

302 827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Taenia solium* EN 3 COMUNIDADES DEL ESTADO DE MORELOS

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ROCHA CASTRO ILEANA

FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1995



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.

**Trabajo realizado en la Facultad de Medicina, Departamento  
de Microbiología y Parasitología, UNAM.**

**Bajo la dirección de M.en C. Agustín Plancarte.**

## AGRADECIMIENTOS

Al maestro Agustín Plancarte por todo su apoyo y la paciencia prestada para la realización de este trabajo.

A la doctora Ana Flisser por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis Padres

Por todo su apoyo y amor.

# INDICE

	Pág.
Capítulo I	
INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del Problema	2
1.2 Objetivo	3
1.3 Hipótesis	3
Capítulo II	
ANTECEDENTES	
2.1 Generalidades	5
2.2 Clasificación Taxonómica de <i>Taenia solium</i> (Cheng 1978)	6
2.3 Ciclo Biológico	7
2.4 Morfología	9
2.5 Inmunología	11
2.6 Clasificación de la Cisticercosis	11
2.7 Neurocisticercosis	12
2.8 Clasificación de la Neurocisticercosis (Madrazo 1989)	13
2.9 Sintomatología	14
2.10 Síntomas y Signos más frecuentes en Cisticercosis Cerebral	15
2.11 Tratamiento	17
2.12 Diagnóstico	19
2.13 Teniasis	20
2.14 Epidemiología	21
Capítulo III	
PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Diagrama General	25
3.2 Material, Reactivos y Equipo	26
3.2.1 Material Biológico	26
3.2.2 Material de Laboratorio	26
3.2.3 Equipo	27
3.2.4 Reactivos	27
3.3 Metodología	28
3.3.1 Obtención de LL-GP (Antígeno)	28
3.3.2 Cromatografía de Afinidad (lentil-lectina Sefarosa)	30
3.3.3 Cuantificación de Proteínas	30
3.3.4 Análisis de LL-GP por Electroforesis	31
3.3.5 Geles de Poliacrilamida	32
3.3.6 Electroforesis	33
3.3.7 Transferencia	33
3.3.8 Tinción con Aurodye-Forte	34
3.3.9 Revelado con Anticuerpos	35
3.3.10 Western-Blot	35
3.4 Análisis Estadístico	36

## Capítulo IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Resultados	37
4.1.1	Clasificación de las muestras	37
4.1.2	Informe de resultados	37
4.1.3	Localización y características de la población	39
4.1.4	Solubilización de las glicoproteínas de los cisticercos de <i>T. solium</i>	42
4.1.5	Cromatografías de afinidad (Sefarosa 4B lentil-lectina)	42
4.1.6	Análisis de los dos picos obtenidos en la cromatografía de afinidad	42
4.1.7	Evaluación de los sueros controles positivos y negativos	57
4.1.8	Evaluación de la fracción antigénica LL-GP con Auro dye forte	58
4.1.9	Evaluación de la fracción antigénica LL-GP con anticuerpos	58
4.1.10	Análisis de la presencia de anticuerpos anticisticercos en la población abierta	61
4.2	Discusión	63

## Capítulo V

Conclusiones	67
Bibliografía	71
Apéndice	84

# CAPITULO I

# INTRODUCCION

## 1.1 Planteamiento del Problema

La teniasis y cisticercosis debidas a *Taenia solium* son un problema parasitario asociado a las malas condiciones de salud pública en países en vías de desarrollo, dado que estos carecen de una estructura económica sólida, además, de tener una cultura que favorece su ciclo biológico.

Así tenemos que por las características de subdesarrollo de los países afectados, estos sólo cuentan con datos de morbilidad y mortalidad obtenidos en estudios de series de autopsias y de la población hospitalaria mismos que no reflejan la distribución real de esta parasitosis por excluir a la población abierta.

Asociado a lo anterior existen muchos casos de neurocisticercosis asintomáticos y el que la teniasis sea difícil de diagnosticar, lo que implica tener cifras no verdicas de los individuos infectados en la población abierta obstaculizando cualquier medida de control.

El realizar estudios de seroprevalencia en la población abierta permitirá con mayor acierto conocer diversos datos sobre la presencia del parásito en la comunidad, necesarios para implementar programas de control así como ser una herramienta para evaluar estos mismos.

## **1.2 Objetivo**

Obtener la seropositividad humana anti-*T. solium* en las comunidades de Atotonilco, Tetelilla y Chacaltzingo, en el estado de Morelos en apoyo al proyecto más amplio de evaluar dos medidas de intervención para el control de *T. solium* educación para la salud y tratamiento masivo antitenisida.

## **1.3 Hipótesis**

México es considerado como un país endémico para *Taenia solium* debido a sus condiciones socio-económicas y culturales principalmente, entonces es factible demostrar la presencia de anticuerpos específicos contra *T. solium* en la población abierta por métodos de inmunodiagnóstico.

## CAPITULO II

# ANTECEDENTES

## 2.1 Generalidades

*T. solium* es un cestodo parásito del hombre y del cerdo que en el primero produce tanto teniasis como cisticercosis y en el segundo exclusivamente cisticercosis, es decir, el hombre puede ser tanto huésped intermediario, como definitivo el cerdo sólo intermediario.

Los cisticercos en el hombre pueden encontrarse en cualquier tejido de su cuerpo pero en México y otros países de Latinoamérica es en el sistema nervioso central, el sitio más afectado, a diferencia de los individuos del continente asiático en el que se presentan más en el músculo esquelético (80).

## 2.2 CLASIFICACION TAXONOMICA DE *Taenia solium* (Cheng 1978)

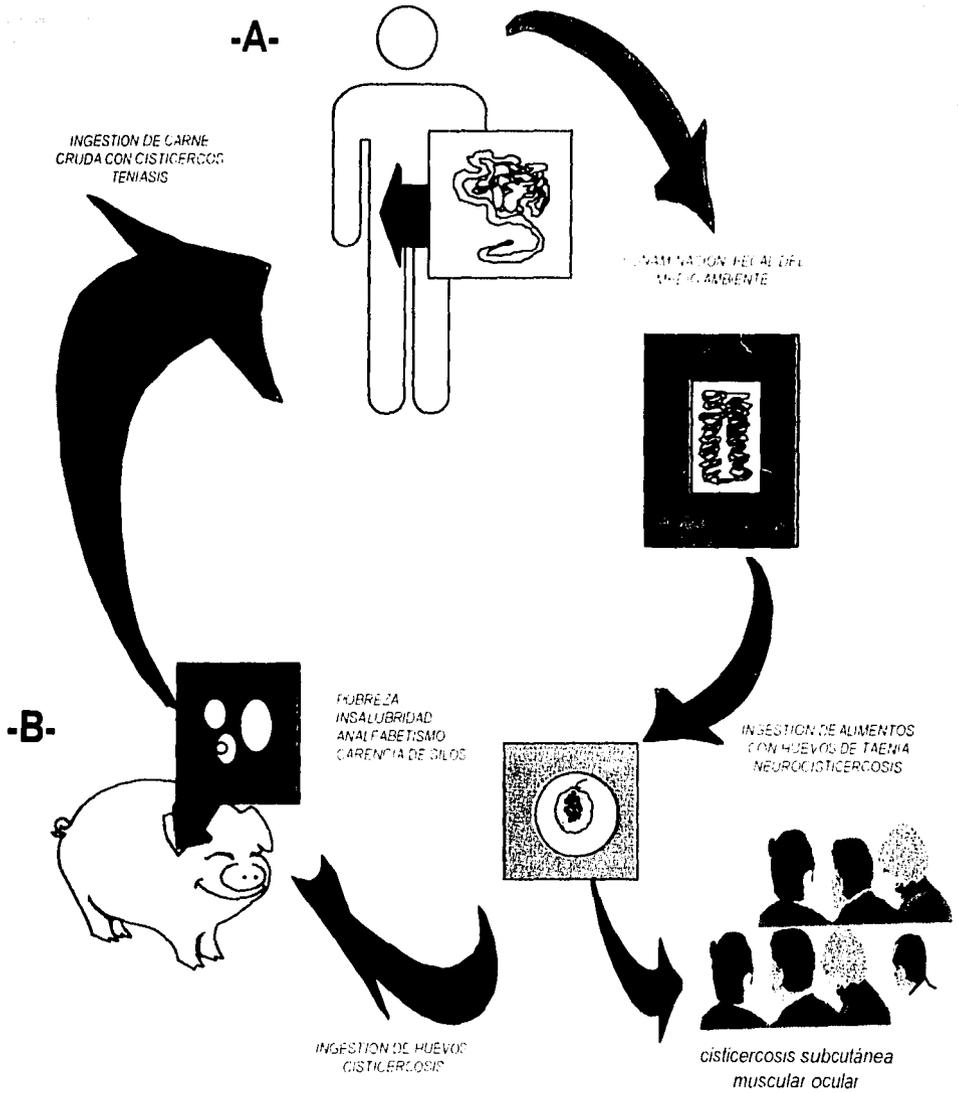
<i>PHYLUM</i>	<i>Platyhelminthes</i>
<i>CLASE</i>	<i>Cestioidea</i>
<i>SUBCLASE</i>	<i>Cestoda</i>
<i>ORDEN</i>	<i>Cyclophyllidea</i>
<i>FAMILIA</i>	<i>Taeniidea</i>
<i>GENERO</i>	<i>Taenia</i>
<i>ESPECIE</i>	<i>Taenia solium</i> (Linnaeus, 1758)

## 2.3 CICLO BIOLÓGICO

La forma en que el hombre y el cerdo adquieren cisticercosis es ingiriendo los huevecillos de *T. solium* que un individuo teniásico liberó junto con su excremento y contamina el medio ambiente. En el aparato digestivo la acidez de los jugos gástricos y enzimas actúan sobre los huevecillos permitiendo que se rompan las membranas oncosferales y queden en libertad los embriones hexacanto, estos con movimientos amiboides atraviesan la pared intestinal y son transportados por el torrente sanguíneo a cualquier parte del cuerpo (78) y probablemente por diferencia de tamaño con los capilares quedan fijados en algún sitio. El crecimiento de estos embriones culmina en los tejidos o cavidades cerebrales hasta la fase de larvas o cisticercos de forma ovoide formados por una membrana que limita al escólex y líquido vesicular.

Cuando el hombre come carne de cerdo con cisticercos mal cocida estos evaginan también en el aparato digestivo, es decir, el escólex sale de su vesícula por la acción de las enzimas gástricas y gracias a su doble corona de ganchos y cuatro ventosas situadas en el rostelo se fijan a la pared intestinal y continúan su crecimiento hasta la fase adulta o solitaria, desarrollándose decenas de proglótidos, los cuales se encuentran llenos de miles de huevecillos maduros que libera el teniásico al medio ambiente, estos pueden infectar a humanos generándose nuevos casos de cisticercosis (31).

# CICLO DE VIDA DE TAENIA SOLIUM



**"A": EL SER HUMANO ES EL UNICO HUESPED DEFINITIVO**  
**"B": EL CERDO ES EL HUESPED INTERMEDIARIO HABITUAL**

## 2.4 MORFOLOGIA

Los huevecillos de *T. solium* son microscópicos, miden de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro y están formados por el embrión hexacanto en su parte interna llamada así por tener 3 pares de ganchos, éste cubierto por una membrana denominada oncosferral, la cual se rodea por una pared externa estriada conocida como embrióforo, a su vez rodeada por el vitelo donde el céstodo obtiene sus nutrientes (37).

El cisticerco o larva de *T. solium* se desarrolla entre 24-72 horas (2), siendo una estructura de hasta 0.5 mm fácilmente visibles que alberga en su interior el escólex invaginado (65), rodeado por una estructura llamada micrótica (57), a través de la cual se realiza el intercambio metabólico (42).

El gusano adulto tiene un cuerpo aplanado y alargado de color blanquecino lechoso, el cual puede llegar a medir de 2 a 9 m de longitud (4), en un extremo se encuentra el escólex que llega a medir de 1 a 2 mm, en el mismo está el rostelo que mide de 159 a 173 mm con una doble corona de ganchos y 4 ventosas de 0.5 mm cada una. Después del escólex se encuentra una parte llamada cuello donde están los proglótidos, que son unidades de reproducción, llegando a existir ejemplares hasta con 800 ó 1000 de estos, el conjunto de proglótidos que se unen entre sí y que son la última parte del cuerpo del parásito se llama estróbilo, distinguiéndose 3 tipos diferentes, inmaduros, que son los más cercanos al cuello y no cuentan con órganos sexuales diferenciados, maduros están en la parte media del parásito y ya tienen órganos sexuales masculino y femeninos, finalmente los proglótidos grávidos que tienen un útero ramificado tubular repleto de huevecillos (75) (12).

