cual se

infectaron cuatro grupos mas de hamsters (ver inciso 1.3). Los resultados obtenidos mostraron que la sobrevivencia de los animales fue mayor conforme se disminuyó la dosis del esteroide, de esta manera tenemos que el grupo infectado sin esteroide tuvo una sobrevivencia del 100%; al emplear una dosis de esteroide, la sobrevivencia decreció al 93% y con dos dosis de esteroide fue del 70 y 67% en los grupos II y III respectivamente a los 40 días postinfección. Los esteroides también influyeron en la persistencia de la parasitosis en el modelo experimental; en infecciones cortas de menos de 40 días los porcentajes de infección en casi todos los grupos fueron del 100%, solamente el grupo II que recibió dos dosis de esteroide mostró una infección del 92%, sin embargo el grupo III que fue sometido al mismo tratamiento presentó la parasitosis en el 100% de los animales. En infecciones que duraron mas de 40 días, se observó que los animales infectados sin el uso de esteroide comenzaron a perder la infección a partir del día 43 y a los 56 días unicamente el 14% de los animales retuvieron la parasitosis; por otra parte, los hamsters que recibieron una sola dosis de esteroide mantuvieron la infección hasta por 90 días.

La implantación de la infección también se vió influenciada al administrar diferentes dosis de esteroide, a los 45 días postinfección la parasitosis se observó en el 86% de los animales inoculados sin esteroide, con el empleo de una dosis de esteroide la parasitosis se encontró en el 100% de los animales infectados; con dos dosis la persistencia de la infección se vió ligeramente

CUADRO No. 3. INFECCION CON *T. solium* EN HAMSTERS DORADOS

Grupo	No. animales	Esteroides(1) aplicación día		Infeccion(2) %	Mortalidad %
I	10 machos	3	1,14,28	100	100
	10 hembras			100	80
II	16 machos	2	1,14	81	44
	20 hembras			100	20
III	15 machos	2	1,14	100	33
IV	6 machos	1	1	100	17
	9 hembras			100	0
V	6 machos	0		100	0
	1 hembra			100	0
Total				97	38
Control					
	3 machos	1	1	0	0
	3 hembras			0	0
Total				0	0

(1) Acetato de metilprednisolona (4 mg/animal).

(2) Datos tomados a los 40 días postinfección.

CUADRO No. 4. VIABILIDAD DE LOS CISTICERCOS DE *T. solium* USADOS EN LAS INFECCIONES DE LOS HAMSTERS DORADOS

Grupo	Cisticercos administrados	evaginación (%)	Infeccion(1) (%)
I	5	94	100
II	8	98	92
III	8	90	100
IV	8	66	100
V	8	91	100
Control	0		0

(1) Datos tomados a los 40 días postinfección.

disminuida a un 92% en el grupo II, mientras que se mantuvo en 100% en el grupo III (Cuadro 3). En infecciones que duraron mas de 45 días, se observó que los animales infectados sin el uso de esteroides comenzaron a perder la infección a partir del día 43, unicamente el 14% de los hamsters inoculados sin esteroides retuvieron la parasitosis durante 56 días, mientras que el 14% de los animales infectados con una sola dosis de esteroide mantuvieron la infección hasta 90 días.

Al analizar la mortalidad registrada en ambos sexos, se observó que en los hamsters machos siempre fue mayor en todas las infecciones realizadas, cuando se emplearon tres dosis de esteroide, se observó mortalidad del 100% en machos y 80% en hembras; con el uso de dos dosis de esteroide ésta disminuyó a 44 y 33% en machos (grupos II y III) y a 20% en hembras; con una sola dosis de esteroide, solo hubo mortalidad en los machos (17%) y cuando no se usaron esteroides no se registraron muertes en ningún sexo. Por otra parte, no se registraron muertes en los animales del grupo control que recibieron una sola dosis de esteroide (Cuadro 3).

1.3 Viabilidad de los cisticercos usados en las infecciones.

En las infecciones realizadas se usaron cisticercos de T. solium provenientes de cinco cerdos diferentes, la viabilidad de los mismos medida por la prueba de evaginación in vitro mostró que en cuatro de los cinco grupos la evaginación fue de 90 a 98% y solo

en un grupo fue del 66%; aún así la infección se logró implantar en el 97% de los hamsters empleados, con excepción de tres machos del grupo II que no se infectaron aunque la evaginación en este grupo fue la mas alta (98%) (Cuadro 4).

1.4 Tenias obtenidas en el modelo experimental del hamster dorado.

El intestino delgado de 31 animales que recibieron 0, 1 y 2 dosis de esteroide y ocho cisticercos se revisó en diferentes días postinfección (Figura 1). Se colectaron un total de 132 parásitos, todos presentaron un escólex con doble corona de ganchos, los cuales estaban dispuestos en dos hileras, una de ganchos cortos y otra de ganchos grandes, asimismo se observaron cuatro ventosas musculares inermes en el escólex; la presencia de poros genitales fue evidente en tenias de mas de 30 días, en cada proglótido se observó un poro genital lateral único, con un ordenamiento alternado en proglótidos sucesivos (Figura 2). El largo y ancho del estróbilo se incrementó conforme avanzaron los días postinfección, el tamaño de las tenias varió de 0.2 hasta 22 cm, registrándose el mayor incremento en la longitud en los primeros 30 días de la infección (Cuadro 5), en cuanto al ancho del estróbilo éste varió de 0.5 mm en tenias de 1-10 días a 2.5 mm en las tenias de 20-30 días. Por otra parte, se lograron obtener infecciones con una a siete tenias por animal, con una media observada de 4 parásitos; no se observaron infecciones mixtas con otros céstodos.

CUADRO No. 5. TAMAÑO Y NUMERO DE LAS TENIAS OBTENIDAS EN LAS DIFERENTES INFECCIONES

Grupo Hamster	Edad (semanas)	Días post-infección	No. de tenias	Tamaño de las tenias (cm)
II Dos aplicaciones de esteroide				
1 macho	38	7	5	0.5,0.7,0.9,1.1,1.2
2 macho	38	16	2	0.2,4.3
3 macho	19	17	7	0.2,4,4,4,4.8,7,7
4 macho	38	22	2	7,7
5 macho	38	22	6	7,9,10,10.5,11.6,18
6 macho	38	23	3	5.6,7.2,18
7 macho	38	23	5	4,8.9,11,13.5,18
8 hembra	38	24	1	5.6
9 hembra	38	24	3	0.2,0.2,0.2
10 hembra	38	24	5	0.5,0.5,1,20
11 hembra	19	27	5	6.4,9,11.2,18,22
12 hembra	19	27	6	5.4,11,14,15,20,22
13 hembra	19	27	7	3.5,6,9,11,12.3,20,22
14 hembra	7	28	1	7
15 hembra	7	28	4	8,11,13.5,19
III Dos aplicaciones de esteroide				
1 macho	9	10	5	0.5,0.5,0.5,0.5,0.5
2 macho	9	10	6	1,1,1,1,1,1
3 macho	9	22	3	0.5,3.5,4.5
4 macho	9	27	4	1.5,1.7,3.5,3.5
5 macho	9	29	6	1,2,3,4,7,8
6 macho	9	31	2	4.5,6
7 macho	9	31	5	1,1.8,2.8,9,13
8 macho	9	35	6	1.9,3.5,3.5,7.5,10,12
9 macho	9	43	2	3.5,12
IV Una aplicación de esteroide				
1 hembra	13	7	4	0.4,0.4,0.4,0.6
2 hembra	13	20	6	1.3,3,7,9,10,11
3 macho	13	43	7	2,10,10,10,12,12.5,13
4 macho	13	67	6	0.4,0.8,1.8,2.3,15,17
V Sin esteroide				
1 macho	13	10	6	0.3,0.3,0.5,0.5,0.6,0.9
2 macho	13	26	1	2.5
3 hembra	23	59	1	11



Figura 1. A) Disección del intestino delgado de un hamster infectado experimentalmente con cisticercos de *T. solium* para liberar a las tenias; B) 6 ejemplares de *T. solium* obtenidas a los 22 días de infección, los escólicocitos se encuentran en el extremo izquierdo.

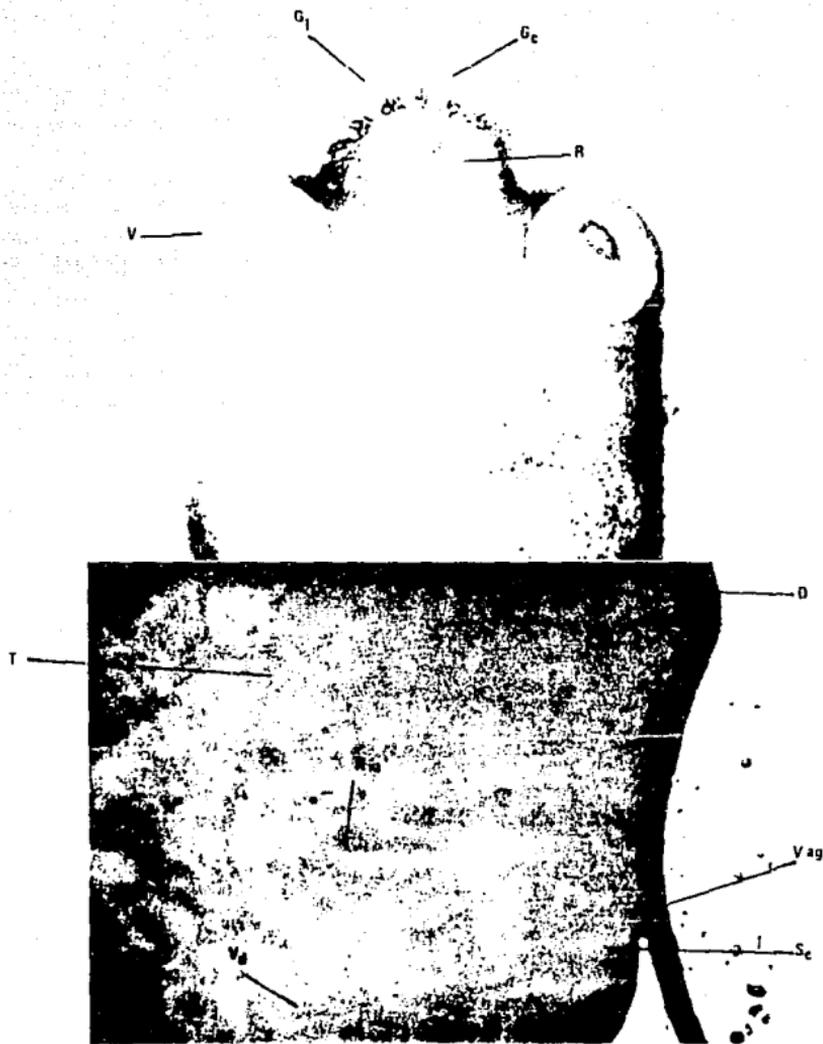


Figura 2. A) Esófago de *L. selam*. V, vittas; R, rostrilo; Gc, ganchos cortos; G1, ganchos largos.
 B) Estómago de *L. selam*. T, testículos; D, división entre proglótidos; Sc, saco del cirro; Vd, vaso deferente; Vag, vagina; Km, ramificaciones del útero.

2. ESTANDARIZACION Y EVALUACION DEL ELISA PARA LA DETECCION DE COPROANTIGENOS DE T. solium EN HAMSTERS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

2.1 Estandarización del ensayo.

Los valores de absorbancia obtenidos al probar las diferentes concentraciones del antígeno, así como del primer y segundo anticuerpo se presentan en el Cuadro 6 y en la figura 3. En todas las combinaciones de anticuerpos usadas se observó una relación de la absorbancia directamente proporcional con respecto a la concentración del antígeno utilizado. No hubo diferencias estadísticas significativas en las lecturas de absorbancia registradas en los 9 grupos ensayados ($P > 0.005$). Con base en estos datos se decidió emplear el ELISA en lo sucesivo con 20 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de captura (1er anticuerpo) y 20 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo conjugado a biotina (2º anticuerpo) (figura 4).