Se sabe que cada segmento maduro es un órgano de reproducción independiente en donde se realiza la fecundación (10) y que el gusano adulto tiene una gran capacidad reproductiva de hasta 100,000 huevecillos por proglótido grávido.

La alimentación se realiza mediante la captación y digestión del contenido intestinal, que obtiene del huésped, la cual se realiza por el sincicio celular del tegumento de los proglótidos mediante difusión o a través de transporte activo de moléculas de bajo peso molecular o usando un proceso de endocitosis (10).

## 2.5 INMUNOLOGIA

Estudios realizados (6), (23), (49) han demostrado que el ser humano es capaz de producir una respuesta inmune contra *T. solium*, ya que desarrolla anticuerpos específicos al menos contra la etapa larval del parásito.

Actualmente se sabe que la respuesta inmune del huésped contra el cisticerco es de tipo humoral, dada principalmente por la inmunoglobulina de la clase IgG (23), (48) que responde a 8 antígenos específicos del parásito en pacientes con neurocisticercosis al ser analizados sus sueros en inmunoelectroforesis (IEF). De estos antígenos por el mismo procedimiento se ha realizado la detección en mayor porcentaje del llamado "antígeno B" el cual se ha encontrado en un 84% de positividad siendo una proteína de secreción del parásito formada por 2 unidades de 95 y 105 KDa. (32, 38).

Tanto por el IEF como la prueba inmunoenzimática (ELISA) se detectaron otras inmunoglobulinas en menor porcentaje en líquido cefalorraquídeo y en suero, siendo los porcentajes muy similares en ambas muestras, IgM 50%, IgA 26%, IgE 3%, e IgD indetectable (16). Otros antígenos que también han sido reportados como específicos en pacientes con neurocisticercosis son los de 26 y 8 KDa. (23, 29).

## 2.6 CLASIFICACION DE LA CISTICERCOSIS

La forma más conocida de esta infección producida por un cestodo es la causada por la larva de *T. solium* (47). La cual se ha clasificado en 2 grandes grupos; asintomática y sintomática, que a su vez se subdividen en 4 categorías (77).

- A) **Cisticercosis diseminada:** Se puede encontrar a los parásitos en tejido subcutáneo, músculo estriado o lugares como hígado, pulmón, médula espinal, etc.
- B) **Oftalmocisticercosis:** la localización de cisticercos es en ojo, llegando a través de vasos retinianos al humor vitrio, también se llega a localizar en órbita, conjuntiva o retina en donde puede causar glaucoma o aparentar un tumor.
- C) **Cisticercosis mixta:** Los cisticercos se alojan en al menos uno o más de los sitios ya mencionados.
- D) **Neurocisticercosis:** La localización de los parásitos es en el sistema nervioso central.

## 2.7 *NEUROCISTICERCOSIS*

Debido a que la neurocisticercosis es una enfermedad multifacética donde se pueden observar manifestaciones clínicas diversas se han realizado trabajos con el objeto de clasificarla. (19, 66, 67, 79) los cuales se basan en: número de quistes presentes, (celuloso, racemoso, meníngea o ambos), localización (parenquimatoso, meníngea o ventricular), respuesta inflamatoria producida y complicaciones asociadas (leptomeningitis, encefalitis, mielitis, ependimitis, etc.).

**2.8 CLASIFICACION DE LA NEUROCYSTICERCOSIS (Madrazo 1989)**

Localización del Parásito	Duración de la Enfermedad	Estado del Parásito
Parénquima	Aguda  Crónica	Quístico  Vivo Quístico Granuloma Calcificado
Ventricular	Aguda  Crónica	Quístico  Vivo Quístico Quiste  Granuloma Calcificado
Subaracnoidea	Aguda  Crónica	Quístico  Vivo Quístico Granulomatoso Calcificado

## 2.9 SINTOMATOLOGIA

La presencia del cisticerco de *T. solium* en sistema nervioso central produce:

- A) Efectos mecánicos de presión
- B) Destrucción de tejido
- C) Reacción inflamatoria como respuesta tisular del huésped a la presencia del parásito.

El resultado de la combinación de estos factores es la aparición de síntomas, pero como en muchas ocasiones esta enfermedad cursa como asintomática, siendo observado entre el 25 y 80% de los casos sólo por autopsia (53).

Dependiendo de la localización del parásito, se observan diferentes síntomas, así cuando se hospeda en ventrículo hay hipertensión intracraneal, en membranas se observa meningitis y aracnoiditis, mientras que en parénquima el síntoma más frecuente es la epilepsia que se da por cisticercos en fase quística o calcificada (que resulta de la presencia de sales de calcio en el cisticerco muerto) Siendo únicos o múltiples (11).

## **2.10 SINTOMAS Y SIGNOS MAS FRECUENTES EN CISTICERCOSIS CEREBRAL**

Depresión

Cuadriplejia

Síndrome febril

Síndrome meníngeo

Disminución del reflejo nauseoso

Disminución de la memoria

Disminución de la agudeza visual

Crisis convulsivas

Vómito

Cefaléa

Náuseas

(73, 79).

De los síntomas y signos mencionados anteriormente se considera el cuadro convulsivo como "signo epidemiológico proximal", ya que datos reportados por Sarti (1989), 78% de individuos que presentaron convulsiones son compatibles con neurocisticercosis en regiones rurales, mientras que en estudios hospitalarios se reporta una relación de neurocisticercosis- crisis convulsiva de un 36-53% (15, 66).

Por lo que la etiología más frecuente de crisis de inicio tardío es la neurocisticercosis. (Organización Mundial de la Salud, 1993).

Según la morfología que adoptan en el encéfalo los cisticercos se han clasificado en tres grupos: racemoso, celuloso e intermedio. (54).

**RACEMOSO:** Se conoce con este nombre por su semejanza con un racimo de uvas, pero también puede tener formas irregulares lobuladas. Son de gran tamaño por el desarrollo de su membrana y una característica importante es que carecen de escólex. Se localizan con mayor frecuencia en meninges y ventrículos causando la sintomatología mencionada anteriormente.

**CELULOSO:** Es generalmente de tamaño menor al racemoso, se caracteriza por tener una membrana opalina y escólex. Se asocia a la neurocisticercosis benigna y en gran número a casos asintomáticos de parénquima.

**INTERMEDIO:** se ha llamado así por tener características tanto de racemoso como celuloso, ya que cuenta con escólex y membrana opalina. Se encuentra en ventrículos y meninges pero no con mucha frecuencia (53).

La variedad morfológica se ignora, pero es bien sabido que se trata de larvas de *Taenia solium* y que el tipo de cisticerco depende de la amplitud del sitio donde se localiza (54).

Finalmente las manifestaciones clínicas mencionadas anteriormente dependen en gran medida del número de parásitos de su localización, del tiempo de evolución, extensión y gravedad de la respuesta inflamatoria del huésped (54).

## 2.11 Tratamiento

El tratamiento de la neurocisticercosis es variado y esto depende del cuadro clínico, de las características del parásito (racemoso, quístico o calcificado), así como de la patología presentada (meningitis, aracnoiditis, hidrocefalia, vasculitis, etc.) y la localización.

Así se tiene que el tratamiento puede ser sintomático, quirúrgico o antiparasitario.

*Tratamiento sintomático:* se busca el control de las crisis convulsivas con el uso de antiepilépticos, control de cefalea con analgésicos y el control de procesos inflamatorios mediante esteroides.

*Tratamiento quirúrgico:* este depende de la localización del cisticerco, por lo que solo se considera como candidato a este tratamiento los individuos que presenten: quistes mayores de 2 cm de diámetro que produzcan síntomas neurológicos focales u obstrucción ventricular, hidrocefalia o compresión de médula espinal, el procedimiento utilizado se enfoca a diferentes cosas, como la extirpación del cisticerco para evitar el bloqueo que se da principalmente cuando está en ventrículo, evitar la compresión cuando el cisticerco se aloja en parénquima.

Tratamiento antiparasitario: se usa para destruir al parásito habiéndose empleado el mebendazol, metrifonato, flubendazol, albendazol y recientemente el prazicuantel. El mebendazol es un fármaco que actúa a nivel del tegumento provocando la vacuolización, degeneración y necrosis del cisticerco, reportándose datos de reducción en el número de quistes de hasta un 86% (56). El prazicuantel, es actualmente el fármaco antihelmítico más usado, ya que no produce efectos tóxicos (sólo en algunos casos se ha observado molestias gastrointestinales) se absorbe, metaboliza, y excreta en diversos metabolitos en mayor cantidad por vía renal (en 24 horas luego de su administración) además de no producir efectos carcinogénicos (25).

La acción del fármaco sobre el parásito se realiza en pocos segundos, mediante la contracción del metacéstodo con la vacuolización del tegumento, habiendo una interferencia en el metabolismo de carbohidratos, lo cual se debe a que el fármaco es capaz de penetrar la pared quística.

La dosis recomendada es de 50 mg/kg de peso, siendo solo una pequeña cantidad la que llega a cerebro y solamente una séptima parte se encuentra en líquido cefalorraquídeo. (15).

La eficiencia de este fármaco está dada por la destrucción de quistes localizados en parénquima o espacio subaracnoideo (46).

## 2.12 Diagnóstico

Debido a la gran variedad de síntomas que se presentan en la neurocisticercosis humana es difícil su diagnóstico ya que se puede confundir con otras enfermedades del sistema nervioso como tumores, tuberculomas, etc. (43). El apoyo mediante el uso de técnicas de laboratorio que son básicamente de tipo inmunoenzimático así como el uso de la imagenología han sido de gran utilidad para confirmar la presencia del parásito.

*Diagnóstico inmunológico:* En los últimos años se ha dado un gran avance en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas de enfermedades parasitarias, las cuales se basan en reacción antígeno-anticuerpo en donde la unión es de tipo químico tiene un alto grado de especificidad (74). Así la cisticercosis es un ejemplo claro de esto en donde se han implementado gran número de técnicas cualitativas y cuantitativas, en las cuales se emplea antígenos de diferentes partes del parásito, los cuales se obtienen mediante métodos de preparación y extracción usando en la gran mayoría de ellos extractos crudos (33), pero actualmente se pone mayor atención en la selección de antígenos purificados específicos ya que los extractos crudos presentan reacciones cruzadas entre helmitos (*Taenia hidatigena*, *Echinococcus granulosus*), por lo que técnicas como: fijación de complemento, (49), inmunofluorescencia indirecta (37, 7, 31), hemaglutinación indirecta, (36), ensayo inmunoenzimático, entre otras, no se consideraron totalmente adecuadas. En la actualidad la técnica de elección es la inmunoelectrotransferencia (Wester-blot) en la que se usa un antígeno purificado glicoprotéico teniendo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% (71).

*Diagnóstico imagenológico:* Es de gran apoyo la resonancia magnética nuclear y la tomografía axial computarizada. (TC).

Con la introducción de la TC (34), se tiene una certeza diagnóstica del 97% siendo un método certero, seguro y no agresivo, en el cual se puede establecer con claridad la localización del cisticerco.

La desventaja de este método es que tiene un alto costo además del reducido número de sitios donde se realiza en el país.

La resonancia magnética nuclear se puede comparar con un corte histológico y nos indica la etiología y el lugar de la lesión de una manera muy precisa, pero al igual que la TC tiene un alto costo (59).

### 2.13 *Teniasis*

Es exclusiva del hombre causada por el establecimiento de la forma adulta en su intestino y por lo tanto, es el único responsable de la diseminación de los huevecillos provocando nuevos casos de cisticercosis.

**Manifestaciones clínicas:** Es generalmente asintomática presentando ocasionalmente anorexia, dolor abdominal, náuseas, indigestión crónica, diarrea, síntomas nerviosos de origen tóxico, eosinofilia del 10 al 12% (75). Esta forma de la parasitosis de *Taenia solium* presenta un cuadro clínico difícil de diagnosticar por pasar frecuentemente desapercibido por la ignorancia de los individuos (13).

**Diagnóstico:** el diagnóstico de la teniasis para hacer la diferenciación entre especies no ha tenido gran impulso en el desarrollo metodológico ya que no se considera a la enfermedad

como un problema de salud pública importante (8), por lo cual se sigue usando para su identificación métodos con un 50% de sensibilidad (63), en los cuales se realiza la observación de proglótidos en tamizado de heces o mediante la observación de huevecillos.

Para realizar el diagnóstico diferencial de tenia se hace obteniendo al parásito entero y examinando el escólex, que es la única región donde se puede diferenciar entre especies, ya que *T. solium* tiene una doble corona de ganchos y *T. saginata* no es armada.

También otra manera de diferenciarlas es por examen microscópico de proglótidos maduros ya que *T. solium* presenta entre 7 y 12 ramas uterinas y *T. saginata* 11 y 19 ramas (8).

La teniasis también se ha observado que causa apendicitis y pancreatitis (52).

Tratamiento: se usan los mismos antiparasitarios ya mencionados para cisticercosis, pero con dosificaciones de 15 mg/kg de peso en dosis única, siendo 100% efectiva (6).

## 2.14 Epidemiología

La cisticercosis es un padecimiento frecuente y endémico en países en vías de desarrollo de África, Asia y América (45) que afecta particularmente a comunidades en las cuales las condiciones higiénicas y sanitarias son deficientes además de ser una enfermedad potencialmente invalidante que da origen a severas secuelas neurológicas y es causa de una mortalidad significativa en algunos países, en los cuales se reportan cifras de hasta 40% (58). La incidencia en Latinoamérica es: Perú 1%, Colombia 0.6%, Venezuela 0.5%, Brasil 2% y México 2%. A nivel mundial se informó de 3 millones de personas que padecían cisticercosis (9).

En México los estados que presentan mayor incidencia en porcentaje de neurocisticercosis fueron: Guerrero 24.4, Michoacán 12.7, San Luis Potosí 7.8, Puebla 7.1 (61). Estos datos indican que la prevalencia de la neurocisticercosis en México es elevada, ya que también se ha reportado que del 100% de tumores intracraneales la cisticercosis es causa del 25 al 28% de los mismos (40). Por lo que se considera a México como un país de alta endemicidad (OMS 1979). Otro dato importante es el reportado para cisticercosis y teniasis por la dirección general de epidemiología donde hubo solos 3 casos en 1981 y el número aumentó considerablemente a 583 para 1989 (18).

Además del problema de salud pública que origina la enfermedad es importante mencionar las pérdidas económicas causadas por el deshecho de carne infectada no apta para el consumo humano (3). En 1981 en 75 rastros de 22 entidades del país la frecuencia global fue de 1.52% y el porciento por entidad fue: Chihuahua 3.32%, La Piedad, Michoacán 10%, Ocampo, Gto. 10%, Distrito Federal 0.14%, (1).

En otros países la cisticercosis porcina es 5.7% para Perú, 38% Haití, y en general para Centroamérica 2.13% (3).

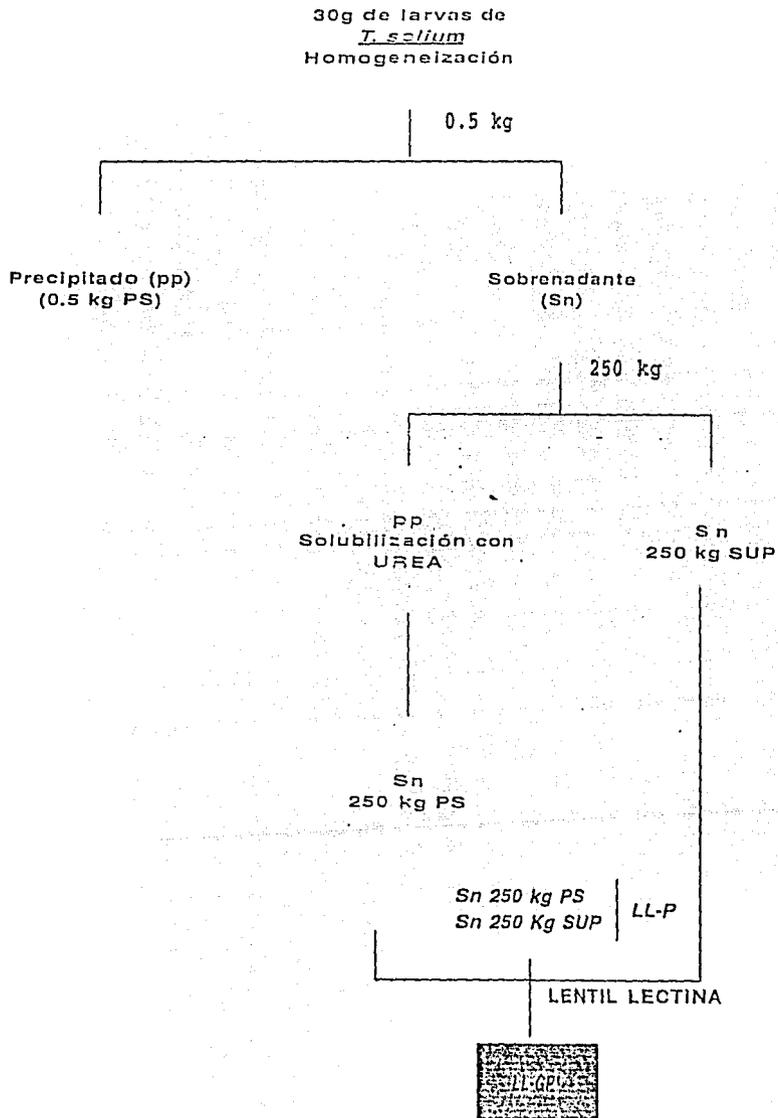
Debido a que la mayoría de los datos sobre mortalidad y morbilidad que se tienen acerca de la cisticercosis humana en nuestro país provienen de centros hospitalarios y que además una característica de esta parasitosis es pasar asintomática en aproximadamente 70% de los individuos infectados (55), es difícil conocer la cantidad de individuos parasitados en la población abierta, una alternativa que abre la posibilidad de aclarar este dato es el realizar estudios seroepidemiológicos dirigidos a buscar anticuerpos específicos contra *T. solium* en la población abierta.

Así en 1974 el IMSS colectó 20,000 sueros que fueron representativos de todos los estados de la República y que se les analizó la presencia de anticuerpos específicos, resultando una frecuencia del 1% de positividad para cisticercosis. Otros estudios con menor número de muestras se realizaron en las comunidades rurales de: Oaxaca con un 3.3% de seroprevalencia usando la técnica de hemaglutinación indirecta (27), en Chiapas hubo de un 0.4 al 7.6%, con la técnica de inmunolectroforesis (21), en el Estado de Sinaloa 12.3% usando la técnica inmunoenzimática Elisa (14), en el Sótano Hidalgo 3.4% con Elisa (60) y en Xoxocotla 10.8% por inmunolectroforesis (62).

## CAPITULO III

# PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1 DIAGRAMA DE OBTENCION DE LL-GP



## 3.2 Material, Reactivos y Equipo

### 3.2.1 Material Biológico

#### *Sueros*

Se obtuvo sangre por punción venosa de 5058 individuos de las poblaciones de Tetelilla, Atotonilco y Chalcatzingo, en el Estado de Morelos, las cuales fueron centrifugadas para obtener el suero de cada individuo, estos se colocaron en tubos foliados y fueron transportados en termos con anticongelantes hasta el laboratorio donde se almacenaron en un refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### *Larvas de Taenia solium*

La obtención de cisticercosis de *T. solium* (30 g) se hizo mediante una disección cuidadosa de músculo esquelético de cerdos infectados. Las larvas fueron colocadas en hielo seco sobre un papel aluminio durante este proceso y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.2.2 Material de Laboratorio

Matraz aforado de 50, 100 y 5000 ml.

Pipetas serológicas de 5, 10 ml.

Pipetas automáticas de eppendorf

Placas Immulon tipo I Dynatech. La.é.

Vasos de precipitado de 20, 100, 200, 2000, y 5000 ml.

### ***3.2.3 Equipo***

Agitador thermolyde mod. s-17415  
Agitador corning po-351 hot-plate  
Agitador red-rocker Hoefler  
Balanza analítica Bosch mod. 144  
Cámara de electroforesis Hoefler mod. se 600  
Cámara de transferencia Idea scientific  
Cámara peristáltica  
Columna de lentil-lectina  
Espectrofotómetro  
Homogenizador Polytron mod. 11590  
Multicaster mod. se 600  
Potenciómetro Orion reserch mod. 301  
Tanque de nitrógeno líquido

### ***3.2.4 Reactivos***

Acrilamida Bio-Rad  
Acido etilendiamino tetracético EDTA sigma  
Agua destilada  
Anti-IgG humana gamma Zimed  
Azul de bromo fenol Bio-Rad  
Bis N, n' -metilen-bis-acrilamida Bio-Rad  
Dodecil sulfato de sodio (SDS) Bio-RAD  
Cloruro de sodio Bio-Rad  
Etanol absoluto Merck

Fosfato de sodio dibásico Bio-Rad  
Fenil-metil-sulfonil-fluorina (PMSF)  
Glicerol  
Glicina Bio-Rad  
Hidróxido de sodio Bio-Rad  
Isopropanol Backer  
Leche semidescremada Sveltes  
Metanol absoluto Backer  
Merthiolate  
Persulfato de amonio Bio-Rad  
Sacarosa Merck  
Tris (hidroximetil) amino metano Bio-Rad  
TEMED (N,N,N',N'' tetrametil-triendiamina  
2 Mercapto etanol.  
Todos los reactivos utilizados son Qp

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 Obtención de LL-GP (Antígeno)

Los 30 g de cisticercos obtenidos se lavaron con 150 ml de solución amortiguadora de SACAROSA/HEPES/PMSF (0.05 M HEPES-NaOH, 0.25 M SACAROSA, 2 mM ACIDO -ETILEN-DINITROTETRA-ACETICO, EDTA. 5 Mm parfenilmetil-sulfonil-fluoro, PMSF, pH 7.2) a 37°C. Debido a que la solución de PMSF es muy fácilmente hidrolizable fue necesario realizar el siguiente procedimiento cada vez que se utilizó: se preparó una solución de 100 mM

PMSF en isopropanol absoluto, que se mantuvo a baja temperatura, el amortiguador final de PMSF 5 mM se usó en los 20 minutos siguientes.

Los cisticercos ya lavados fueron homogenizados en frío con HEPES/SACAROSA/PMSF, usando para esto un polytrón a 800 rpm, durante un minuto y descansando otro por diez veces hasta obtener una mezcla homogénea, posteriormente se centrifugó a 500 g por minuto y se obtuvo un sobrenadante (S1), el cual fue separado cuidadosamente, mientras que al precipitado obtenido se le volvió a adicionar solución amortiguadora de SACAROSA/HEPES/PMSF y se homogeneizó como se mencionó anteriormente, se centrifugó a 500 rpm/20 minutos y se obtuvo un nuevo sobrenadante el cual fue combinado con el obtenido anteriormente, mientras que el segundo precipitado fue desechado.

Los 2 sobrenadantes S1 "0.5 kg" fueron centrifugados a 250,000 rpm por 2 horas.

La capa lipídica que estaba en el sobrenadante se retiró cuidadosamente usando un papel absorbente.

El precipitado resultante se resuspendió nuevamente en 20 ml de solución amortiguadora de UREA/PMSF (8 urea, 0.05 M tris-HCl, 5 Mm PMSF pH 8) y fue centrifugado a 48,000 rpm por una hora a 4°C, luego de lo cual el sobrenadante se dializó contra tris-HCl durante toda la noche, esto con el objeto de eliminar el exceso de urea, a esta fracción se le llamó 250 KG ppt, el sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 250,000 rpm y el obtenido a 48,000 rpm se concentró mediante un proceso de ultrafiltración con presión negativa ejercida con nitrógeno gaseoso en un sistema AMICON con una membrana de YM-10.

Estas fracciones fueron llamadas 250 KG SOB, las fracciones 250 KG ppt y 250 KG SOB, finalmente fueron combinadas para formar la fracción que llamamos LL-P.

### *3.3.2 Cromatografía de Afinidad (lentil-lectina Sefarosa)*

El propósito de realizar una cromatografía de afinidad fue para obtener una fracción enriquecida en glicoproteínas para lo cual se utilizó una columna de vidrio de 5 cm de diámetro por 30 cm de alto usando 50 ml de sefarosa 4B lentil-lectina (la capacidad de trabajo de esta columna fue de 3 mg de proteína por ml de lectina), para equilibrar la columna se usó un amortiguador de NaCl 0.2 M, TRIS 0.05 M pH 8 después se hizo pasar la muestra 10 ml a 15 mg/ml (LL-P) a través de la columna y el material que no fue adherido a la columna se lavó con 8 volúmenes de NaCl 0.2 M tris 0.05 M pH 8. las glicoproteínas que se pegaron a la columna de lentil-lectina se eluyeron con 5 volúmenes de 0.2 M de solución de alfa-metil manosido, en 0.2 m NaCl y 0.05 M Tris-HCl pH 8.

Estas fracciones denominadas LL-GP, fueron concentradas por ultrafiltración previamente descrita, usando también una membrana YM-10. La tabla 1 muestra los valores obtenidos en la cromatografías de sepharosa 4B-lentil-lectina, y las gráficas de cada una de las 11 cromatografías realizadas se encuentran en las figuras de la página 46 a la 56.