En cuanto al procesamiento de las muestras de heces para ser usadas en el ensayo, se observó que la mejor dilución del excremento se presentó en la proporción 1:4 (1 gramo de heces: 4 ml de SSAF-T.3%), cuando se emplearon proporciones 1:1 y 1:2 hizo falta amortiguador por lo que no se pudo disolver la muestra; en la proporción 1:3 el sobrenadante obtenido fue escaso e insuficiente para probarse en el ELISA, finalmente, las heces diluidas 1:5 mostraron valores de absorbancia menores a los obtenidos en la proporción 1:4. En lo que se refiere a la fuerza

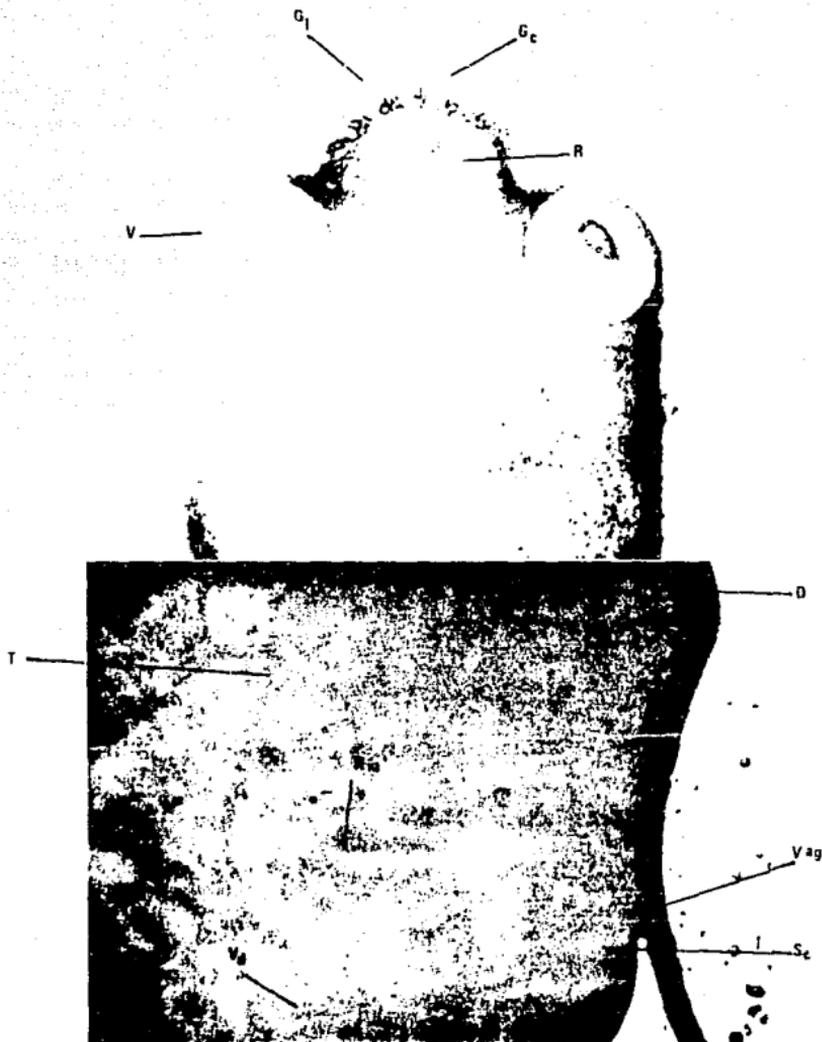


Figura 2. A) Esófago de *T. colubriformis*. V, vittas; R, rostrilo; Gc, ganchos cortos; Gl, ganchos largos.
 B) Estrómbilo de *T. colubriformis*. T, testículos; D, división entre proglótidos; Sc, saco del cirro; Vd, vaso deferente; Vag, vagina; Rm, ramificaciones del útero.

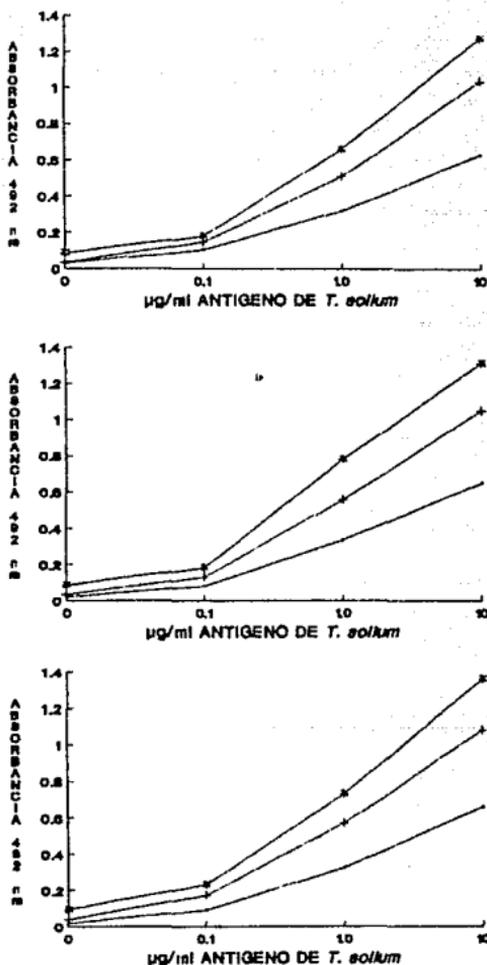


Figura 3. Valores de absorbancia obtenidos en el ELISA para las diferentes concentraciones de anticuerpos usados. A) primer anticuerpo 20 µg y anticuerpo biotinilado a 10 (.), 20 (+) y 30 (*) µg. B) primer anticuerpo 30 µg y anticuerpo biotinilado a 10 (.), 20 (+) y 30 (*) µg. C) primer anticuerpo 40 µg y anticuerpo biotinilado a 10 (.), 20 (+) y 30 (*) µg.



LAVAR

Se unió el primer anticuerpo a la placa (20 $\mu\text{g/ml}$ de IgG anti-T. solium).



LAVAR

Se agregó el antígeno de T. solium en solución, en sobrenadantes de heces o las heces de las personas o hamsters infectados.



LAVAR

Se añadió el anticuerpo biotinilado (20 $\mu\text{g/ml}$ de IgG anti-T. solium acoplada con biotina).



LAVAR

Se colocó avidina-peroxidasa 1:2000.



Finalmente se agregó el sustrato.

Figura 4. Diagrama que ilustra el ELISA para coproantígenos de T. solium. (Tomado y modificado de Voller y cols., 1976).

centrífuga aplicada, los mejores resultados se obtuvieron cuando las muestras se centrifugaron a 1400g.

2.2 Capacidad del ELISA para detectar concentraciones conocidas de antígeno de T. solium en solución y en sobrenadantes de heces.

La sensibilidad del ensayo para detectar cantidades conocidas de antígeno se probó mediante la titulación del antígeno mezclado con SSAF-T.3% o con sobrenadantes de heces humanas o de hamsters no infectados (Figura 5); se partió de una concentración inicial de 100 µg/ml del antígeno, de la cual se prepararon diluciones seriadas al doble por cuadruplicado. Los valores de absorbancia obtenidos mostraron una relación directamente proporcional con la concentración del antígeno empleada, con excepción de los valores registrados al probar las concentraciones de 100 µg/ml del antígeno en heces humanas y de hamsters, donde se observó una disminución en la densidad óptica (Cuadro 7). El punto de corte para los valores de absorbancia de SSAF-T.3%, de sobrenadantes de heces humanas y de hamsters sin antígeno fueron de 0.146, 0.170 y 0.163 respectivamente; el límite de resolución del ELISA para detectar concentraciones del antígeno de T. solium, se determinó como el valor de absorbancia inmediatamente superior al punto de corte del diluyente. De esta manera, el ensayo tuvo un límite de resolución de 25 ng/ml para el antígeno en SSAF-T.3% y de 100 ng/ml del antígeno en sobrenadante de heces humanas y de hamsters.

CUADRO No. 7. TITULACION DEL ANTIGENO CRUDO DE *T. solium* EN SOLUCION Y EN SOBRENADANTES DE HECES POR MEDIO DEL ELISA

µg/ml del antigeno	Absorbancia a 492 nm		
	SSAF-T.3%	HECES HAMSTER	HECES HUMANAS
0	0.122	0.145	0.132
0.025	0.169	0.168	0.156
0.100	0.279	0.209	0.265
0.400	0.399	0.300	0.345
1.56	0.568	0.392	0.458
6.25	0.818	0.569	0.619
25.0	1.071	0.765	0.846
100	1.327	0.609	0.714

Punto de corte	0.136	0.170	0.163

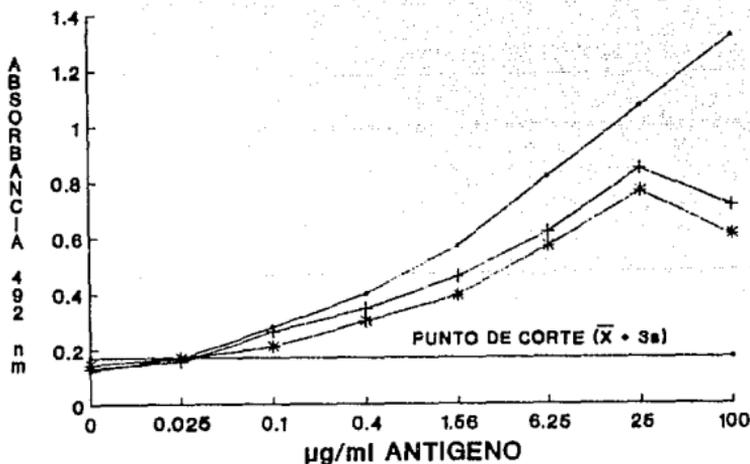


Figura 5. Curvas de titulación del antígeno de *T. solium* en solución (.); o mezclado con heces humanas (+) o heces de hamster (*).

2.3 Dinámica de la detección de antígenos en el modelo experimental.

Se procesaron muestras de heces de 107 hamsters: 37 animales infectados con ocho cisticercos de T. solium y diferentes dosis de esteroides (grupos III, IV Y V), los seis hamsters del grupo control que no se infectaron y que recibieron esteroides y un grupo mas de 64 animales sin parásitos gastrointestinales. La teniasis se comprobó en los animales mediante necropsia o por desparasitación.

Las muestras de heces de los 64 animales no infectados se usaron para determinar el punto de corte de la prueba y de esta manera poder diferenciar entre un animal no parasitado y el teniásico, el valor del punto de corte fue de 0.170. Todos los hamsters teniásicos fueron positivos en el ELISA para coproantígenos a partir de la segunda semana postinfección, cuando los valores de absorbancia obtenidos fueron superiores al punto de corte, mientras que las absorbancias del grupo control siempre se mantuvieron por debajo del punto de corte a lo largo de toda la investigación. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los valores de absorbancia de los grupos de animales infectados y el control a partir del día 11 ($P < 0.005$). En la figura 6 se muestra la media de todos los valores de absorbancia acumulados cada cinco días de todos los grupos analizados (III, IV, V y control).

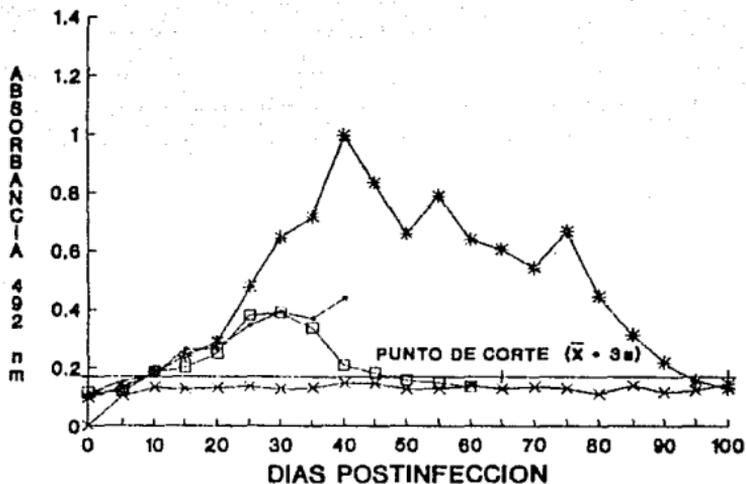


Figura 6. Dinámica de la detección de coproantígenos de *T. solium* en el modelo de hamsters que recibieron dos dosis de esteroide (.), Grupo III; una dosis de esteroide (*), Grupo IV; o sin esteroides (□), Grupo V, así como en el Grupo control no infectado (x).

2.3.1 Infecciones con dos dosis de esteroide (Grupo III).

La infección de este grupo de animales se mantuvo durante 40 días, la presencia de teniasis se verificó mediante necropsia de los hamsters o por desparasitación con una droga cestocida. Durante el transcurso de éste y los demás experimentos se colectaron diariamente las heces de los animales y se procesaron para ensayarse en el ELISA, los valores de absorbancia obtenidos de cada cinco días se agruparon y se calculó la media y desviación estandar. En la figura 6 se muestra exclusivamente la gráfica de medias y en la figura 7 se incluyen las desviaciones estandar. Los valores de absorbancia mostraron un incremento paulatino conforme transcurrieron los días postinfección, se registraron valores de absorbancia por encima del punto de corte a las dos semanas postinfeccion y se mantuvieron en ascenso hasta el día 40. La desviación estandar mas amplia se registró a los 15 y 25-35 días. El grupo control sin infección siempre se mantuvo por debajo del punto de corte y su desviación estandar fue pequeña en todas las observaciones realizadas (Figura 7 y Cuadro 8). La parasitosis se comprobó en 11 de los 15 animales, en nueve de ellos se hizo mediante necropsia y en los otros tres por tratamiento cestocida; los tres animales restantes fallecieron durante el transcurso del experimento y no fue posible revisarlos para verificar la presencia del parásito, sin embargo las densidades ópticas en éstos animales fueron similares a las obtenidas en el grupo donde se comprobó la teniasis.