### *3.3.3 Cuantificación de Proteínas*

Para realizar la cuantificación de proteína se empleó el método de Lowry, (1951) construyendo una curva patrón con 10, 20, 50 y 100 mg/ml de albúmina bovina sérica a la cual se le ajustaron las densidades ópticas de las muestras experimentales. A la curva patrón se le

calculó la pendiente (m), ordenada al origen y el coeficiente de correlación lineal para ver que su comportamiento fuera directamente proporcional y así poder interpolar los valores obtenidos experimentalmente. (ver apéndice).

### *3.3.4 Análisis de LL-GP por Electroforesis*

Se realizó la técnica de Laemmli (39) en el desarrollo de las electroforesis para el análisis de la pureza y peso molecular de fracción de LL-GP. En un gel analítico al 10% de acrilamida en condiciones reductoras y partiendo de 1 mg/ml de la concentración proteica se dispusieron en cada uno de los pozos 20, 40, 60, 80, 100 y 120  $\mu$ l añadiéndoles 20  $\mu$ l de coctel desnaturalizante a cada una de las muestras, como control de peso molecular se usó una alícuota de 3  $\mu$ l de BRL preteñido más de 3  $\mu$ l de coctel, todas las muestras se incubaron 1 minuto en baño maría y se introdujeron en los pozos. La corrida se realizó en una cámara para electroforesis modelo SE 600 Hoefer a 4°C usando una corriente de 10 mA/gel. La electroforesis duró 6 horas al final de la cual se sacó el gel y fue sumergido en azul de coomassie al 2% disuelto en ácido acético al 10% durante toda la noche. Al siguiente día se destiñó el gel con una cantidad igual de ácido acético al 10% en lugar del Azul de Coomassie, repitiéndose esta operación 8 veces. El gel fue secado, fotografiado y analizado.

Las LL-GP se almacenaron en alícuotas de 60  $\mu$ l en nitrógeno líquido previamente adicionándoles glicerol en una porción de 0.77 ml/ml de LL-GP. Estas fracciones fueron utilizadas como antígeno en la prueba de inmunoelectrotransferencia.

FALLA DE ORIGEN

### ***3.3.5 Geles de Poliacrilamida***

La finalidad de usar geles de poliacrilamida es por su efecto de tamizado molecular, por lo cual nos permiten la separación de proteínas de pesos moleculares muy cercanos (35).

#### ***Gel Inferior***

Se utilizó una mezcla con agitación constante por un vaso comunicantes conectado a la base de la tina e inmediatamente, después se pasó una solución de sacarosa al 60% para sellar los geles dejándose polimerizar de 3 a 4 horas; se sacaron los geles y se guardaron hasta su uso en cuarto frío a 4°C.

#### ***Gel Superior***

Al igual que el anterior estuvieron hechos de acrilamida, bis acrilamida, tris-base HCl 2 M pero pH 6.8, SDS al 10%, persulfato de amonio, agua destilada, y TEMED. La técnica también se menciona en el apéndice.

Para la realización de gel superior se utilizó un molde de 0.75 mm de grosor, con 3 carriles uno en cada extremo de .05 cm de ancho y un tercero que ocupaba casi todo el largo del gel, la polimerización de este gel es de aproximadamente de 45 min.

Estos geles superiores se deben realizar el mismo día en que se hace la electroforesis.

### 3.3.6 Electroforesis

Se usó la técnica de Lamelli para llevar a cabo la separación de glicoproteínas (LL-GP) de acuerdo a su peso molecular, usando para tal fin los geles mencionados anteriormente y colocando las muestras de la manera siguiente:

primer carril del gel	5 $\mu$ l BRL (p.m.)	+ 15 $\mu$ l coctel
carril central	60 $\mu$ l LL-GP (Ag)	+ 15 $\mu$ l coctel
segundo carril		15 $\mu$ l coctel

la preparación del coctel se describe en el apéndice.

El control de pesos moleculares preteñido comercial nos permite observar bandas de 14,300; 18,400; 25,700; 43,000; 68,000; 97,000 y 200,000 daltons.

La cantidad de corriente eléctrica aplicada durante la electroforesis fue de 10 mA/gel y la solución amortiguadora fue: glicina/tris/base/SDS 10%/H<sub>2</sub>O, ver apéndice.

### 3.3.7 Transferencia

La transferencia se realizó para cambiar a papel de nitrocelulosa (NC) las LL-GP y los controles de peso moleculares después de haberlos cromatografiado en los geles de acrilamida, la técnica se realizó como se indica a continuación.

Se usó un amortiguador de Tris-base/glicina/metanol (ver apéndice).

La solución amortiguadora es usada además de la transferencia misma para embeber previamente las fibras, papel filtro y nitrocelulosa, la transferencia se realizó durante una hora a temperatura ambiente, una fuente de poder Hoefler modelo PS 215 fue la indicada para suministrar la corriente eléctrica de 1 Amp.

El papel de nitrocelulosa y el filtro usados fueron de 15 x 11 cm (Schleicher - Schuell), las fibras fueron Scochtbrite de 20 x 23 cm.

Una vez transferidas las LL-GP a hojas de nitrocelulosa se cortaron en tiras, cada una de ellas sirvió para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. solium* por individuo. La hoja de nitrocelulosa transferida y seca se colocó en una guillotina cubriéndola con una hoja de celofán y se cortó en dirección similar al corrimiento del frente en electroforesis en aproximadamente 40 tiras, cada una de 3 mm de ancho, previamente al corte se trazó una(s) línea(s) sobre el límite formado por el gel superior y el gel inferior de tal manera que sirvió de referencia para alinear a todas y cada una de las tiras para ser comparadas al término del ensayo enzimático, finalmente cada hoja de nitrocelulosa ya cortada en tiras pero no separada del resto de las hojas fue embebida en una solución de PBS con azida de sodio al 0.2% en bolsas de plástico con cierre hermético en congelación a -20°C hasta su uso. (a estas hojas les llamamos blots y pueden durar hasta un año en estas condiciones).

### 3.3.8 Tinción con Aurodye - Forte

Se tomó una de las tiras transferidas de cada "blot" al azar y se colocó en un multicaster mod. SE 600 para agitarla con la finalidad de lavar por 30 minutos con AFS/Teewn 20 y luego con agua 2 veces más. Se elimina el agua y se adiciona 0.5 ml de colorante, se agitó por 2 horas

FALLA DE ORIGEN

o más. La finalidad de esta tinción fue para observar la presencia de las proteínas (LL-GP) con una sensibilidad similar a la tinción de plata en geles de acrilamida.

### ***3.3.9 Revelado con Anticuerpos***

Utilizamos la técnica descrita por Tsang (1989), la cual detecta 7 bandas glicoprotéicas específicas (50, 42, 39, 24, 21, 18, 14 y 13 Daltones) en suero de individuos que han estado en contacto con *T. solium*.

### ***3.3.10 Western-Blot***

En cajas Accutran de plástico con 8 canales, cada uno para una sola muestra, se incubaron los reactivos para revelar las bandas específicas. Se inició colocando en cada canal una tira y 0.5 ml de AFS/TWEEN 0.3%/Leche 5% (ver apéndice) en donde se diluye el suero 1:100. Este se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente se lavó 3 veces con AFS/Tween 0.3%/Leche 5% a intervalos de 5 minutos entre cada lavado, se colocó el conjugado Anti-IgG-peroxidasa en una dilución 1:1000, y se dejó incubando por 30 minutos, se lavó igual que antes más 2 veces con AFS solo, se adicionó 0.05 ml de sustrato (DAB/H2O2 3%/AFS) y se observó la reacción al cabo de 5 minutos o menos, se finaliza lavando abundantemente con agua destilada, se deja secar las tiras y se colocan en forma ordenada y protegidas con un cubre hojas.

En cada blot se colocó un control positivo y negativo.

### Lectura de las Tiras

Se colocó cada una de las tiras problema junto al control de P.M. que fue usado para cada blot y se observó en base a este y el control positivo si alguna de las 7 bandas que son consideradas para cisticercosis como positiva estaba en el mismo sitio que en los controles, y así finalmente dimos nuestros resultados.

### 3.4 *Análisis Estadístico*

La fórmula usada fue:

$$\begin{array}{l} \text{Tasa de} \\ \text{Seroprevalencia} \end{array} = \frac{\text{No. total de casos positivos}}{\text{Población total}} \cdot 100$$

FALLA DE ORIGEN

## CAPITULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Clasificación de las muestras

La forma en que se identificaron los sueros fue con un número foliado proporcionado a cada individuo encuestado. Con una base de datos denominada d-base cuatro, se manejó el nombre de cada individuo, datos de la encuesta, estudios de laboratorio, etc.

La numeración que abarcó del 1 al 2000 correspondió a la comunidad de Atotonilco, del 2001 al 3500 la de Tetelilla y del 3501 al 5000 a Chalcatzingo.

#### 4.1.2 Informe de resultados

La forma de reportar los resultados del blot fue con el número 1 para los casos potitivos y el 2 para los negativos de esta forma fue fácil manejar gran cantidad de datos por medio de listas como se ejemplifica con el siguiente caso:

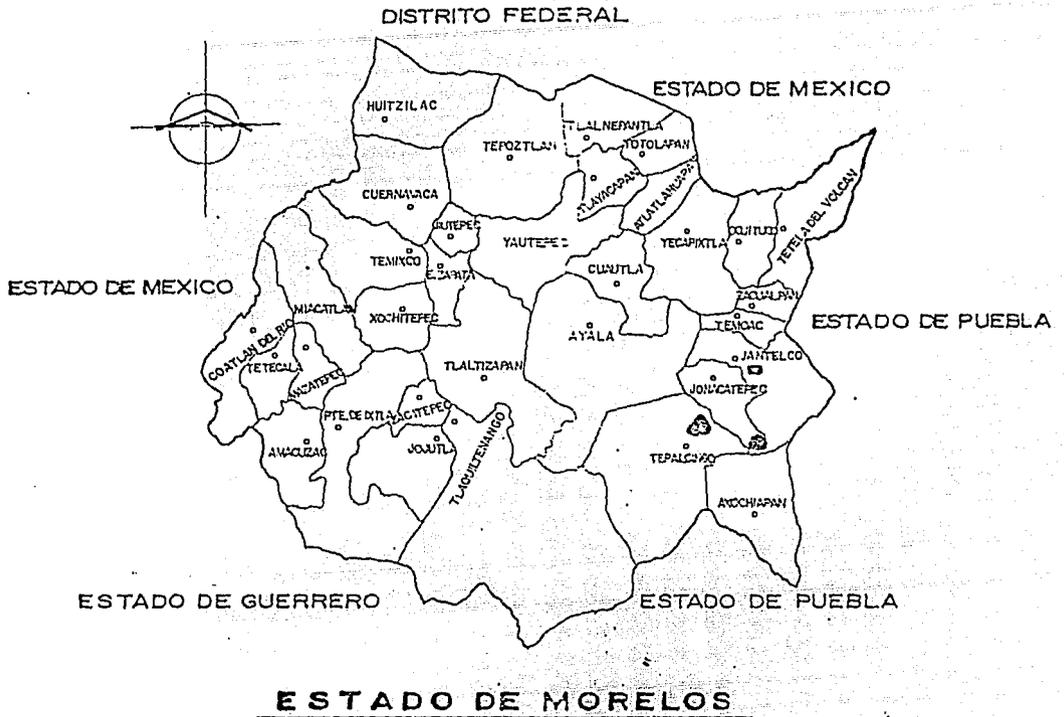
Número de Muestras	Resultados
25	2
345	1
1536	2
2850	1
4750	1

### ***4.1.3 Localización y características de la población***

En la figura 2 se muestra un mapa del estado de Morelos describiendo el sitio de ubicación de las comunidades estudiadas.

La figura 3 presenta los histogramas correspondientes a la distribución de frecuencias por edades de los individuos encuestados de cada una de las tres comunidades.