CUADRO No. 8. VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN EL GRUPO II QUE RECIBIO DOS DOSIS DE ESTEROIDE Y EN EL GRUPO CONTROL

Días postinfección	Dos dosis esteroide(1)		Control	
	media	desv. estandar	media	desv. estandar
-1 Preinfección (día 0)	0.111	0.024	0.097	0.018
1-5	0.153(2)	0.046	0.101	0.025
6-10	0.177	0.050	0.133	0.021
11-15	0.269	0.172	0.129	0.027
16-20	0.265	0.063	0.135	0.022
21-25	0.344	0.176	0.136	0.024
26-30	0.392	0.166	0.125	0.029
31-35	0.369	0.154	0.129	0.024
36-40	0.437	0.116	0.137	0.025

- (1) 4 mg en el día de la infección y refuerzo a los 14 días.
 (2) Promedio de las lecturas a 492 nm hechas durante 5 días.

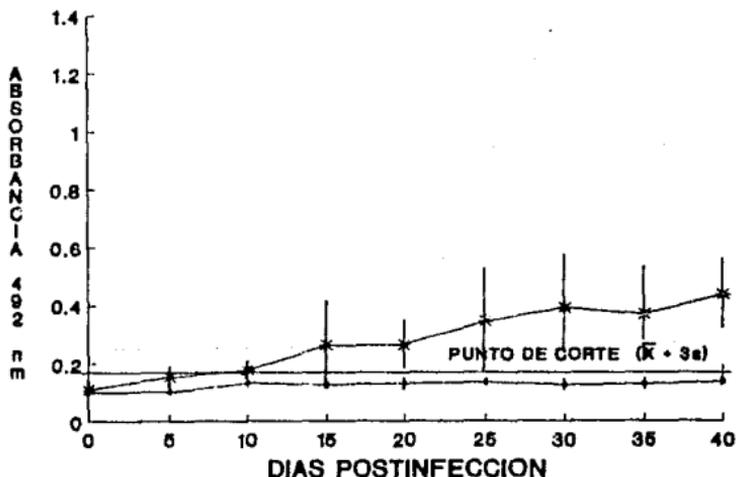


Figura 7. Dinámica de la detección de coproantígenos de *T. solium* en el modelo experimental del hamster a los que se les administraron dos dosis de esteroide (Grupo III) (*). Cada punto representa el promedio de cinco días de observación. Grupo control (.); desviación estandar (I).

2.3.2 Infecciones con dosis única de esteroide (Grupo IV).

Este grupo experimental quedó formado por 15 animales, la teniasis se comprobó mediante tratamiento con praziquantel de seis hembras; por necropsia en cuatro animales (dos machos y dos hembras), en otros cuatro animales (tres machos y una hembra) se les dejó que desecharan las tenias por si solos y el animal restante falleció y no se revisó. Los valores de absorbancia obtenidos durante esta infección mostraron variaciones que hicieron que se formaran varios picos a lo largo de la curva de detección de antígenos, en los primeros 20 días del experimento el aumento en las densidades ópticas fue moderado y a partir de esa fecha se hizo mas marcado, hasta presentarse el primer pico de absorbancia a los 40 días, posteriormente hubo un descenso que se frenó en los 50 días, volviendo a presentarse un incremento a los 55 días, nuevamente se presentó una disminución en las densidades ópticas que duró hasta los 70 días, hubo una recuperación en las absorbancias que dió origen al tercer pico en los días 71 a 75 y a partir de esa fecha comenzó el descenso total en la curva de detección de coproantígenos hasta alcanzar valores inferiores al punto de corte en el día 95 y se mantuvo así hasta el final del experimento a los 100 días. Al igual que en la infección anterior, la desviación estandar fue menor al inicio de la curva, se incrementó en la parte media y volvió a ser menor en los últimos 15 días del experimento (Figura 8 y Cuadro 9). Se analizaron los valores de absorbancia entre machos y hembras hasta el día 30 postinfección, no se encontraron diferencias estadísticas

CUADRO No. 9. VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN EL GRUPO IV QUE RECIBIO UNA SOLA DOSIS DE ESTEROIDE Y EN EL GRUPO CONTROL

Días postinfección	Una dosis esteroide		Control	
	media	desv. estandar	media	desv. estandar
-1 Preinfección				
(día 0)	0.097	0.024	0.097	0.018
1-5	0.131(1)	0.048	0.101	0.025
6-10	0.185	0.054	0.133	0.021
11-15	0.239	0.061	0.129	0.027
16-20	0.287	0.074	0.135	0.022
21-25	0.481	0.244	0.136	0.024
26-30	0.626	0.165	0.125	0.029
31-35	0.779	0.225	0.129	0.024
36-40	0.994	0.105	0.137	0.025
41-45	0.844	0.201	0.137	0.016
46-50	0.659	0.136	0.128	0.031
51-55	0.790	0.268	0.130	0.026
56-60	0.640	0.273	0.135	0.025
61-65	0.605	0.251	0.129	0.025
66-70	0.548	0.295	0.136	0.020
71-75	0.650	0.325	0.129	0.022
76-80	0.408	0.295	0.111	0.030
81-85	0.316	0.291	0.140	0.017
86-90	0.218	0.146	0.116	0.028
91-95	0.159	0.036	0.122	0.026
96-100	0.131	0.009	0.140	0.019

(1) Promedio de las lecturas a 492 nm hechas durante 5 días continuos.

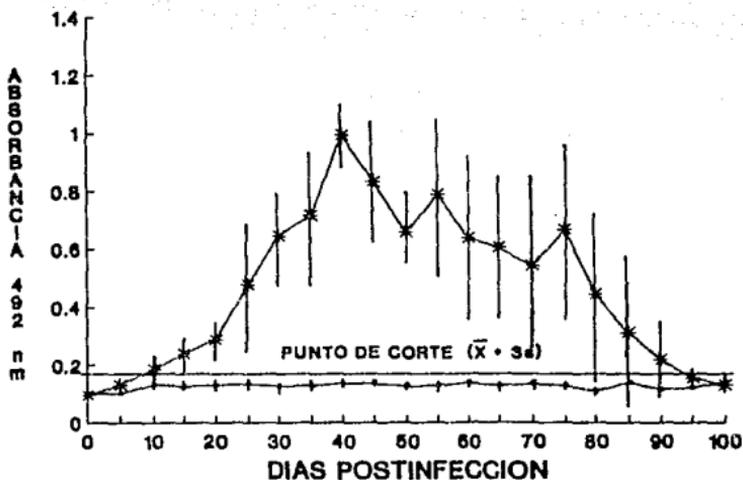


Figura 8. Dinámica de la detección de coproantígenos de *T. solium* en el modelo experimental (Grupo IV). Cada punto representa el promedio de cinco días de observación e incluye machos y hembras: grupo que recibió esteroide (*); grupo control (.); desviación estandar (I).

significativas ($P > 0.005$); posterior a esa fecha solo quedó una hembra y cinco machos, las densidades ópticas de la hembra fueron muy similares a las obtenidas en el grupo de machos, la diferencia en ambos se presentó a los 60 días, cuando la hembra mostró un franco descenso en la densidad óptica hasta alcanzar los valores del grupo control a los 70 días, mientras que el descenso en los machos se inició hasta los 80 días, cuando uno de los tres animales mostró valores iguales a los del grupo control y fué hasta los 95 días cuando todos los machos alcanzaron valores por debajo del punto de corte.

2.3.3 Infecciones sin esteroide (Grupo V).

En este grupo no se empleo esteroide alguno, la duración de este experimento fue de 60 días. Al igual que en las infecciones anteriores, las densidades ópticas también mostraron un incremento paulatino conforme transcurrieron los días, el cual se detuvo al llegar a los 21-25 días postinfección y permaneció constante hasta los 30 días, a partir de los 35 días hubo una disminución en las absorbancias del grupo hasta registrarse valores iguales a los del grupo control a partir del día 50 y se mantuvo así hasta el final del experimento (Figura 9). Durante el transcurso de esta infección se sacrificaron tres animales para comprobar la presencia de teniasis en el grupo, al finalizar el experimento se sacrificaron los cuatro animales restantes, de los cuales solo la hembra estaba parasitada con una tenia (Figura 10). Las desviaciones estandar más amplias en el grupo se obtuvieron a los 30-35 días de infección y

CUADRO No. 10. VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS EN EL GRUPO INFECTADO QUE NO RECIBIO ESTEROIDE Y EN EL GRUPO CONTROL

Días postinfección	Sin esteroide		Control	
	media	desv. estandar	media	desv. estandar
-1 Preinfección				
(día 0)	0.114	0.020	0.097	0.018
1-5	0.116(1)	0.030	0.101	0.025
6-10	0.188	0.043	0.133	0.021
11-15	0.20	0.023	0.129	0.027
16-20	0.249	0.073	0.135	0.022
21-25	0.380	0.085	0.136	0.024
26-30	0.389	0.114	0.125	0.029
31-35	0.334	0.104	0.129	0.024
36-40	0.208	0.069	0.137	0.025
41-45	0.181	0.018	0.137	0.016
46-50	0.157	0.007	0.128	0.031
51-55	0.149	0.006	0.130	0.026
56-60	0.136	0.003	0.135	0.025

(1) Promedio de las lecturas a 492 nm hechas durante 5 días.

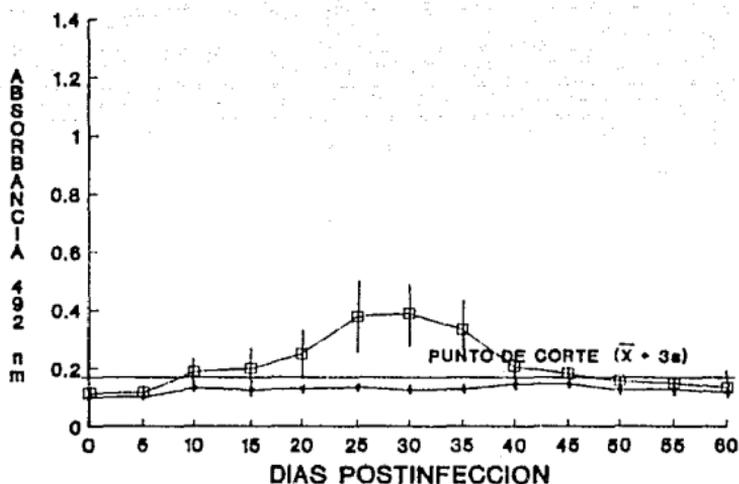


Figura 9. Dinámica de la detección de coproantígenos de *T. solium* en el modelo experimental sin el uso de esteroides. Cada punto representa el promedio de cinco días de observación e incluye machos y hembras: grupo infectado (□); grupo control (.); desviación estandar (I).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

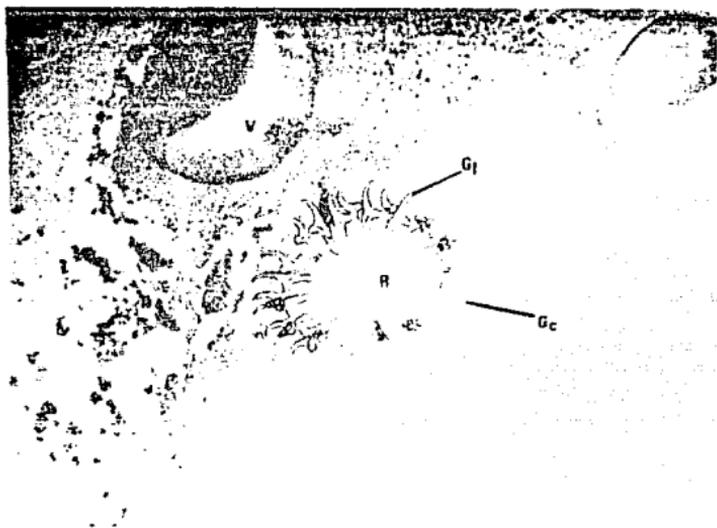


Figura 10. Escólex de una *T. solium* obtenida a los 59 días de infección de un hamster que no recibió esteroides. V, ventosa; R, rostelo; Gc ganchos cortos; Gl, ganchos largos.

al igual que en los demás grupos experimentales, la desviación estandar al inicio y al final del experimento fueron menores (Cuadro 10).

Cuando se infectaron hamsters y se les administró una dosis de esteroide o sin ella, se obtuvieron valores de absorbancia similares en los primeros 20 días de la infección, la diferencia en ambas curvas se hizo notoria a partir del día 25 cuando las densidades ópticas en el grupo con esteroide se incrementaron y comenzaron a disminuir hasta los 75 días, observándose valores solo por debajo del punto de corte a los 95 días; en cambio, en los animales donde no se usó esteroide, el pico de absorbancia fue entre el día 25 y 35, registrándose valores inferiores al punto de corte a los 50 días (Figura 6).

2.4 Captura de antígenos heterólogos de parásitos por medio del ELISA para T. solium

La captura de antígenos heterólogos con el ensayo desarrollado se probó con extractos crudos de los siguientes parásitos: T. solium-adulto, cisticercos de T. solium, T. saginata-adulto, T. pisiformis-cisticero, T. crassiceps-cisticerco, T. hydatigena-fluido vesicular, Echinococcus granulosus-fluido vesicular, H. nana, F. hepatica, Wellcomeia evoluta, Monoecocestus americana y Echinorhyncus gadi a una concentración de 25 µg/ml en SSAF-T.3†; no hubo reacción cruzada con W. evoluta, M. americana, E. gadi y

F. hepática, pero si se observó una reacción positiva con todos los demás extractos de céstodos ensayados (Figura 11 y Cuadro 11).

2.5 Evaluación del número y tamaño de las tenias y su relación con la presencia de antígenos en el ELISA.

Se analizó si la longitud de las tenias tenía efecto sobre la densidad óptica obtenida en el ELISA, es decir, existe asociación entre la longitud de la tenia (variable independiente =X) y la absorbancia (variable dependiente =Y). Para esto se consideró el valor de absorbancia mas alto obtenido durante cada infección; la asociación que se buscó fue de tipo lineal. El coeficiente de correlación de la muestra ($r= 0.809$) indicó que hubo una correlación lineal positiva, ya que al aumentar el tamaño del parásito en una unidad de medida estimada, dada por $a= 0.243$ y $b= 0.047$, la densidad óptica tiende a aumentar (Cuadro 12). El coeficiente de determinación ($r^2=0.6545$) indicó que el 65.45% de la variación en la densidad óptica es explicada por el efecto de la longitud a través del modelo $Y_i = a + BX_i + \epsilon_i$. También se buscó si existía alguna asociación entre carga parasitaria y absorbancia en el ELISA; para tal efecto, se analizaron los resultados obtenidos a partir de la tercera semana de infección, se obtuvo una asociación lineal entre el número de tenias (variable dependiente =X) y la absorbancia (variable independiente =Y). El coeficiente de correlación ($r= 0.7466$) indicó que también se presentó correlación lineal positiva, al aumentar la carga parasitaria en una unidad de medida estimada, dada por $a= 0.213$ y $b= 0.101$, la

CUADRO No. 11. CAPTURA DE ANTIGENOS HETEROLOGOS EN ELISA

Antígenos parasitarios(1)	Absorbancia 492 nm
<u>Taenia solium</u> -adulto	1.009
<u>T. solium</u> -cisticerco	0.629
<u>T. crassiceps</u> -cisticerco	0.592
<u>T. saginata</u> -adulto	0.587
<u>T. pisiformis</u> -cisticerco	0.223
<u>T. hydatigena</u> (fluido vesicular)	0.212
<u>Hymenolepis nana</u> -adulto	0.173
<u>Echinococcus granulosus</u> (fluido vesicular)	0.172
<u>Fasciola hepatica</u>	0.162
<u>Echinorhynchus gadi</u>	0.130
<u>Wellcomeia evoluta</u>	0.127
<u>Monoecocystus americana</u>	0.127
SSAF-T.3%	0.136

(1) 25 µg/ml del antígeno en SSAF-T.3%

(2) Datos tomados a los 24 días postinfección.

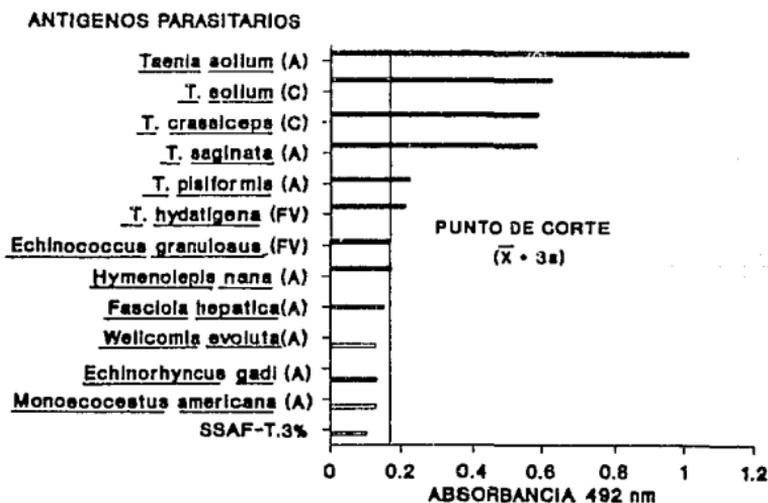


Figura 11. Evaluación del ELISA para coproantígenos de T. solium. Todos los antígenos se probaron a una concentración de 25 µg/ml. A, adulto; C, cisticero; FV, fluido vesicular.

**CUADRO No. 12. RELACION ENTRE EL TAMAÑO Y NUMERO DE LAS TENIAS
CON LA PRESENCIA DE ANTIGENOS EN EL ELISA**

Largo (cm)	No. tenias	Absorbancia	Días postinfección
0.5	6	0.284	9
1.0	5	0.304	9
4.0	4	0.637	23
5.0	3	0.303	21
6.0	2	0.436	23
8.0	2	0.477	28
10.0	6	0.798	27
12.0	6	0.679	24
12.0	5	0.993	24

Modelo experimental $Y_i = \alpha + \beta X_i + \epsilon_i$

Asociación con el largo de las tenias:

Variable dependiente: absorbancia

Variable independiente: largo de las tenias

constante (a) = 0.243 Coeficiente de X (b) = 0.047

Coeficiente de correlación (r) = 0.809

Coeficiente de determinación (r^2) = 0.6545 = 65.45%

Asociación con la carga parasitaria:

Variable dependiente: absorbancia

Variable independiente: número de tenias

constante (a) = 0.213 Coeficiente de X (b) = 0.101

Coeficiente de correlación (r) = 0.7466

Coeficiente de determinación (r^2) = 0.5574 = 55.74%

densidad óptica aumenta. El coeficiente de determinación en esta asociación ($r^2 = 0.5574$) indicó que el 55.74% de la variación en la absorbancia se explica por el efecto del número de tenias a través del modelo lineal anteriormente descrito.

2.6 Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de coproantígenos de T. solium.

Animales teniásicos que fueron positivos a la prueba = 23

Animales teniásicos que fueron negativos a la prueba = 0

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{23}{23 + 0} \times 100 = 100\%$$

Especificidad. Se probaron sobrenadantes de heces de 13 animales infectados naturalmente con H. nana, y el excremento de los animales teniásicos; no hubo reacciones cruzadas positivas con esta parasitosis (Figura 12).

Animales no teniásicos que fueron positivos a la prueba = 0

Animales no teniásicos que fueron negativos a la prueba = 19

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{19}{0 + 19} \times 100 = 100\%$$

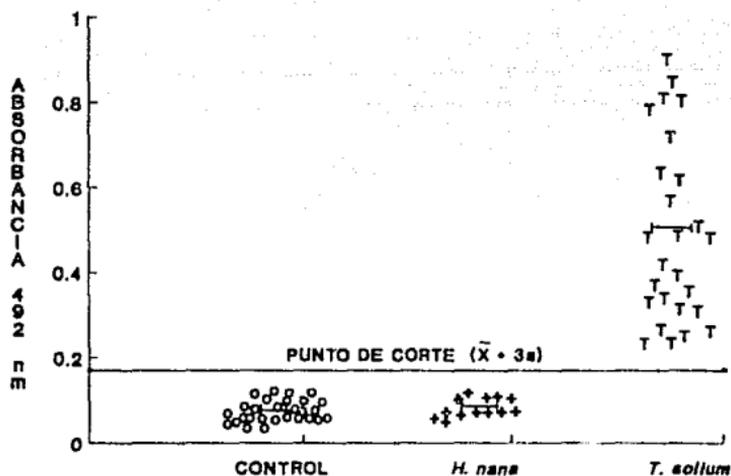


Figura 12. Especificidad del ELISA para coproantígenos de *T. solium* en heces de hamsters sin infectar (Control); infectados naturalmente con *H. nana* e infectados con *T. solium* (24 días postinfección). Media de las absorbancias (—).

2.7 Efecto de la desparasitación en el ensayo de detección de coproantígenos.

A los 21, 29 y 39 días se administró a tres hamsters una dosis única de 30 mg/kg de peso de praziquantel por vía oral, este mismo tratamiento se administró a tres animales no infectados. Se colectaron muestras de heces antes de la desparasitación y diariamente durante los 14 días siguientes, las cuales fueron procesadas para probarse en el ELISA y además se les realizó examen CPS por tamizado. En el día uno postratamiento se observó un incremento pronunciado en los valores de absorbancia en el ELISA en todos los animales infectados, el cual decreció hasta alcanzar los valores del grupo control al sexto día (Figura 13 y Cuadro 13). En el examen macroscópico por tamizado de heces se identificaron fragmentos de estróbilo de tenias en el primer día (Figura 14), a partir del segundo día postratamiento este examen fue negativo en todas las muestras.

3. EVALUACION Y APLICACION DEL ELISA EN LA DETECCION DE ANTIGENOS DE T. solium EN EL SER HUMANO.

Se colectaron un total de 127 muestras de materia fecal humana, 13 muestras de individuos libres de parásitos gastroentéricos comprobados por exámenes CPS, con las cuales se determinó el punto de corte de 0.163 para heces humanas. De las 114 muestras con diferentes parasitosis intestinales, 89

CUADRO No. 13. EFECTO DE LA DESPARASITACION EN LA DETECCION DE COPROANTIGENOS DE *T. solium* POR ELISA

Días Postratamiento	Días postinfección			Control
	21	29	31	
0	0.229(1)	0.671	0.387	0.116
1	0.653	1.081	1.387	0.132
2	0.236	0.601	1.136	0.127
3	0.131	0.283	0.927	0.108
4	0.121	0.229	0.716	0.132
5	0.141	0.121	0.231	0.126
6	0.138	0.101	0.148	0.127
7	0.132	0.129	0.085	0.130
8	0.105	0.140	0.079	0.125
9	0.129	0.116	0.092	0.104
10	0.105	0.101	ND	0.129
11	0.123	0.129	ND	0.137
12	0.135	0.127	ND	0.106
13	0.100	0.099	ND	0.139
14	0.126	0.118	ND	0.101

(1) Promedio de lecturas a 492 nm de tres animales.

ND No determinado.

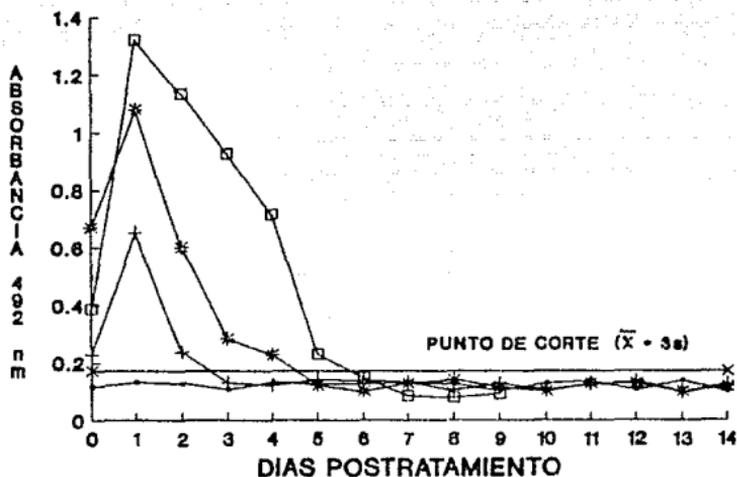


Figura 13. Efecto del praziquantel en la curva de determinación de coproantígenos de *T. solium*. Se administraron 30 mg/kg de peso en dosis única a hamsters con 21 días de infección (+); 29 días de infección (*); 39 días de infección (□) y a un grupo control (.).