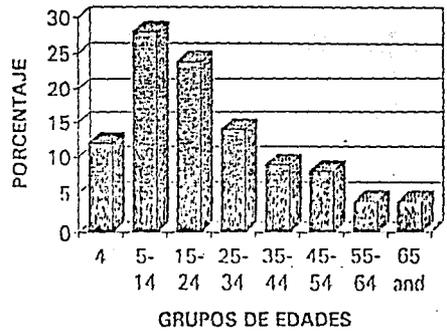
FIG 2



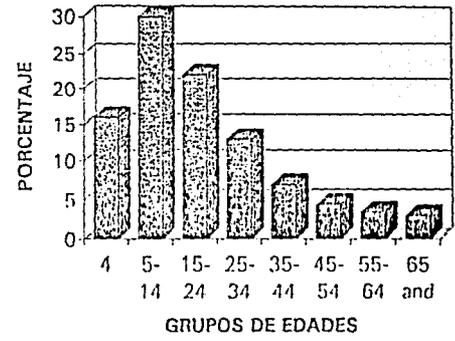
# DISTRIBUCION DE FRECUENCIA POR EDADES

17

### ATOTONILCO



### CHACALTZINGO



### TETELILLA

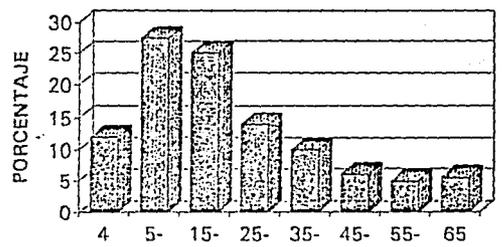


FIG 3

#### *4.1.4 Solubilización de las glicoproteínas de los cisticercos de T. solium.*

Con un único lote de 30 g de peso húmedo de cisticercos se inició el procedimiento de purificación para obtener la fracción LL-GP (Fig. 3.1).

#### *4.1.5 Cromatografías de afinidad (Sefarosa 4B lentil-lectina).*

Los 275 ml de la fracción LL-P fueron divididos en once alícuotas de 25 ml y cada una de ellas se corrieron en la misma columna de Sefarosa 4B lentil-lectina en once continuas ocasiones, en la tabla 1 encontramos los resultados de estas cromatografías en valores de absorbancia para cada tubo o fracción colectada y de la figura 4 a la 14 las gráficas de estos valores.

#### *4.1.6 Análisis de los dos picos obtenidos en la cromatografía de afinidad.*

Se hicieron, correr en geles analíticos de acrilamida al 10% tanto la fracción excluída, o primer pico, de la columna de afinidad, como la fracción eluída con metil-manosido, segundo pico, y se visualizaron tñiendo el gel con azul de Coomassie, figura 15.

En la tabla 2 se observa el rendimiento proteico de las diferentes fracciones solubles que resultaron en los diversos pasos de purificación (Fig. 3.1).

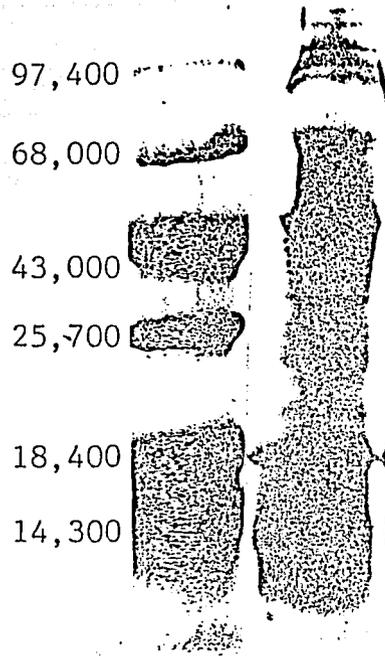


Figura 15. Fracción LL-GP teñida con azul de Coomassie.

**TABLA 2**

Fracción	Vol. (ml)	Conc. Protéica (mg/ml)	Proteína Total (g)
0.5 kg	250	30	7.5
kgPS	25	40	1.0
LL-P	275	6	1.65
LL-GP	10	1	0.01

TABLA 1

## CROMATOGRAFIA EN SEFAROSA 4B-LENTIL-LECTINA

## CROMATOGRAFIAS

FRACCION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,013	0,000
5	0,665	0,033	0,030	0,060	0,020	0,660	0,026	0,040	0,390	0,538	0,330
10	1,296	1,025	1,018	0,392	0,402	1,211	0,324	1,010	2,290	2,249	2,040
15	1,930	1,990	1,900	0,911	1,600	1,600	1,856	1,793	2,260	2,080	2,150
20	1,900	1,850	1,820	2,870	2,865	2,320	3,000	2,000	0,460	0,072	0,620
25	0,035	0,061	0,900	3,000	1,900	1,900	2,166	1,900	0,015	0,000	0,004
30	0,009	0,010	0,009	0,964	0,051	1,670	0,431	1,000	0,000	0,000	0,045
35	0,008	0,005	0,008	0,021	0,030	0,090	0,250	0,530	0,000	0,000	0,064
40	0,038	0,030	0,078	0,012	0,021	0,012	0,022	0,045	0,000	0,008	0,044
45	0,178	0,152	0,115	0,170	0,020	0,000	0,018	0,030	0,096	0,064	0,027
50	0,097	0,152	0,060	0,029	0,100	0,000	0,074	0,072	0,070	0,055	0,020
55	0,066	0,760	0,047	0,220	0,090	0,049	0,087	0,100	0,045	0,040	0,014
60	0,055	0,054	0,038	0,092	0,045	0,127	0,052	0,053	0,032	0,032	0,012
65	0,044	0,040	0,034	0,055	0,030	0,110	0,038	0,038	0,018	0,023	0,008
70	0,035	0,030	0,033	0,028	0,027	0,028	0,039	0,030	0,001	0,016	0,005
75	0,035	0,029	0,023	0,025	0,024	0,028	0,025	0,024	0,000	0,006	0,001
80	0,035	0,024	0,020	0,020	0,020	0,008	0,010	0,010	0,000	0,005	0,000
85	0,040	0,023	0,015	0,013	0,020	0,002	0,003	0,002	0,000	0,000	0,000
90	0,013	0,024	0,000	0,010	0,010	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Absorbancia a 280 nm.(LL-P)

El intercambio con 0.2M de alfa metil-manósido fué en la fracción 30, mientras que el inicio de la colecta de LL-GP se realizó en la fracción 40, finalizando en la fracción 90.

97

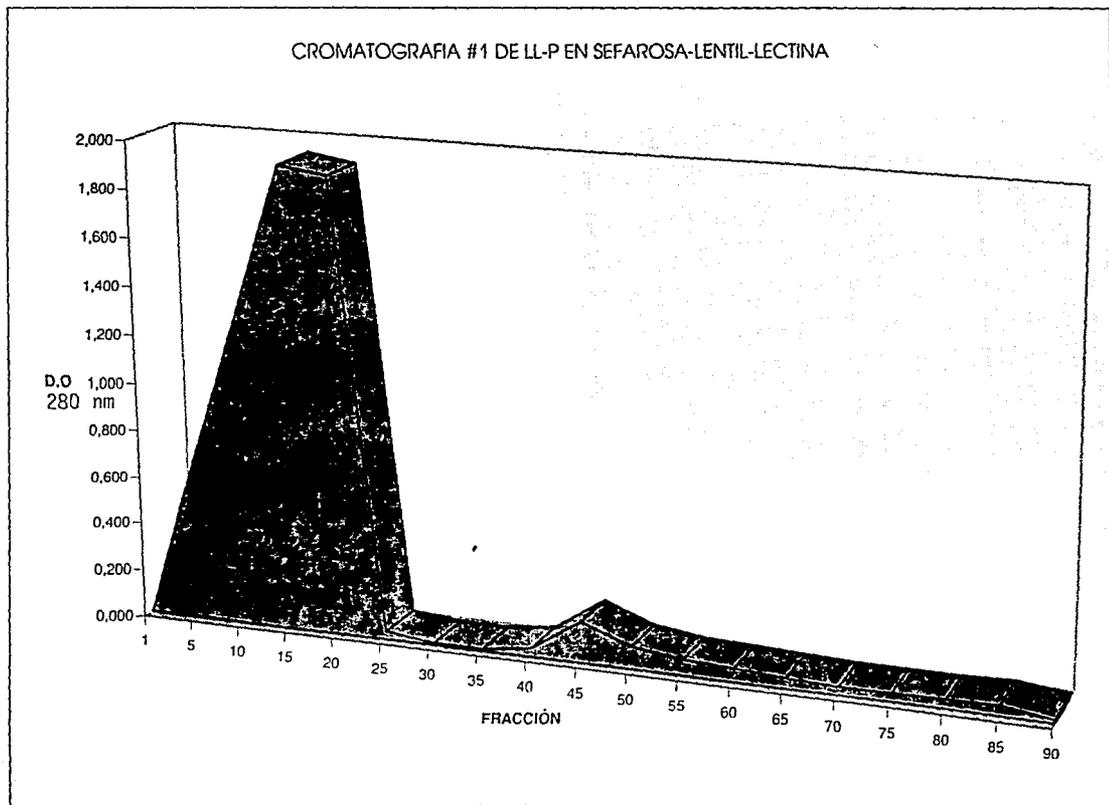
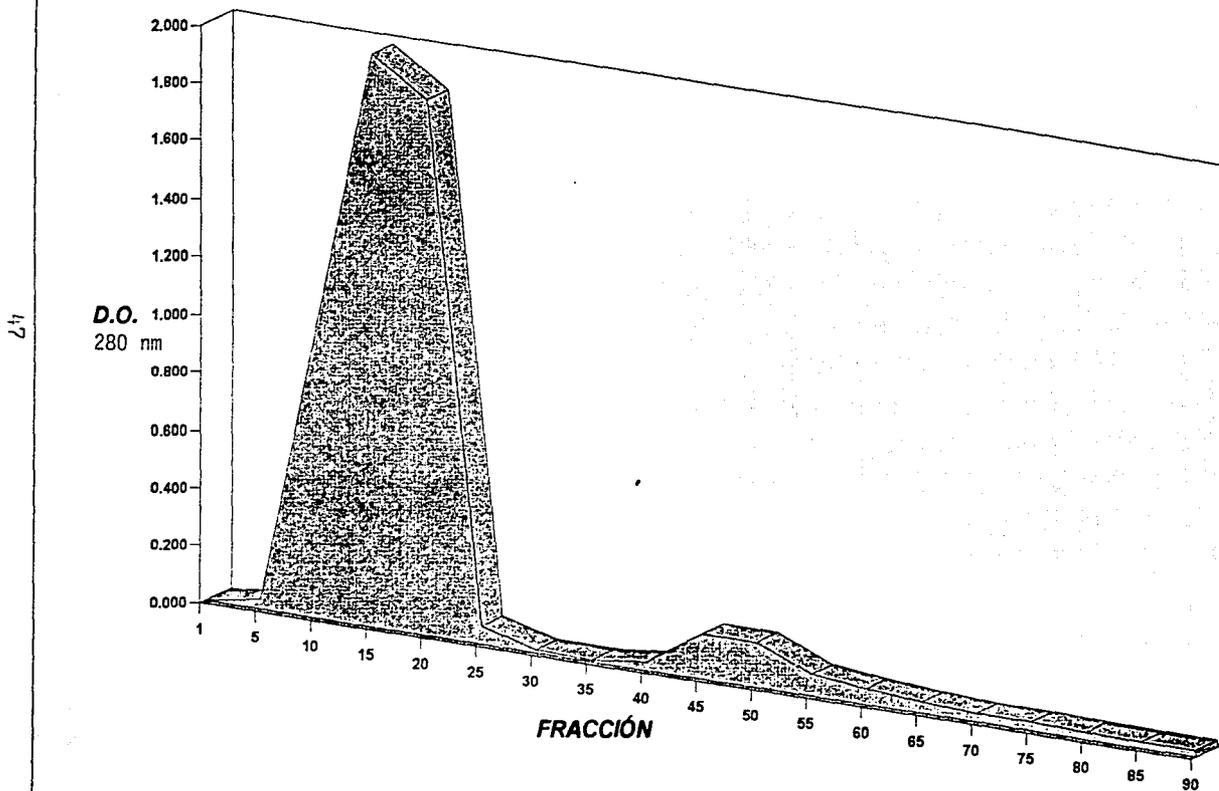