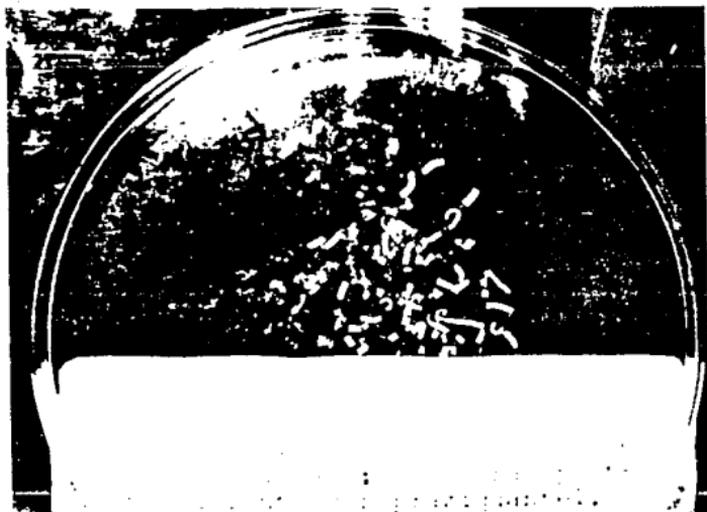


Figura 14. Efecto del praziquantel sobre T. solium: dos horas postratamiento.

correspondieron a muestras con parasitosis únicas, 11 presentaron mas de un parásito y las 14 restantes fueron muestras de individuos teniásicos, de diferente procedencia: nueve de China y 5 de México; la asociación con mas de un parásito se presentó en las infecciones con protozoarios principalmente, solo hubo un caso de asociación entre Endolimax nana e Hymenolepis nana. Las infecciones parasitarias mas frecuentes en las 127 muestras estudiadas fueron por protozoarios con 85 casos, donde destaca la amibiasis con una frecuencia del 20%; se presentaron nueve infecciones por nemátodos y 20 casos con cestodiasis: seis personas con H. nana, siete con T. saginata, seis con T. solium y una con Taenia sp. (Cuadro 14). El seguimiento clínico de los pacientes chinos lo hicieron el grupo de parasitólogos de la Escuela de Medicina Tropical, la teniasis en estos pacientes se comprobó mediante estudios CPS y/o por desparasitación.

Las muestras de las 114 personas con parasitosis intestinal fueron analizadas en el ELISA para antígenos de T. solium, siguiendo el mismo protocolo que se usó con las heces de los hamsters. Como se aprecia en la figura 15 y en el cuadro 15 el ELISA desarrollado no dió reacciones falsas positivas con ningún parásito que no pertenece al género Taenia. Así como fue posible descartar otras parasitosis, no fue posible hacerlo con las dos especies de Taenia de humanos, ya que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los valores de absorbancia de los individuos portadores de T. solium y T. saginata ($P > 0.01$).

CUADRO No. 14. PROTOZOARIOS Y HELMINTOS INTESTINALES PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE HECEAS HUMANAS

Pasásitos	No. de casos (coproparasitoscopia)	Porcentaje del total
<u>Entamoeba histolytica</u>	26	20
<u>Giardia lamblia</u>	20	16
<u>Entamoeba coli</u>	16	13
<u>Iodamoeba butschlii</u>	13	10
<u>Endolimax nana</u>	10	8
<u>Ascaris lumbricoides</u>	6	5
<u>Trichuris trichiura</u>	2	2
<u>Enterobius vermicularis</u>	1	1
<u>Hymenolepis nana</u>	6	5
<u>Taenia saginata</u>	7	6
<u>Taenia solium</u>	6	5
<u>Taenia sp.</u>	1	1
Sanos	13	10
<hr/>		
Total	127	

CUADRO No. 15. ESPECIFICIDAD DEL ELISA PARA T. solium EN HECEAS HUMANAS

Parásitos presentes	No. de casos	Absorbancia 492 nm media	desv. estandar	Resultado
<u>Giardia lamblia</u>	20	0.065	0.040	Negativo
<u>Iodamoeba butschlii</u>	13	0.067	0.029	Negativo
<u>Endolimax nana</u>	10	0.077	0.042	Negativo
<u>Entamoeba histolytica</u>	26	0.088	0.036	Negativo
<u>Entamoeba coli</u>	16	0.100	0.033	Negativo
<u>Trichuris trichiura</u>	2	0.113	0.039	Negativo
<u>Ascaris lumbricoides</u>	6	0.116	0.033	Negativo
<u>Enterobius vermicularis</u>	1	0.127	—	Negativo
<u>Hymenolepis nana</u>	6	0.088	0.042	Negativo
<u>Taenia sp.</u>	1	0.230	—	Positivo
<u>Taenia saginata</u>	7	0.241	0.074	Positivo
<u>Taenia solium</u>	6	0.306	0.105	Positivo
Sanos	13	0.098	0.023	Negativo

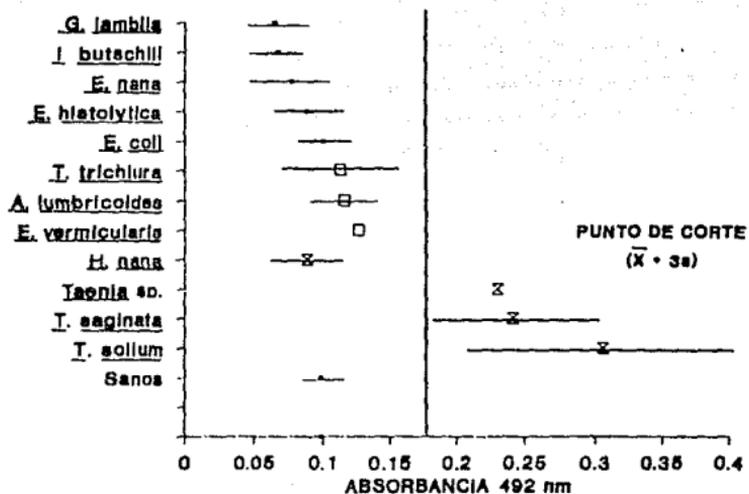


Figura 15. Especificidad del ELISA para coproantígenos de *T. solium* en casos humanos con diferentes parasitosis. Protozoarios (.); Nemátodos (□); céstodos (x). Desviación estandar (—)

Los exámenes CPS de los 14 individuos teniásicos mostraron huevos del parásito en 12 casos, los dos restantes fueron negativos; mediante el ELISA los 14 individuos fueron diagnosticados como positivos. Se hizo el seguimiento de las dos personas con CPS negativos y ELISA positivo, uno de estos casos correspondió al portador de Taenia sp., un paciente masculino de 47 años quien recibió tratamiento químico con albendazol, 400 mg diarios repartidos en dos tomas durante tres días para eliminar al parásito, un día después del tratamiento se observaron gran cantidad de proglótidos en el excremento y a partir del segundo día ya no estuvieron presentes éstos. A los 55 días postratamiento se le solicitó una muestra de excremento diario durante cinco días consecutivos, las cuales fueron ensayadas en el ELISA y además se les practicó examen CPS cualitativo según técnica de Faust; las cinco muestras fueron negativas en los CPS y por el ELISA cuatro fueron positivas y solo la segunda muestra fue negativa (Cuadro 16). A los 70 días posteriores al tratamiento el paciente arrojó nuevamente proglótidos de tenia. El segundo caso correspondió a una paciente de China quien refirió haber arrojado proglótidos de tenia dos días antes de que proporcionara la muestra de excremento, después del tratamiento cestocida, se comprobó la teniasis por T. solium en esta paciente.

3.1 Sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de coproantígenos de T. solium en heces humanas.

Personas con T. solium que fueron positivos a la prueba =6

Personas con T. solium que fueron negativas a la prueba =0

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{6}{6 + 0} \times 100 = 100\%$$

Personas sin T. solium que fueron positivas a la prueba =7

Personas sin T. solium que fueron negativas a la prueba =120

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{120}{7 + 120} \times 100 = 94.5\%$$

CUADRO 16. RESULTADOS DE LOS EXAMENES COPROPARASITOSCÓPICOS Y EL ELISA PARA ANTIGENOS DE T. solium EN MUESTRAS DE HECEs DE INDIVIDUOS TENIASICOS.

Caso No.	Procedencia	CPS	ELISA	Parásito
1	México, D.F.	positivo	0.164(1)	<u>T. saginata</u>
2	Morelia, Mich.	positivo	0.213	<u>T. saginata</u>
3	Morelia, Mich.	positivo	0.217	<u>T. saginata</u>
4	Morelia, Mich.	positivo	0.242	<u>T. saginata</u>
5	Rep. de China	positivo	0.213	<u>T. saginata</u>
6	Rep. de China	positivo	0.242	<u>T. saginata</u>
7	Rep. de China	positivo	0.399	<u>T. saginata</u>
8	Rep. de China	positivo	0.185	<u>T. solium</u>
9	Rep. de China	positivo	0.193	<u>T. solium</u>
10	Rep. de China	positivo	0.322	<u>T. solium</u>
11	Rep. de China	positivo	0.402	<u>T. solium</u>
12	Rep. de China	positivo	0.442	<u>T. solium</u>
13	Rep. de China	negativo	0.291	<u>T. solium</u>
14	Morelia, Mich.	negativo	0.347	<u>Taenia sp.</u>
		negativo	0.153(2)	
		negativo	0.184	
		negativo	0.275	
		negativo	0.187	

(1) Absorbancia a 492 nm.

(2) Negativo, inferior al punto de corte de 0.163.

VII. DISCUSION

Existen diferentes reportes que muestran la utilidad del hamster dorado como modelo experimental en infecciones parasitarias. Verster (1971, 1974), lo empleó como modelo para teniasis por T. solium y T. saginata; ha sido ampliamente usado en la infección por Ancylostoma ceylanicum (Ray y cols., 1972; Garside y Behnke, 1988); también se ha utilizado para Necator americanus (Rajasekariah y cols., 1987); y recientemente se ha usado en la teniasis por T. crassiceps y E. multilocularis (Kamiya y Sato, 1989; Sato y Kamiya, 1990). En el presente trabajo se reitera la utilidad del hamster dorado como modelo experimental para T. solium tanto en el establecimiento de la parasitosis, como para la obtención de material antigénico y para la estandarización del ensayo inmunoenzimático para detección de antígenos de T. solium en heces.

Verster (1971), reportó que la tenia se puede implantar experimentalmente en el intestino delgado del hamster y con la aplicación de acetato de metilprednisolona por vía subcutánea incrementó la susceptibilidad de los animales a la infección con T. solium; esto mismo sucede cuando se aplican esteroides en las infecciones experimentales con N. americanus y T. crassiceps (Rajasekariah y cols., 1987; Sato y Kamiya, 1990), sin embargo se observa que al aumentar la dosis de esteroide también se incrementa la mortalidad en los animales (Verster 1974; Sato y Kamiya, 1990). En las infecciones realizadas en los cinco grupos experimentales

de hamsters, en donde se usaron cuatro dosis diferentes de acetato de metilprednisolona por vía intramuscular se obtuvieron porcentajes de infección que oscilaron del 92-100%, todos ellos superiores a los reportados por Verster que fueron del 25-80% cuando usó 0, 5 y 10 mg del esteroide (Verster, 1971; 1974). En los diferentes grupos experimentales se utilizaron de una a tres aplicaciones de esteroide, e incluso en el grupo que no recibió esteroide el porcentaje de animales parasitados fue del 100%, aunque en el grupo II donde se emplearon dos aplicaciones de esteroide se presentó una infección del 92%. Al igual que en el trabajo reportado por Verster (1974), la mortalidad de los animales tuvo una relación directamente proporcional con la dosis de esteroide aplicada, en el grupo I donde se usaron tres aplicaciones de metil prednisolona se presentó la mortalidad mas alta del 90%, conforme se disminuyó la cantidad de esteroide, la mortalidad de los hamsters decreció, de esta manera tenemos que en los grupos II y III donde se inyectaron dos veces esteroide, la mortalidad fue de 31% y 35% respectivamente, en el grupo IV donde se aplicó una vez esteroide la mortalidad disminuyó al 7%, y cuando no se usó esteroide en la infección no se registraron muertes en los animales (observaciones hechas a los 40 días de infección). La mortalidad observada en los hamsters es probable que se deba a la parasitosis y/o a la acción anti-inflamatoria e inmunosupresora del esteroide, que hacen a los animales mas susceptibles a las infecciones por agentes patógenos (Goodman y cols., 1990).

La importancia del uso de esteroides radica en que en las infecciones parasitarias permite que se implante un mayor número de parásitos y que la parasitosis se mantenga mas tiempo (Rajasekariah y col., 1987; Sato y Kamiya, 1990). Cuando se aplicó 1 mg/kg de hidrocortisona por vía intramuscular a los hamsters en los días 5, 6 y 7 postinfección con N. americanus, se recuperó un mayor número de parásitos a los 28 días en comparación con los animales que no recibieron esteroide (Rajasekariah y col., 1987); este mismo efecto se observa a los 35 días postinfección en gerbilos infectados con T. crassiceps, a quienes se les aplicó butilacetato de prednisolona por vía subcutánea. En el presente trabajo la cuantificación de parásitos por animal se hizo en 31 hamsters de los grupos II, III, IV y V que fueron infectados con ocho cisticercos de T. solium y que recibieron diferentes dosis de esteroide; se recuperaron un total de 132 parásitos, el número de tenias por hamster osciló de una a siete, con un promedio general de 4 tenias por hamster. La dosis de esteroide influyó en el número de tenias recuperadas, en los grupos que recibieron dos aplicaciones de metil prednisolona se obtuvo un promedio de 4 tenias por animal, con una aplicación de esteroide se obtuvieron 6 tenias por hamster y sin el uso de esteroide el promedio de tenias recuperadas disminuyó a 3. Estas diferencias obtenidas no solamente pueden deberse a la dosis de esteroide aplicada, también debe tomarse en cuenta que el hamster dorado no es el hospedero natural de T. solium, por lo que tratará de eliminar al parásito. En infecciones experimentales de ratones con H. diminuta (hospedero

no natural) se ha visto que los animales eliminan al parásito entre los 10-14 días, la expulsión es mediada inmunológicamente; en infecciones secundarias la expulsión es mas rápida, se recuperan menos parásitos y éstos se encuentran mas dañados. Cuando se infectan a ratones muy jóvenes o se les aplican drogas inmunosupresoras, se aumenta la sobrevivencia de este céstodo; pero cuando la infección se hace en ratones atímicos, éstos no desechan al parásito (Rickard, 1983). Por otra parte, en infecciones experimentales de hamsters con céstodos no específicos como E. multilocularis y T. crassiceps, se observó que los hamsters mantienen la infección solo con el uso de esteroides, en ausencia de ellos el parásito es expulsado rápidamente de su organismo (Kamiya y Sato, 1990; Sato y Kamiya, 1991). La persistencia de parásitos no específicos en animales tratados con esteroides es probable que se deba a la acción de estos fármacos sobre el sistema inmune. Se ha visto que los glucocorticoides inhiben funciones específicas de los leucocitos; en el macrófago inhiben el procesamiento y presentación de antígenos, así como la liberación de interleucina 1. También suprimen la amplificación de la inmunidad celular mediante la inhibición de la expresión del gene de interleucina 2 y por interferencia con el receptor de esta linfoquina en los linfocitos T (Goodman, 1990).

En cuanto al desarrollo de las tenias, Verster (1971) reporta que existe una correlación directa entre el desarrollo genital y la dosis de esteroide empleada, con un protocolo de inoculación de

3-4 cisticercos e inyecciones semanales de esteroide, obtuvo la primera T. solium con órganos reproductores completamente desarrollados a los 21 días de infección en un hamster parasitado con dos tenias, que recibió dos dosis de 10 mg de metil prednisolona; cuando disminuyó la dosis de esteroide aplicado se incrementaron los días para recuperar parásitos con las mismas características morfológicas, de tal manera que las tenias recuperadas de hamsters infectados sin el uso de esteroides solo presentaron ductos genitales y testículos a los 58 días de infección; en ninguna de las infecciones realizadas se obtuvieron tenias con huevos del parásito, además el desarrollo de las tenias también se ve afectado por la carga parasitaria (Verster, 1971). Por su parte, Sato y Kamiya (1990), relacionan el desarrollo de T. crassiceps solamente con la carga parasitaria, obteniendo mayor número de proglótidos grávidos por tenia en animales parasitados con una a tres tenias que cuando hay 6 o mas tenias. Al igual que en el trabajo de Verster (1971) en las infecciones realizadas en los hamsters no se pudieron obtener tenias con proglótidos grávidos, el tamaño máximo de los parásitos se obtuvo en el intervalo de 20-30 días postinfección en animales que se infectaron con ocho cisticercos y recibieron dos inyecciones de metil prednisolona; la presencia de órganos reproductores se hizo evidente en tenias de mas 30 días, en las que se logró observar el poro genital, el conducto deferente, la vagina y los testículos en un ejemplar de 67 días obtenido de un hamster tratado con una aplicación de esteroide, con una carga parasitaria de 6 tenias. El

desarrollo sexual incompleto observado en las tenias o solo lograr un mayor tiempo de infección es probable que se deba a la interacción entre la carga parasitaria y la menor dosis de esteroide usada (Verster, 1971; Sato y Kamiya, 1990). Además, debe tenerse presente que T. solium es un parásito que no es habitual del hamster, y que el intestino delgado de éste roedor no reúne las condiciones fisiológicas necesarias para el desarrollo completo de la tenia y que la microtopografía propia del intestino delgado del hamster así como los factores nutricionales, bioquímicos y fisicoquímicos y el propio sistema inmune de este animal influirán en el desarrollo satisfactorio de los parásitos como T. solium (Kamiya y Sato, 1989).

La viabilidad de los cisticercos usados en las infecciones se midió por medio de la prueba de evaginación in vitro, se emplearon cinco lotes de cisticercos, cuya evaginación osciló del 66-98%, los porcentajes de infección obtenidos fueron del 100%, con excepción de los hamsters infectados con el lote de cisticercos que tuvo una evaginación del 98%, donde la infección fue del 92%. Los resultados de evaginación de los cisticercos e infección de los hamsters obtenidos en esta tesis se contraponen a los reportados por Verster (1974), quien informó que se requerían cisticercos con evaginación superior al 90% para poder infectar a los animales; en este estudio se obtuvieron infecciones del 100% con cisticercos cuya evaginación fue del 66%, es decir que no se necesitaron cisticercos con

porcentajes altos de evaginación para poder reproducir la teniasis en el modelo experimental.

La teniasis se diagnostica en forma rutinaria mediante exámenes coproparasitoscópicos, los cuales evidencian la presencia de huevos o proglótidos del parásito en las heces, también se pueden obtener huevos de la región perianal por medio del uso de cinta adhesiva; sin embargo todos estos métodos tienen baja sensibilidad, que oscila entre el 50-78%, por lo que se aconseja hacer los exámenes en forma seriada o realizarse mas de un método a la vez (Hall y cols., 1981; Schantz y Sarti, 1989; Straka y cols., 1989). Aunado al hecho de la baja sensibilidad de los exámenes coproparasitoscópicos, los huevos de T. saginata y T. solium no difieren morfológicamente, por lo que el hallazgo de huevos en las heces no permite la identificación de especie, tornándose aún mas difícil el diagnóstico certero de teniasis por T. solium (Cheng, 1978; Gemmell y cols., 1983). El tratamiento químico con drogas cestocidas para eliminar a la tenia, en conjunto con el examen por tamizado de heces hacen mas sensible y confiable el diagnóstico de teniasis, aunque siguen presentándose problemas de especificidad, debido a que no todas las tenias expulsadas se encuentran en buen estado para poder hacer el diagnóstico diferencial de especie (Hall y cols., 1981; Schantz y Sarti, 1989).

Por otro lado, se han desarrollado pruebas inmunológicas que detectan en forma eficiente la presencia de parásitos intestinales

en heces, se tienen métodos inmunoenzimáticos para el diagnóstico de amebiasis y giardiasis (Ungar y cols., 1984; Green y cols., 1985; Grundy y cols., 1987 del Muro y cols., 1987); también se tiene un ELISA para H. diminuta en ratas infectadas experimentalmente (Allan y Craig, 1989) y uno mas desarrollado para el diagnóstico de T. hydatigena en perros (Deplazes y cols., 1990). En la presente tesis se desarrolló un ELISA para detección de antígenos de T. solium en heces con la colaboración de un grupo de parasitólogos de la escuela de Medicina Tropical de Liverpool, G.B. (Allan y cols., 1990). Recientemente se aplicó el ELISA para el diagnóstico de portadores de T. saginata (Deplazes y cols., 1991).

Los métodos para detección de coproantígenos reportados señalan que mediante el ELISA se pueden medir concentraciones desde 20 a 100 ng de antígeno en solución y de 75 a 200 ng del antígeno en sobrenadante de heces (Green y cols., 1985; Grundy y cols., 1987; del Muro y cols., 1987; Allan y Craig, 1989; Allan y cols., 1990; Deplazes y cols., 1990, 1991). En el ELISA desarrollado para T. solium se pudo detectar concentraciones de 25 ng/ml de antígeno en solución y 100 ng/ml de antígeno en sobrenadantes de heces humanas y de hamsters, concentraciones de antígeno que caen dentro de los límites de resolución determinados en los trabajos anteriores. Los valores de absorbancia obtenidos en la curva de titulación del antígeno en solución y en sobrenadantes de heces mostraron una relación directa con la cantidad de antígeno añadido, con excepción de los sobrenadantes

de heces humanas y de hamsters sin diluir que contenían 100 µg/ml del antígeno, este mismo efecto se observó en la titulación de trofozoitos de G. lamblia en medio de cultivo (Ungar y cols., 1984). En general, los valores de absorbancia registrados en la curva de titulación del antígeno en sobrenadantes de heces fueron menores en comparación con los obtenidos cuando se trabajó con el antígeno en solución, esta disminución en la absorbancia es probable que se deba a la actividad de proteasas de las heces que pueden degradar a los anticuerpos que se encuentran unidos a la fase sólida o a la digestión de los mismos antígenos (Viscidi y cols., 1984); por otro lado, esta misma interferencia en los valores de absorbancia se observaron en la titulación de los antígenos de T. hydatigena y H. diminuta en heces (Allan y Craig 1989; Deplazes y cols., 1990).

Los métodos inmunoenzimáticos desarrollados con anticuerpos policlonales para detectar antígenos parasitarios, pueden capturar antígenos de parásitos heterólogos (Allan y Craig, 1989; Deplazes y cols., 1990). En el sistema que se desarrolló en este trabajo se observó que solamente pueden capturarse antígenos de otros céstodos como son: T. saginata, T. hydatigena, T. pisiformis, T. crassiceps, E. granulosus y H. nana. La obtención de resultados positivos con extractos de estos parásitos no constituye un problema grave ya que algunos de ellos parasitan a otras especies animales: T. hydatigena y T. pisiformis son parásitos de perros (Cheng, 1978) y T. crassiceps parasita al ratón (Freeman, 1962). Por otra parte, el

quiste de E. granulosus se localiza en órganos internos de seres humanos (Cheng, 1978), por lo que es muy poco probable que sus proteínas se encuentren en las heces. Una mención aparte la merecen T. saginata e H. nana, ambos parásitos habitan en el intestino delgado del hombre y se encuentran presentes en la población mexicana (Tay y cols., 1976; Sarti y cols., 1988; Díaz y cols., 1990; Lara-Aguilera y cols., 1990); para verificar reacciones positivas con estos parásitos, se hicieron los ensayos de especificidad que se detallan en párrafos siguientes.

La detección de antígenos solubles de Taenia en las muestras de heces es una buena alternativa para el diagnóstico de la parasitosis. La dinámica de detección de antígenos en el modelo experimental del hamster dorado, mostró que pueden detectarse infecciones tempranas, desde la segunda semana postinfección los animales registraron valores de absorbancia por arriba del punto de corte y presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.001$) entre los grupos infectados y los animales del grupo control sin infección a partir del día 11. Por su parte, Allan y Craig (1989) reportan que pueden identificar a las ratas parasitadas con H. diminuta a partir del séptimo día de infección y Deplazes y cols. (1990), lo hacen a partir del día 18 en la infección experimental de perros con T. hydatigena, estos autores concuerdan en que mediante pruebas inmunoenzimáticas se pueden identificar a los animales parasitados en el período subclínico de la enfermedad, cuando todavía no es posible diagnosticarlos como

parasitados por métodos coproparasitológicos; en este trabajo con T. solium se obtuvieron resultados similares. Al respecto, no podemos comparar los exámenes coproparasitológicos para detección de huevos con el ELISA para antígenos de T. solium en los hamsters infectados, debido a que no se obtuvieron tenias con proglótidos grávidos en ninguna de las infecciones realizadas, lo que confirma la detección de los antígenos de parásitos en infecciones subclínicas.

Los resultados del ELISA obtenidos en los grupos III, IV y V de hamsters infectados, mostraron un aumento paulatino conforme avanzaron los días de la infección, fueron positivos a partir de la segunda semana y permanecieron así hasta el momento en que desecharon al parásito (con o sin tratamiento cestocida), posteriormente solo se registraron valores negativos en las muestras; también se han obtenido resultados negativos en el ELISA después de administrar drogas cestocidas específicas para eliminar a las tenias (Allan y Craig, 1989 y Deplazes y cols., 1990). Con respecto al grupo control, éste siempre mantuvo valores de absorbancia por debajo del punto de corte. En la infección realizada en el grupo IV, donde se usó una sola dosis de esteroide al momento de la infección y que tuvo una duración de 100 días, se observaron fluctuaciones en los valores de absorbancia del ELISA a lo largo de la infección; estas mismas variaciones se observaron en el trabajo realizado por Allan y Craig (1989) en el que utilizaron anticuerpos policlonales anti-extracto total de H.

diminuta y en el de Deplazes y cols. (1990), en el que emplearon anticuerpos policlonales anti-extracto metabólico (excreción-secreción) de T. hydatigena. Estas variaciones se pueden deber a que no se presentan los mismos antígenos en las heces, o a que la concentración de los mismos no es igual todos los días (Allan y cols., 1990); por otro lado, también se debe tomar en cuenta la respuesta inmune humoral y la formación de complejos antígeno-anticuerpo en heces (Craig, comunicación personal). La variación en los valores de densidad óptica de los animales de cada grupo experimental se evaluó por medio de la desviación estandar, en los primeros días de la infección se obtuvieron desviaciones estandar pequeñas, esto mismo se presentó al finalizar las infecciones cuando los hamsters desecharon por sí solos a las tenias (Grupos IV y V); a partir del día 25 postinfección la desviación estandar se hizo mas amplia, este aumento coincide con el incremento máximo en la longitud de las tenias, por lo que suponemos que esta gran variación puede deberse a) procesos de liberación de proglótidos, b) destrucción de proglótidos o de tegumento por la respuesta inmune, c) muerte de algunas tenias, d) influencia de la respuesta inmune, e) ausencia de esteroides, f) mayor actividad metabólica de la tenia.