FIG 4

## CROMATOGRAFIA #2 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA



### CROMATOGRAFIA #3 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA

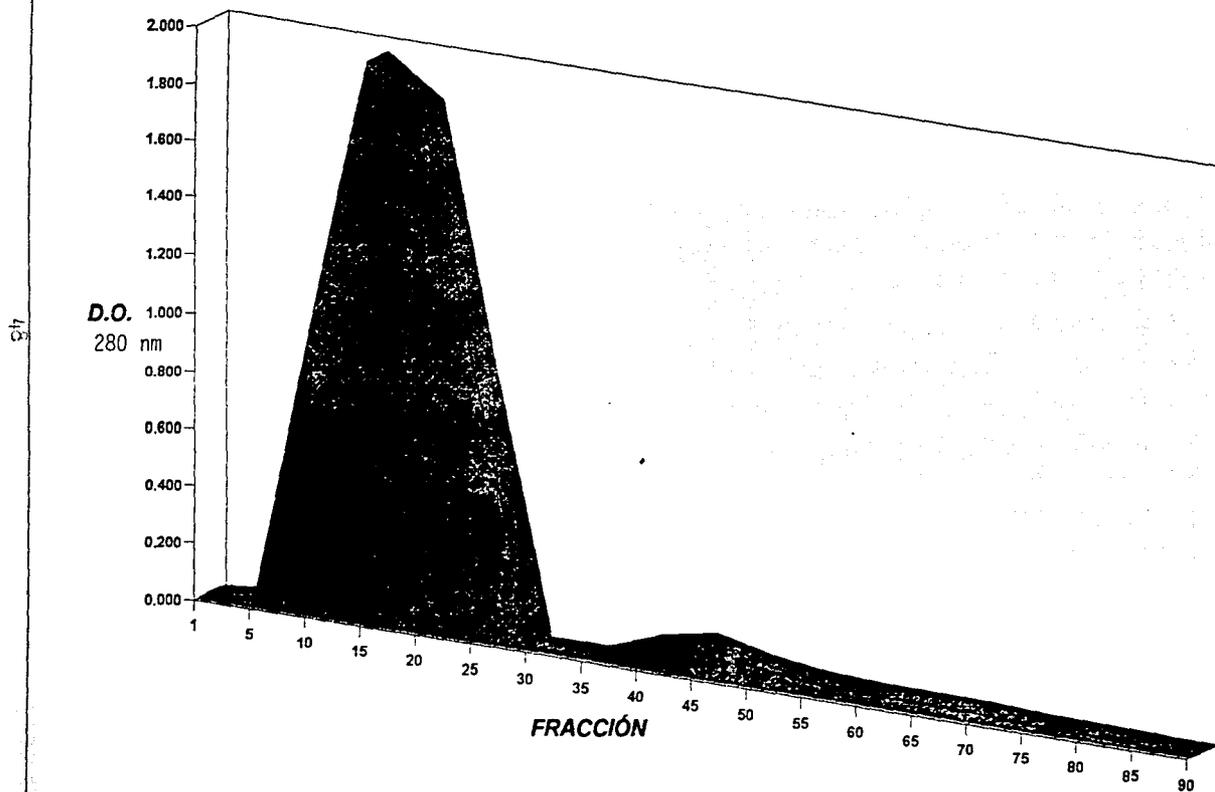


FIG 6

# CROMATOGRAFIA #4 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA

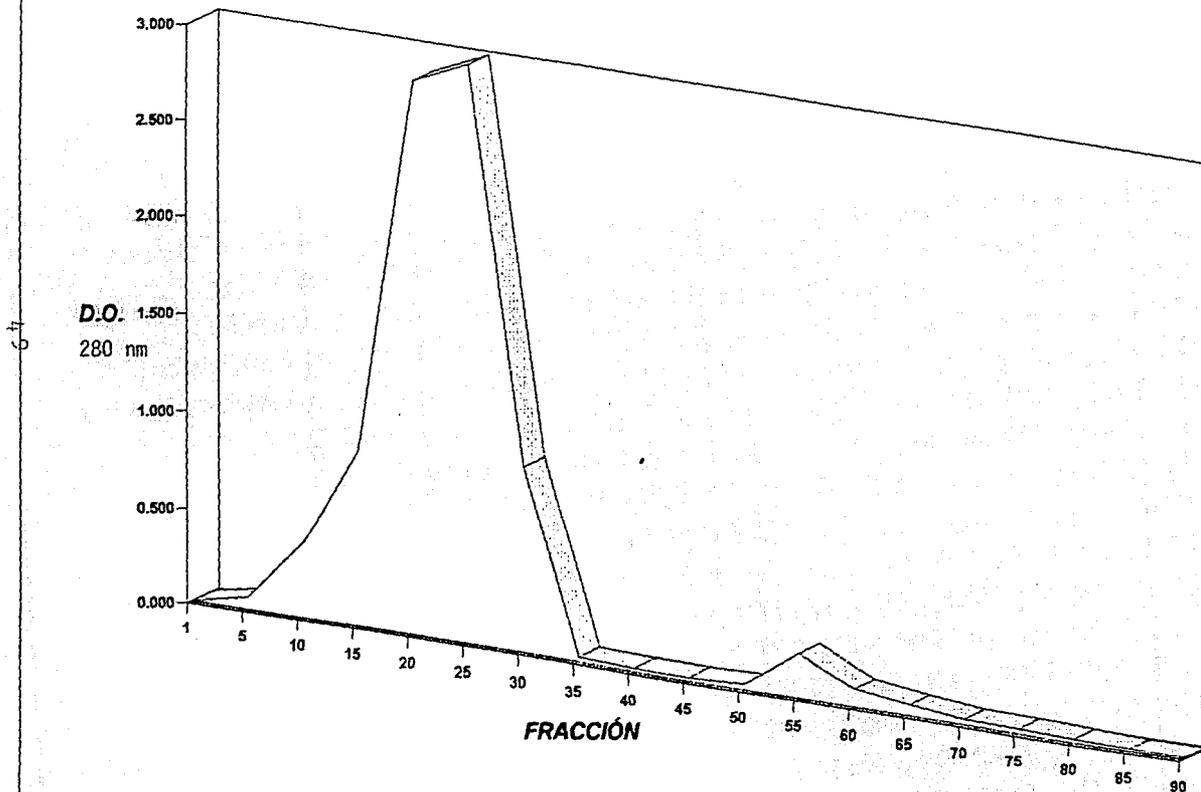


FIG 7:

# CROMATOGRAFIA #5 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA

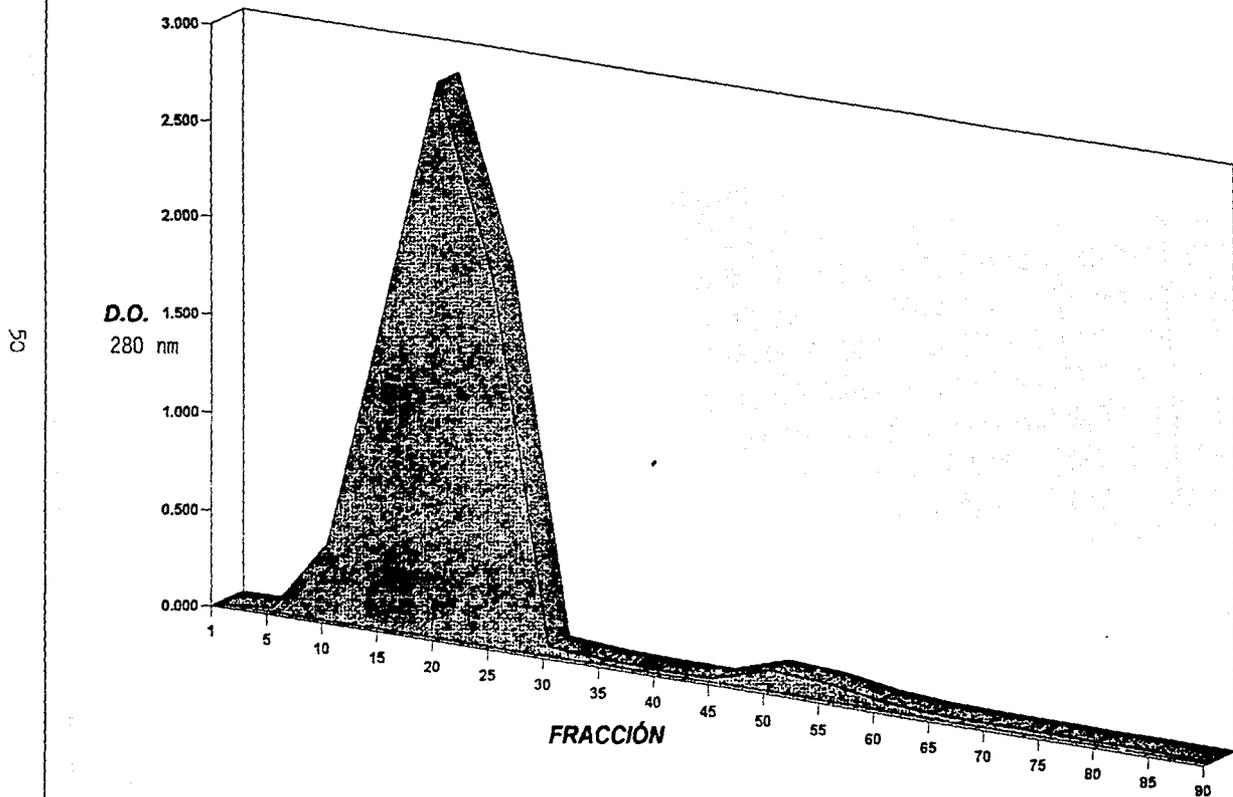
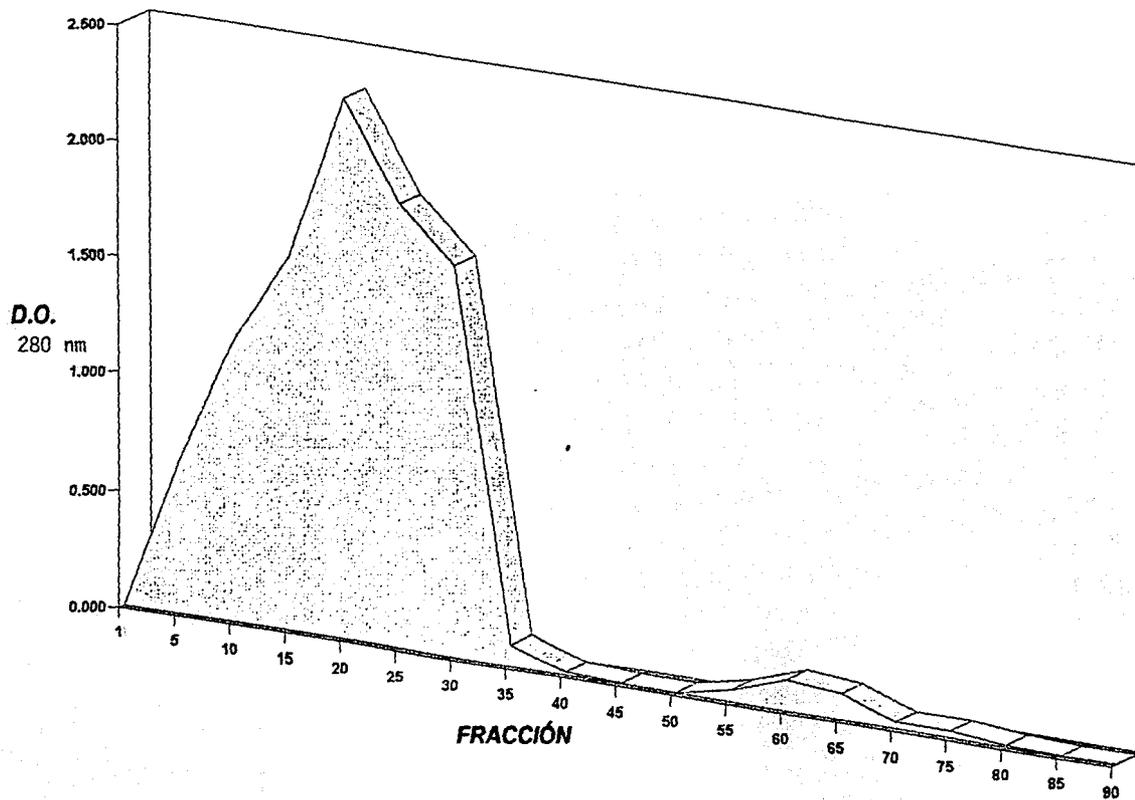
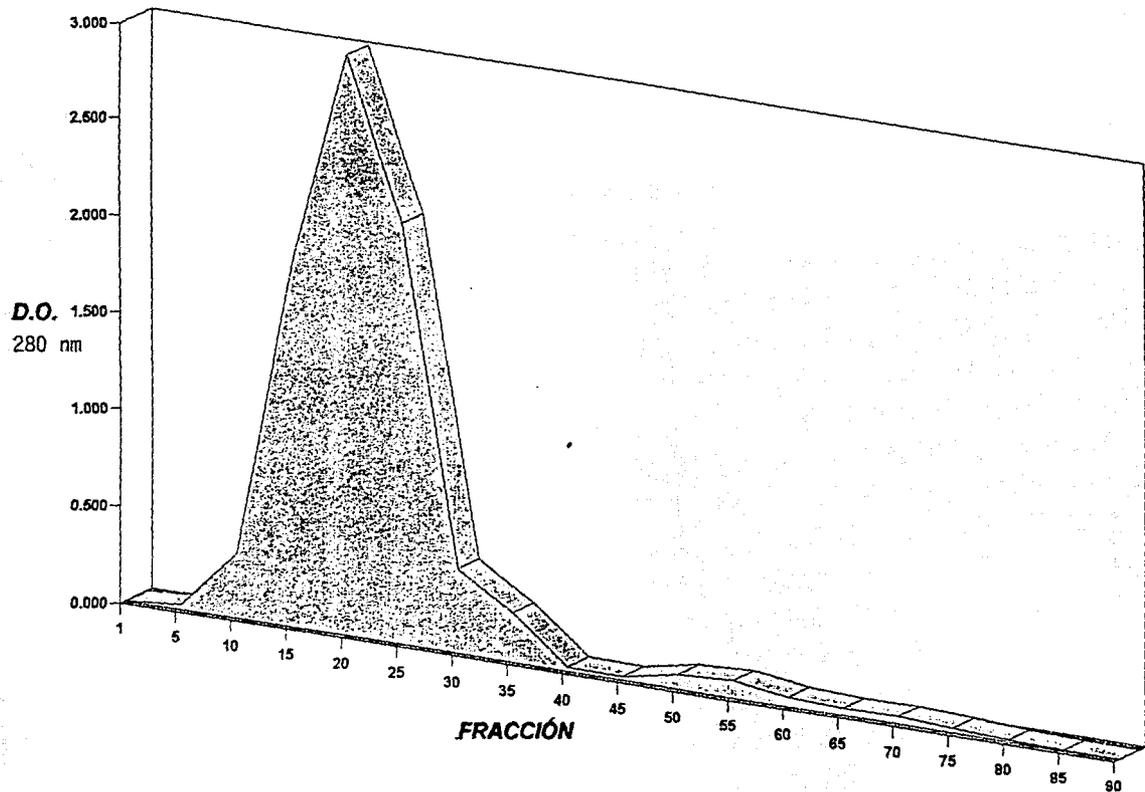