La persistencia de T. solium en el intestino delgado del hamster aún sin el uso de esteroides lo reportó inicialmente Verster (1971) con una eficiencia del 7%; por su parte, Arias (1984) informó de la presencia de tenias en el 45% de los hamsters

infectados a los cuarenta días postinfección sin el uso de cortisona; lo anterior sugiere que T. solium se puede albergar en el intestino delgado del hamster dorado por tiempos cortos aunque no sea su hospedero definitivo y que el uso de drogas inmunosupresoras no son requisito indispensable para la implantación del parásito, pero si son necesarios los esteroides para la sobrevivencia de la tenia por periodos largos. En la presente investigación se obtuvo una tenia de 59 días de un animal que no recibió esteroides, los resultados del ELISA de este hamster días antes de su sacrificio mostraron valores de absorbancia ligeramente superiores al punto de corte, con lo cual se demuestra que mediante este ensayo puede identificarse la presencia de una sola tenia por animal.

El tratamiento químico con praziquantel es eficiente para eliminar a la T. solium en humanos, el efecto de ésta droga sobre la curva de detección de antígenos en los hamsters, produjo un incremento en los valores de absorbancia un día después de la desparasitación, este aumento en la densidad óptica se explica porque hay una mayor liberación de antígenos del parásito por el efecto del tratamiento, como lo muestra la presencia de proglótidos en las heces en el primer día de haber administrado el praziquantel; a partir del segundo día de tratamiento no se encontraron estructuras similares a proglótidos en las heces, sin embargo, continuaron registrándose valores de absorbancia positivos hasta el quinto día, a partir del día seis y hasta el catorce

cuando se sacrificaron a los animales, las densidades ópticas se mantuvieron por debajo del punto de corte. En la necropsia de los hamsters no se obtuvo ninguna tenia, corroborándose por una parte la efectividad del tratamiento con praziquantel y por otro lado, los resultados negativos del ELISA en animales que perdieron la infección por efecto del tratamiento antiparasitario. Por su parte Allan y Craig (1989), observaron que al administrar praziquantel a las ratas infectadas experimentalmente con H. diminuta se presenta un aumento en la absorbancia en el día uno postratamiento y que se obtienen valores negativos hasta el cuarto día postdesparasitación, mientras que los exámenes CPS son positivos únicamente un día después del tratamiento; este hecho también lo reportaron Deplazes y cols. (1990) cuando desparasitaron con niclosamida a perros infectados experimentalmente con T. hydatigena. Es probable que las diferencias en los resultados de los CPS y del ELISA posteriores a la desparasitación, se deban a que con el primero se observan estructuras íntegras del parásito, mientras que con el ELISA se detectan antígenos solubles; uno de los efectos de la droga sobre el parásito es la liberación de enormes cantidades de proteínas (antígenos), los cuales se mantienen mas tiempo antes de eliminarse.

La especificidad del ELISA se probó ensayando heces de hamsters sin infectar, 13 muestras de animales infectados naturalmente con H. nana y el excremento de los hamsters infectados con T. solium. Cuando se usó en el ELISA el extracto crudo de H.

nana, se obtuvieron reacciones positivas; al ensayar las heces de los animales con esta parasitosis no dieron resultados positivos, eliminándose posibles reacciones inespecíficas con este céstodo. El método tuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para el modelo experimental; por su parte Deplazes y cols. (1990), obtuvieron resultados similares de sensibilidad y especificidad en perros infectados experimentalmente con T. hydatigena y en animales con otras parasitosis gastrointestinales.

Los exámenes coproparasitoscópicos para el diagnóstico de teniasis no son considerados métodos confiables debido a su baja sensibilidad (Schantz y Sarti, 1989). Sin embargo, mediante el uso de tres CPS (directo con solución salina y lugol, flotación con sulfato de zinc y sedimentación con formol éter) se logró identificar al 86% de los portadores de Taenia que participaron en el presente estudio. Las muestras de heces de humanos colectadas para este trabajo, procedían de individuos residentes en zonas endémicas a teniasis (Mahan, 1982; Sarti, 1989; Lara-Aguilera, 1990), donde además, se encuentran presentes otras parasitosis gastrointestinales (Lara-Aguilera, 1990). El ELISA para la detección de T. solium tuvo una sensibilidad del 100% y la especificidad fue del 94.5%, y no se presentaron reacciones falsas positivas con parásitos de otros géneros diferentes a Taenia.

La identificación de portadores de tenia por medio del ELISA para coproantígenos en ausencia de huevos del parásito en las

heces, podría representar un gran avance en el diagnóstico de esta enfermedad. En infecciones experimentales de ratas con H. diminuta (Allan y Craig, 1989) y de perros con T. hydatigena (Deplazes y cols., 1990) se observó que era posible diagnosticar estas parasitosis en el período subclínico de la enfermedad; mediante este ELISA también fué posible diagnosticar la teniasis en la etapa subclínica en un caso de un portador de Taenia sp. Por otra parte, debido a que la eliminación de huevos o proglótidos de la tenia no es constante, pueden obtenerse resultados negativos en los estudios CPS. Deplazes y cols. (1991), reportaron que por CPS identificaron al 62% de los portadores de T. saginata y por medio del ELISA para coproantígenos desarrollado para este mismo parasito el diagnóstico de teniasis aumentó al 85%. En la presente investigación se observó el caso de un paciente chino infectado con T. solium, el cual fue diagnosticado como negativo por exámenes CPS, sin embargo, el ELISA practicado en las heces de esta persona fué positivo. La presencia e identificación de T. solium en este individuo se efectuó después de la administración de tratamiento cestocida para eliminar al parásito; obteniendo buena correlación entre tratamiento químico y el ELISA para coproantígenos en seres humanos.

En el presente estudio se logró el objetivo de desarrollar una prueba inmunológica específica para Taenia, aunque los requisitos de especificidad a nivel de especie no se cumplieron, debido a que no se eliminaron las reacciones positivas con T. saginata. En el trabajo reportado por Allan y cols. (1990), donde usaron

anticuerpos policlonales anti-T. solium, tampoco pudieron diferenciar entre las dos especies de Taenia, por lo que se recomienda la absorción de los anticuerpos policlonales o la producción de anticuerpos monoclonales especie-específicos u otros métodos alternativos como lo son el uso de sondas de DNA específicas del parásito (Flisser y cols., 1988a).

En países como México y otros en vías de desarrollo donde está presente la teniasis-cisticercosis por T. solium, es importante la identificación de los portadores de este parásito para lograr el control y/o erradicación de esta enfermedad, ya que estudios epidemiológicos recientes han mostrado que el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis es la presencia de un teniásico en la casa o en la manzana (Sarti y cols., 1988; Díaz y cols., 1990). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede señalar que el ensayo inmunoenzimático para detección de coproantígenos de T. solium, es una alternativa confiable para el diagnóstico de esta parasitosis, lista para aplicarse en estudios epidemiológicos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Acevedo-Hernández, A. (1982) Economic impact of porcine cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 63-67

Acha, P. y Szifres, B. (1986) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2a edición. Organización Panamericana de la Salud. Publ. Cient. 503 Washington D.C.

Alarcón de Noya, B.; Berro, O.J.; Coltorti, E.; Flisser, A.; Strauss, W. y Vaz, A.J. (1989) Informe de la reunión técnica sobre normatización y estrategias para la implementación del inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana. Rev. Inst. Med. Tropical Sao Paulo 31: 291-293

Albores, S.J. y Altamirano, M. (1971) Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Rev. Invest. Salud Publ. 31: 1

Aluja, A. (1982) Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 53-62

Aluja, A.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velásquez, V.; Willms, K. (1987) Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por T. solium. Biblioteca de la Salud. Ins. Nal. Salud Publ. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Allan, J.C. y Craig, P.S. (1989) Coproantigens in gut tapeworm infection: Hymenolepis diminuta in rats. Parasitol. Res. 76: 68-73

Allan, J.C.; Avila, G.; García-Noval, J.; Flisser, A. y Craig, P.S. (1990) Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitology 101: 473-477

Arias, N.J.C. (1981) Efecto del acetato de cortisona sobre el desarrollo de la Taenia solium en hamsters dorados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Baumann, D. y Gottstein, B. (1987) A double-antibody sandwich ELISA for the detection of Entamoeba histolytica antigen in stool samples of humans. Trop. Med. Parasitol. 38: 81-85

Bidwell, D.E.; Buck, A.A.; Diesfeld, H.J.; Enders, B.; Haworth, J.; Huld, G.; Kent, N.H.; Kirsten, C.; Mattern, P.; Ruitenberg, E.J. y Voller, A. (1976) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull WHO 54: 129-139

Cárdenas, F.; Quiroz, H.; Meza, A.; Plancarte, A.; Dalma, A. y Flisser, A. (1989) Cisticercosis intraocular. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 69-75

Conder, A.G.; Picone, J.; Geary, A.M.; Dehogg, J. y Williams, J.F. (1983) Lytic effects of normal serum isolated postoncospheral and metacestode stages of Taenia taeniaeformis. J. Parasitol. 69: 465-472

Contreras, C.L. (1989) Aspectos mas sobresalientes de la inspección sanitaria de suinos en los rastros del D.F. y en otros del país en busca del cisticerco de Taenia solium. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 257-259

Cook, G.C. (1986) The clinical significance of gastrointestinal helminths-a review. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 675-685

Correa, D.; Laclette, J.; Rodríguez-del-Rosal, E.; Merchant, M. y Flisser, A. (1987) Heterogeneity of Taenia solium cysticerci obtained from different naturally infected pigs. J. Parasitol. 73: 443-445

Correa, D.; Sandoval, A.; Harrison, L.J.S.; Parkhouse, R.M.E.; Plancarte, A.; Meza, A. y Flisser, A. (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Trans. Royal Trop. Med. Hyg. 83: 814-816

Correa, D.; Morales, A.; Medina, Y.; García, C.; Medina, E.; Mandujano, A.; Ortiz, D. y Meza, A. (1991): Teniasis y cisticercosis por Taenia solium. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos. Publicación Técnica del Indre No. 4. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia epidemiológica, México.

Craft, J.C. y Nelson, J.D. (1982) Diagnosis of Giardiasis by counterimmunoelectrophoresis of feces. J. Inf. Dis. 145: 499-504

Chester, P.; Clifton, J.; Wayne, E.C. (1986) Parasitología Clínica. Salvat editores. México.

Chavarría, M. y Díaz, D. (1978) Droncit en el tratamiento de la cisticercosis porcina. Especialidades Veterinarias 1: 159-165

Cheng, C.T. (1978) Parasitología General. Editorial Delta A.C. España.

Daniel, W.W. (1987) Bicestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México.

Del Muro, R.; Oliva, A.; Herion, P.; Capin, R. y Ortiz, L. (1987) Diagnosis of Entamoeba histolytica in feces by ELISA. J. Clin. Lab. Analysis 1: 322-325

Deplazes, P.; Gottstein, B.; Stingelin, y Eckert, J. (1990) Detection of Taenia hydatigena coproantigens by ELISA in dogs. Vet. Parasitol. 36: 91-103

Deplazes, P.; Eckert, J.; Pawlowski, S.; Machowska, L. y Gottstein, B. (1991) An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of Taenia saginata coproantigens in humans. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 391-396

Díaz, S.; Candil, A.; Uribe, M. y Willms, K. (1990) Serology as an indicator of Taenia solium tapeworm infections in a rural community in Mexico. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 563-566

Engvall, E. y Perlmann, P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol. 109: 129-135

Escobedo, F.; González-Mariscal, G.; Revuelta, R. y Rubén, M. (1982) Surgical treatment of cerebral cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 201-205

Escobedo, F. (1989) Tratamiento de cisticercosis/teniasis humana. En: Cisticercosis humana y Porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 199-204

Espinoza, B.; Flisser, A. y Plancarte, A. (1982) Immunodiagnosis of human cysticercosis: ELISA and Immunoelectrophoresis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 163-170

Espinoza, B.; Ruíz-Palacios, G.; Tovar, A.; Sandoval, M.A.; Plancarte, A. y Flisser, A. (1986) Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 24: 536-541

Estañol, B.; Corona-Vázquez, T. y Abad-Herrera, P. (1989) Clasificación pronóstica de la cisticercosis cerebral. Implicaciones terapéuticas. Gaceta Méd. México 125: 105-111

Feldman, M.; Plancarte, A.; Sandoval, M.; Wilson, M. y Flisser, A. (1990) Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 559-562

Flisser, A.; Pérez-Montfort, R. y Larralde, C. (1979) The immunology of human and animal cysticercosis: A review. Bull WHO 57: 839-856

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

Flisser, A. (1987) Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. Gac. Med. México 123: 157-164

Flisser, A.; Reid, A.; García-Zepeda, E. y Mcmanus, D.P. (1988a) Specific detection of Taenia saginata eggs by DNA hybridisation. Lancet II 1429-1430

Flisser, A. (1988b) Neurocysticercosis in Mexico. Parasitol. Today 4: 131-137

Flisser, A.; González, D.; Shkurovich, M.; Madrazo, I.; Correa, D.; Rodríguez-Carbajal, J.; Cohen, S.; Rodríguez-del-Rosal, E.; Collado, M.; Fernández, B.; Fernández, F. y Aluja, A. (1990) Praziquantel treatment of brain and muscle porcine cysticercosis. Parasitol. Res. 76: 263-269

Freeman, R.S. (1962) Studies on biology of Taenia crassiceps (Zender, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda) Can. J. Zool. 40: 969-990

Garside, P. y Behnke, J.M. (1988) Ancylostoma ceylanicum in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. Parasitology 98: 283-289

Gemmell, M.; Matyas, Z.; Pawlowski, Z. y Soulsby, E.J.L. (1983) Guidelines for surveillance, prevention and control of Taeniasis/cysticercosis. WHO publication VPH/83.49 Switzerland

Goodman, G.A.; Rall, T.W. Nies, A.S. y Taylor, P. (1990) The pharmacological basis of therapeutics. Pergamon Press.

Guerra, G.; Flisser, A.; Cañedo, L. y Laclette, J.P. (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of Taenia solium. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 437-451

Green, E.L.; Miles, M.A. y Warhurst, D.C. (1985) Immunodiagnostic detection of Giardia antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet 28: 691-693

Grundy, M.S., Voller, A. y Warhurst, D.C. (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Entamoeba histolytica antigens in faecal material. Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 627-632.

Hall, A.; Latham, M.C.; Crompton, D.W.T. y Stephenson, L.S. (1981) Taenia saginata (cestoda) in western Kenya: the reliability of faecal examinations in diagnosis. Parasitology 83: 91-101

Heath, D. (1982) In Vitro culture of cysticerci: an aid to investigations of morphological development and host-parasite relationships. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 477-493

Kamiya, M. y Sato, H. (1990) Survival, strobilation and sexual maturation of Echinococcus multilocularis in the small intestine of golden hamsters. Parasitology 100: 125-130

Laclette, J.P.; Ornelas, Y.; Merchant, M. y Willms, K. (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of Taenia solium eggs. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 375-387

Laclette, J.P. (1985) Componentes de superficie en el metacéstodo de Taenia solium. Tesis doctoral. Colegio de Ciencias y Humanidades. Universidad Nacional Autónoma de México.

Laclette, J.P.; Merchant, M. y Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen-B in the metacéstodo of Taenia solium. J. Parasitol. 73: 121-129

Lapage, G. (1976) Parasitología Veterinaria. CECSA. México

Lara-Aguilera, R.; Aguilar-Bucio, M.T. y Martínez-Toledo, J.L. (1990) Teniasis, amebiasis y otras parasitosis intestinales en niños de edad escolar del Estado de Michoacán, México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 47: 153-159

Lenoble, E. y Dumontier, C. (1988) Perforations of the small intestine and intestinal parasitic diseases. Apropos of a case of peritonitis caused by the perforation of the small intestine combined with Taenia saginata infection. J. Chir (Paris) 125: 350-352

Lentoja, T.; Hammerberg, C.; Davis, S. y Hammerberg, B. (1988) Taenia taeniaeformis: cellular reconstruction of athymic mice and role of L3T4+ helper T lymphocytes in the early infection. J. Parasitol. 74: 985-992

Lumsden, R.D.; Voge, M. y Sogandares-Bernal, F. (1982) The metacystode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 307-361

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, L.A. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275

Mahajan, R.C. (1982) Geographical distribution of human cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 39-46

Meeusen, E.; Barcham, G.J.; Gorrell, M.D.; Rickard, M.D. y Brandon, M.R. (1990) Cysticercosis: cellular immune responses during primary and secondary infection. Parasite Immunol. 12: 403-418

Molinari, J.L.; Meza, R.; Suárez, B.; Palacios, S. y Tato, P. (1983a) Taenia solium: immunity in hogs to the cysticercus. Exp. Parasitol. 55: 340-357

Molinari, J.L.; Meza, R. y Tato, P. (1983b) Taenia solium: cell reactions to the larva (Cysticercus cellulosae) in naturally parasitized, immunized hogs. Exp. Parasitol. 56: 327-338

Musoke, A.J. y Williams, J.F. (1975) Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to Taenia taeniaeformis in the mouse. Immunology 24: 97-101

Németh, I. (1970) Immunological study of rabbit cysticercosis. II. Transfer of immunity to Cysticercus pisiformis (Bloch, 1780) with parenterally administered immune serum or lymphoid cells. Acta Vet. Acad. Sci. Hungaricae 20: 69-79

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

Noble, E.R. y Noble, G. A. (1976) Parasitology. The Biology of animal parasites. Lea and Febiger, Philadelphia.

Panzeri, A.; Castoldi, F. y Undiano, C. (1965) Acute apendicitis due to taeniasis (Taenia solium). Med. Panam. 23: 112-113

Plane, P.; Ronceray, J. y Dubin, P. (1980) Acute pancreatitis from obstruction of Wirsung's canal by Taenia saginata. J. Chir. (Paris). 117: 194-193

Proctor, E.M. y Elsdon-Dew, R. (1966) Serological tests in porcine cysticercosis. South African J. Science 62: 264-266

Rabiela, M.T.; Rivas-Hernández, A.; Rodríguez-Ibarra, J.; Castillo-Medina, S. y Cancino, F. (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 179-200

Rajasekariah, G.R.; Dhage, K.R.; Bose, S. y Deb, N. (1987) Human Necator americanus in the intestines of young adult hamsters. J. Parasitol. 73: 1252-1254

Randall, G.R.; Goldsmith, R.S.; Shek, J.; Mehalko, S. y Heyneman, D. (1984) Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Entamoeba histolytica antigen in faecal samples. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 78: 593-595

Ramírez-Bon, E.; Merchant, M.; González-del Pliego, M. y Cañedo, L. (1982) Ultrastructure of the bladder wall of the metacystode of Taenia solium. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 261-280

Ray, D.K.; Bhopale, K.K. y Shrivastava, V.B. (1972) Migration and growth of Ancylostoma ceylanicum in golden hamster Mesocricetus auratus. J. Helminthol. 46: 57-62

Rickard, M.D. (1983) Immunity. En: Biology of the eucestoda. Arme, C. y Pappas, P.W. Academic Press. New York. 539-580

Rodríguez-Carbajal, J.; Boleaga, B. y Dorfsman, J. (1989) El diagnóstico de la neurocisticercosis humana por tomografía computarizada. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. CONACyT y Limusa Noriega. México. 77-86

Rodríguez-del-Rosal, E.; Correa, D. y Flisser, A. (1989) Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum. Vet. Record 124:488

Root, D.M.; Cole, F. y Williamson, J.A. (1978) The development and standardization of an ELISA method for the detection of Entamoeba histolytica antigens in fecal samples. Arch. Invest. Med. Suppl. 1, 9: 203-210

Rosof, J.D. y Stibbs, H.H. (1986) Isolation and Identification of a Giardia lamblia specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. J. Clin. Microbiol. 23: 905-910

Salazar, P.M. y De Haro, I. (1980) Manual de Técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis. Ed. Francisco Méndez Cervantes, México.

Salazar, P.M.; De Haro, I.; Ruiz, H.A. y Lobo, M.G. (1984) Investigación de otro probable mecanismo de infección en la cisticercosis. I. Informe de los hallazgos preliminares. Arch. Invest. Med. 15: 205-212

Sato, H. y Kamiya, M. (1990) Establishment, development and fecundity of Taenia crassiceps in the intestine of prednisolone-treated mongolian gerbils and inbred mice. J. Helminthol. 64: 217-222

Sarti, E.; Schantz, P.M.; Lara-Aguilera, R.; Gómez-Dandoy, H. y Flisser, A. (1988) Taenia solium taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. Trop. Med. Parasitol. 39: 194-198

Sarti, E. (1989) Epidemiología de la teniasis/cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. CONACYT y Limusa Noriega. México. 233-242

Schantz, P.M. y Sarti, E. (1989) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of Taenia solium infection. Acta Leidensia. 57: 153-163

Schenone, H.; Villarroel, F.; Rojas, A. y Ramírez, R. (1982) Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Lacllette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 25-38

Schwabe, C.W.; Riemann, H.P. y Franti, C.E. (1977) Epidemiology in veterinary practice. Lea and Febiger, Philadelphia

Smith, J.D. y McManus, D.P. (1989) The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Great Britain.

Sotelo, J.; Escobedo, F.; Rodríguez, C.; Torres, B. y Rubio, D. (1984) Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. New England J. Med. 310: 1001-1007

Stefaniak, J. (1989) Studies of secretory activity and pathomorphology of the gastric mucosa to taeniasis (Taenia saginata) Wiad-Parazytol. 35: 93-104

- Stoll, N.R. (1947) This wormy world. J. Parasitol. 33: 1
- Straka, S.; Skracikova, M.; Michal, L. y Konvit, I. (1989) Evaluation of ovoscopic method in the diagnosis of invasion with the tapeworm, Taenia saginata. Cas Lek. Cesk. 128: 56-58
- Tay, J.; Salazar, P. y de Haro, I. (1976) Frecuencia de las helmintiasis en México. Rev. Inv. Salud. Públ. Méx. 36: 241
- Téllez-Girón, E.; Méndez, F.; Ramos, M.; Dufour, L.; Montante, M.; Téllez, E.; Rodríguez, J. y Mireles, E. (1984) Treatment of neurocysticercosis with flubendazole. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33: 627-631
- Téllez-Girón, E.; Ramos, E.; Dufour, M.; Alvarez, P. y Montante, M. (1987) Detection of Cysticercus cellulosae antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 37: 169-173
- Torres, A. (1990) Evaluación del efecto de diferentes dosis de praziquantel en cerdos parasitados naturalmente con el metacéstodo de la Taenia solium. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tsang, V.; Brand, J. y Boyer, A. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (Taenia solium). J. Inf. Dis. 159: 50-59
- Ungar, B.L.; Yolke, R.H.; Nash, T.E. y Quinn, C. (1984) enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens. J. Inf. Dis. 149: 90-97
- Vargas, G.; Saldierna, U.; Navarro, R.; Acevedo, A.; Flisser, A. y Aluja, A. (1986) Localización del cisticerco de la Taenia solium en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. Vet. Mex. 17: 275-279
- Vasconcelos, D.; Cruz-Segura, H.; Mateos-Gómez, H. y Zenteno-Alanís, G. (1987) Selective indications for the use of praziquantel in the treatment of brain cysticercosis. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 50: 383-388
- Velasco-Suárez, M.; Bravo-Becherelle, M. y Quirasco, F. (1982) Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Lacleite, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 47-51
- Vergara, J.A. (1970) Selectividad tisular de Cysticercus cellulosae en cerdos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Verster, A. (1971) Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of Taenia solium Linnaeus, 1758 and Taenia saginata Goeze, 1782. Onderstepoort J. Vet. Res. 38: 63-64

Verster, A. (1974) The golden hamster as a definitive host of Taenia solium and Taenia saginata. Onderstepoort J. Vet. Res. 41: 23-28

Viscidi, R.; Laughon, B.E.; Hanvanich, M.; Bartlett, J.G. y Yolken, R.H. (1984) Improved enzyme immunoassays for the detection of antigens in fecal specimens. Investigation and correction of interfering factors. J. Immunol. Meth. 67: 129-143

Voller, A.; Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull WHO 53: 55-65

Williams, J.F.; Engelkirk, P.G. y Lindsay, M.C. (1982) Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 621-632

Willms, K.; Merchant, M.; Díaz, S. y Arcos, L. (1982) Host-parasite interface in the metacestode of Taenia solium. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 397-411

Yoshino, K. (1933) Studies on the post-embryonal development of Taenia solium. J. Med. Ass. Formosa 32: 139-171

Zenteno-Alanís, G.H. (1982) A classification of human cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltrán, F. Academic Press. New York. 107-126

Zhi-biao, X.; Wen-kai, Ch.; Hui-lan, Z.; Man-ling, F. y Wei-ji, C. (1985) Praziquantel in treatment of cysticercosis cellulosae. Report of 200 cases. Chinese Med. J. 98: 489-494