FIG 8

# CROMATOGRAFIA #6 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA



# CROMATOGRAFIA #7 DE LL-P EN SEFAROSA-LENTIL-LECTINA



52

53

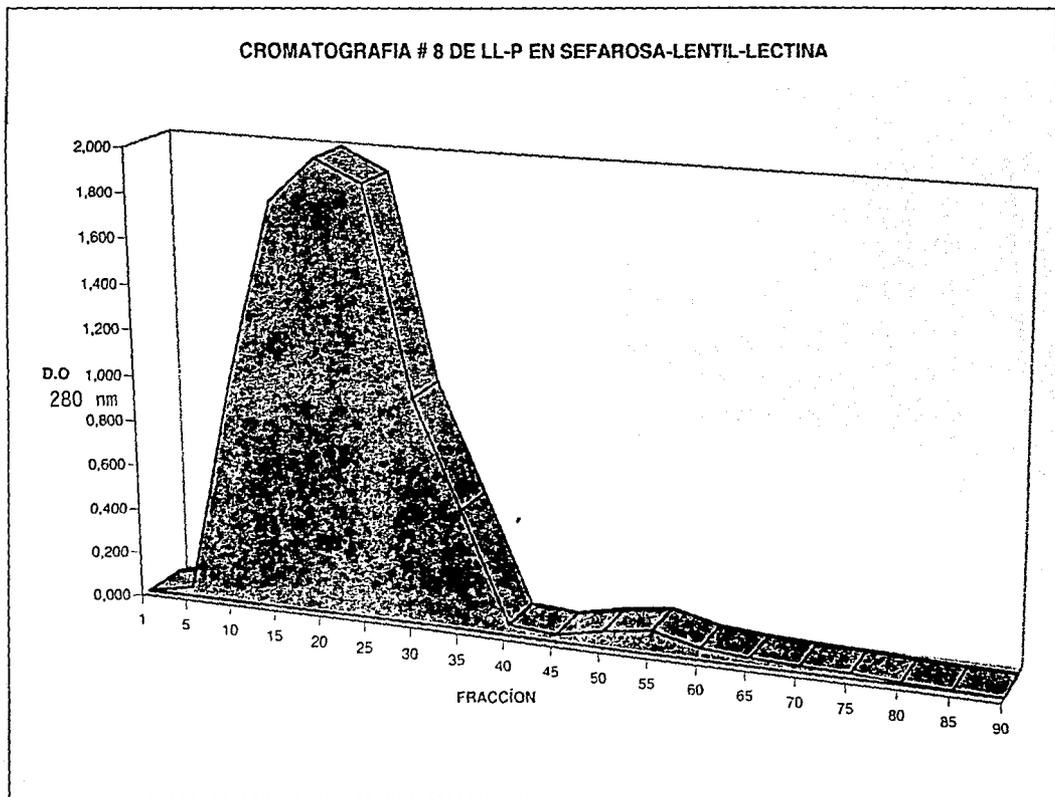


FIG 11

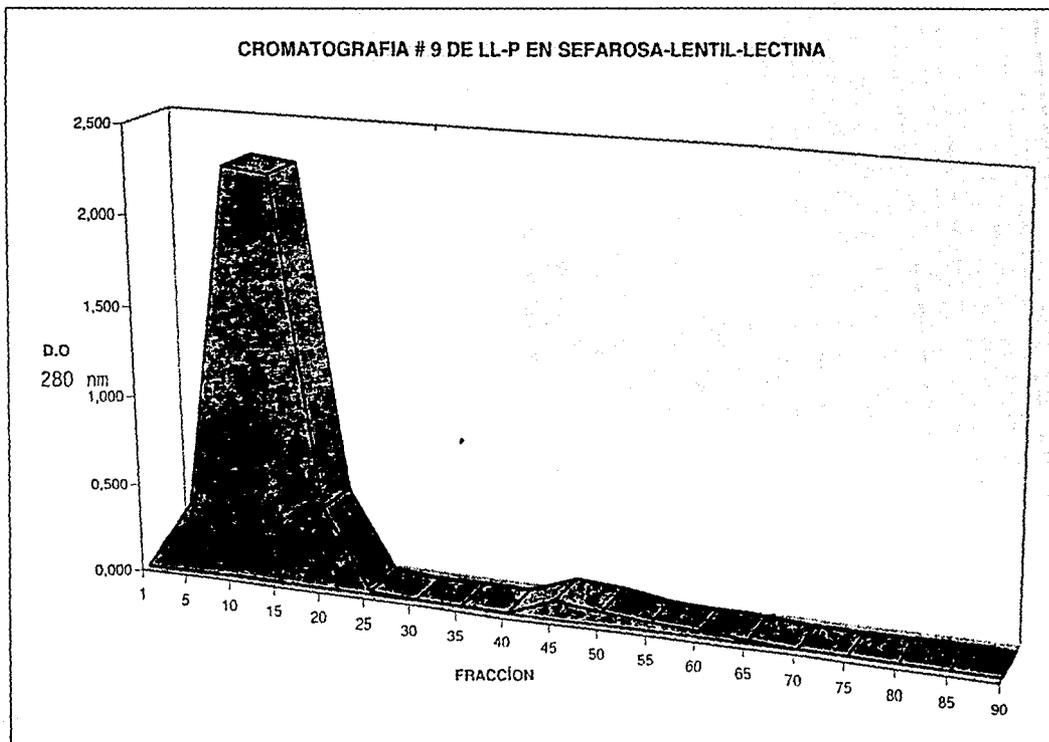


FIG 12

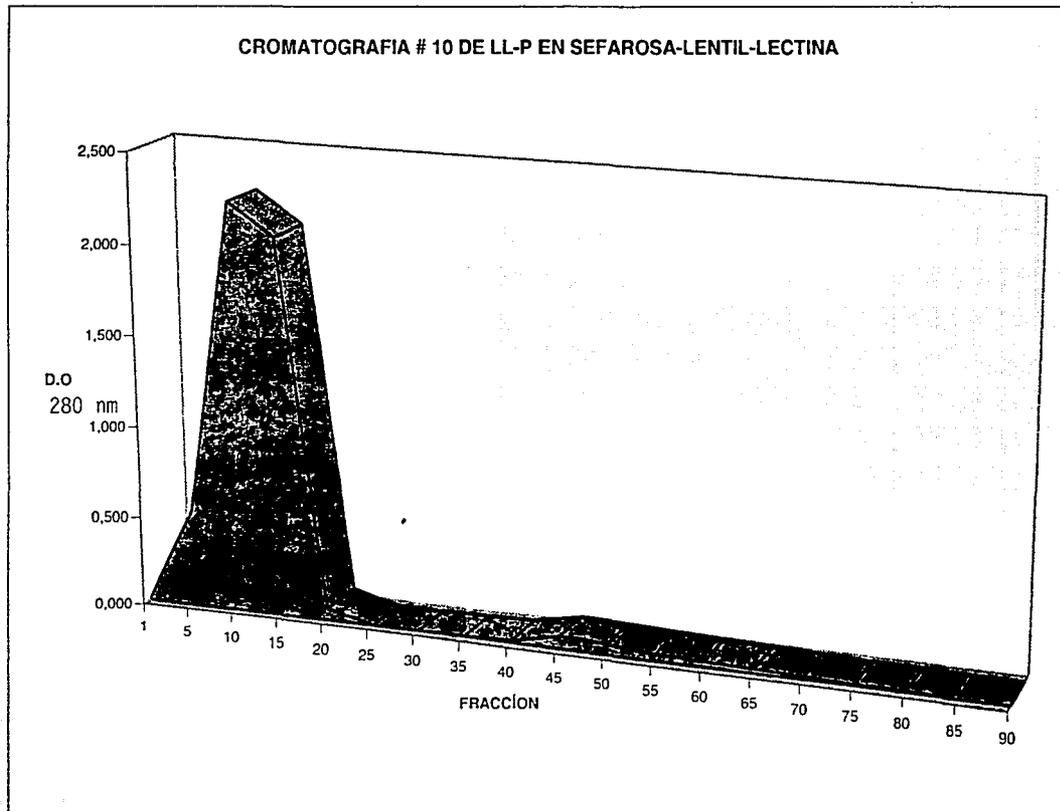


FIG 13

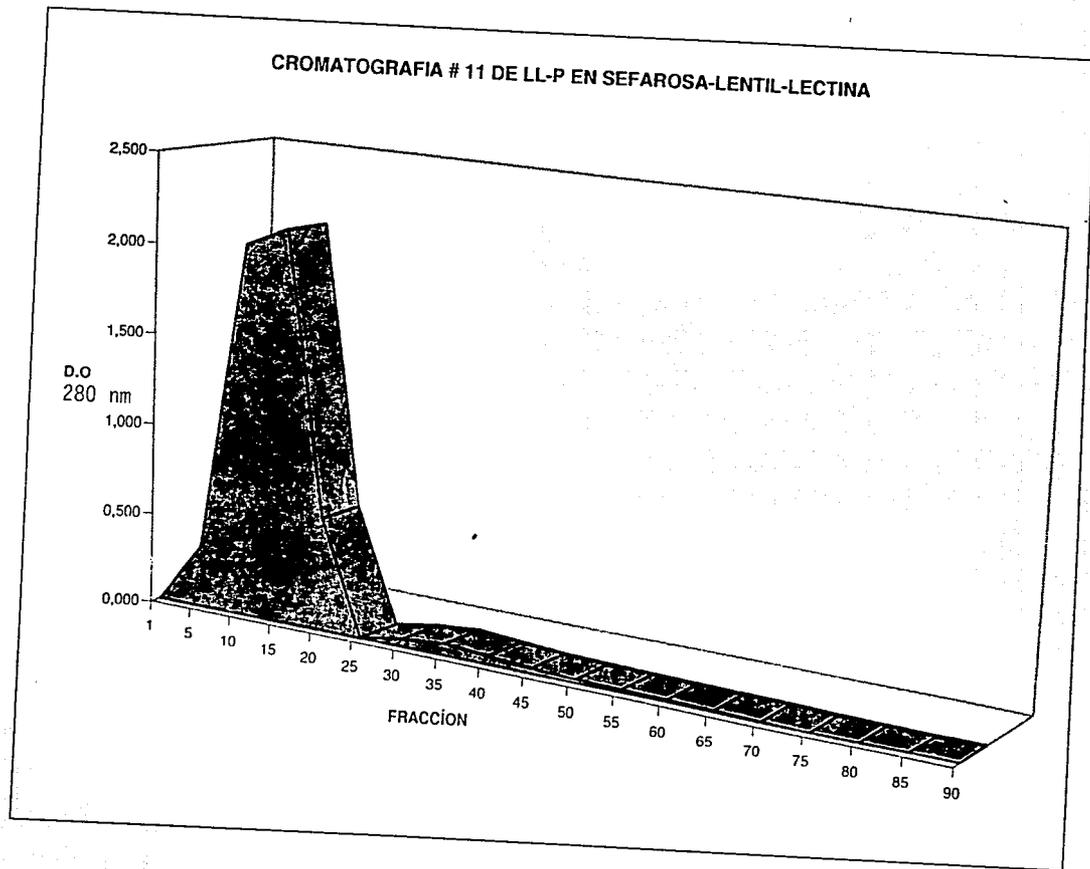


FIG 14

#### 4.1.7 Evaluación de los sueros controles positivos y negativos.

En la tabla 3 se muestran los valores de absorbancia a 405 nm del análisis por ELISA tanto de los 10 sueros con sintomatología neurológica compatible con neurocisticercosis, aunada al estudio por tomografía axial computarizada evidenciando quistes cisticercosos, así como de 10 sueros de individuos sanos.

TABLA III	
Número de muestra	Valores de absorbancia
<b>Sueros positivos</b>	<b>DO 405 nm</b>
C-5447	1.758
C-5542	0.258
C-5440	0.426
C-5447	0.489
C-5443	0.338
C-5450	0.301
C-5491	0.695
C-5494	0.852
C-5328	0.574
C-5381	0.295
<b>Sueros Negativos</b>	
1	0
2	0
3	0
4	0.002
5	0.003
6	0.001
7	0.007
8	0.008
9	0.006
10	0.005

#### ***4.1.8 Evaluación de la fracción antigénica LL-GP con Auro dye forte.***

En la figura 16 se muestra el resultado de la electroforesis y transferencia de la fracción LL-GP y control de pesos moleculares teñidos con Auro dye forte.

#### ***4.1.9 Evaluación de la fracción antigénica LL-GP con anticuerpos.***

En la figura 17 está integrada por diversas tiras de nitrocelulosa reveladas con: a) control de peso molecular preteñido; b) sueros de individuos de población abierta; c) suero control positivo y d) suero control negativo.

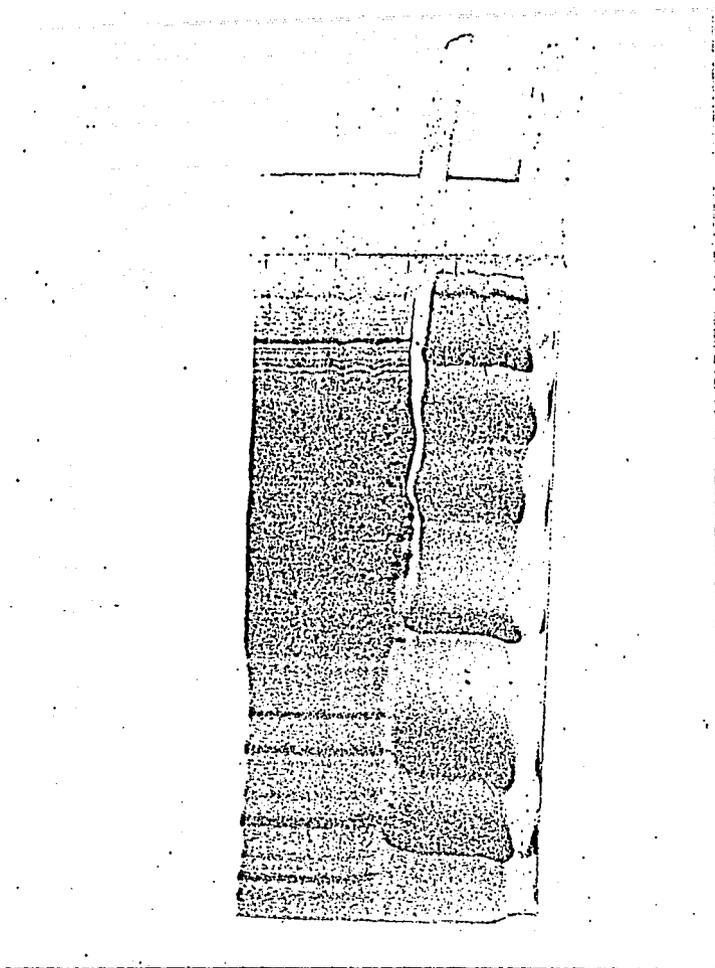


Figura 16. Resultado de electroforesis y transferencia de la fracción LL-GP y control de peso molecular teñidos con Auro dye forte.

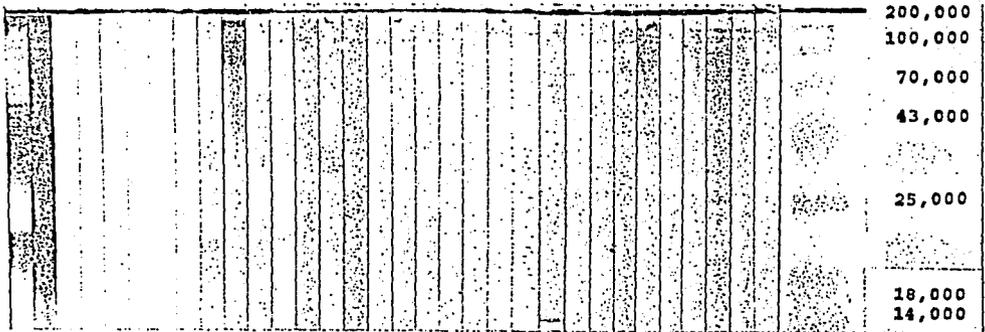


Figura 17. Se muestra control de peso molecular preteñido, suero de individuos de población abierta, sueros control positivo y sueros control negativo.

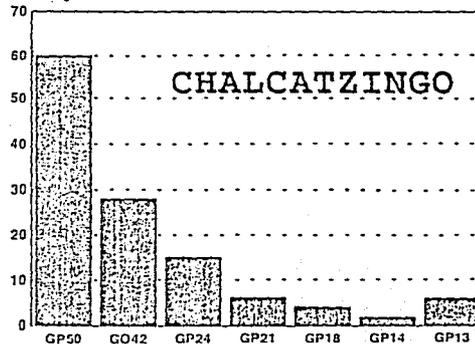
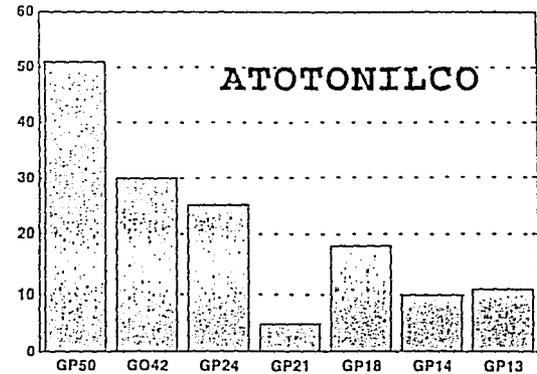
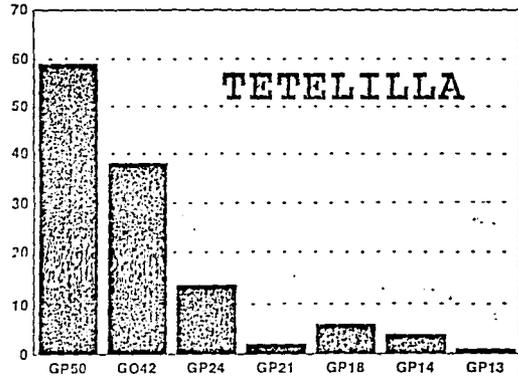
*4.1.10 Análisis de la presencia de anticuerpos anticisticerco en la población abierta.*

La tabla 4 reúne los datos del porciento de seropositividad obtenidos en cada una de las tres comunidades estudiadas así como la frecuencia de reconocimiento de las siete diferentes glicoproteínas por los anticuerpos de los individuos analizados.

Tabla IV			
No. de Muestras	Atotonilco 2112	Tetelilla 1640	Chalcatzingo 1309
Muestras positivas	9.8%	7.6%	11.5%
Frecuencia de GPs	n = 207	n = 124	n = 151
GP50	37.2	40.3	60.2
GP42	30.4	50.0	27.1
GP24	18.4	11.3	15.2
GP21	6.8	1.6	6.6
GP18	19.8	9.7	5.3
GP14	10.1	7.2	2.7
GP13	6.3	1.6	5.9

# Porciento de la frecuencia de reconocimiento de los diversos sueros para las siete glicoproteínas empleadas en el inmunoblot (IB)

62



## 4.2 DISCUSION

Las comunidades que se eligieron para realizar el estudio fueron zonas rurales donde prevalece la crianza de cerdos deambulando libremente en las calles, el fecalismo al aire libre, la venta ilegal y consumo de carne de cerdo infectada con cisticercos, factores propios de una zona endémica para *T. solium*.

La mayoría de las poblaciones cuentan con individuos menores de 25 años de edad, existiendo familias integradas hasta con 21 miembros que viven en el mismo hogar, además de tener escasa escolaridad así como una inadecuada salud pública, condiciones socioculturales que favorecen la transmisión y el establecimiento de este parásito.

No obstante el tener presente todos estos aspectos generales relacionados con *T. solium*, en estas comunidades, no podemos especificar por ejemplo que número de individuos se encuentren en mayor contacto con el parásito ni como estén relacionados desde el punto de vista inmunoparasitológico.

Este estudio se enfocó a analizar la presencia de anticuerpos específicos contra el cisticerco o larva de *T. solium* en el suero de individuos de las comunidades de Atotonilco, Tetelilla y Chalcatzingo en el estado de Morelos. El mecanismo para poder realizarlo fue apoyando en la parte de serología a un estudio epidemiológico mucho más amplio dirigido a evaluar dos estrategias de intervención para controlar a la teniasis y cisticercosis: a) Educación para la salud y b) Tratamiento tenicida.

La tecnología que se desarrolló para demostrar la presencia de anticuerpos anticisticercosis fue por medio del inmunoblot (IB) empleando como antígeno una fracción enriquecida en glicoproteínas.

El inmunoblot en combinación con la fracción enriquecida de glicoproteínas (LL-GP) ha permitido contar con un método sensible y específico para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana, teniendo una sensibilidad del 98% cuando la muestra a evaluar es suero y cuando es líquido cefalorraquídeo (LCR) del 95% es decir ligeramente mejor en la primera que en la segunda, y una especificidad del 100% cuando se evaluó con 376 suero de individuos parasitados con: protozoarios, céstodos, nemátodos en total 18 diferentes parasitosis (Ref. Tsang, et al, 1989).

Igualmente el "grupo de trabajo de Perú" ha obtenido similares valores de sensibilidad y especificidad al evaluar sueros y LCR de enfermos con diversas condiciones clínicas (García, H., Martínez, M., Gilman, R., Herrera, G., Tsang, V., Pilcher, J., Díaz, F., Verastegui, C., Parras, M., Alvarado, M., Naranjo, J., Miranda, E., y el "grupo de trabajo en cisticercosis en Perú", 1991. Diagnosis of cysticercosis in endemic region. (Lancet 338:549-551), en buena parte por utilizar para tal fin todos los reactivos preparados directamente en el CDC de Atlanta, en el laboratorio donde se originó esta técnica y habiendo realizado en Perú exclusivamente el procedimiento de incubar los sueros y LCR en el ensayo inmunoenzimático.

En nuestro caso basándonos solo en la literatura publicada hasta principios de 1991 sobre este IB nos decidimos a reproducirla en su totalidad para emplearla tanto en la evaluación de muestras de individuos con sintomatología clínica compatible con neurocisticercosis,

obteniendo una gran correlación, (datos no mostrados) así como en individuos de población abierta.

## CAPITULO V

FALLA DE ...

## CONCLUSIONES

El rendimiento de purificación para obtener la fracción LL-GP por el procedimiento utilizado resulto bajo, ya que partiendo de 30 g de peso húmedo de larvas sólo se logró obtener 10 mg de LL-GP, sin embargo como es mínima la cantidad que se requirió de esta fracción para demostrar la presencia de anticuerpos en las muestras biológicas de los humanos, se pudo analizar más de 5000 diferentes sueros, evidenciando de esta forma la sensibilidad de la técnica. Desgraciadamente los autores originales de este método no han publicado nada en cuanto a este punto, que permita evaluar con precisión los resultados de purificación excepto que la fracción LL-GP que se obtuvo es prácticamente la misma que ellos usan (comunicación personal).

La seroprevalencia obtenida en cada una de las comunidades analizadas fue muy similar, alrededor del 12.1%, probablemente por ser muy parecidas entre sí desde el punto de vista económico, social y cultural.

Por ejemplo, en todas las comunidades existe el hábito de no mantener encerrados a los cerdos en corrales permitiéndoles alimentarse inclusive de materia fecal humana ya que también es una costumbre la práctica de defecar al aire libre no obstante la existencia de letrinas. Comparando estos valores con estudios previos de otras comunidades, por ejemplo en Xoxocotla, también en el estado de Morelos durante 1989-91 hubo una seropositividad del 10.8% en 1552 sueros humanos la cual estuvo asociada a diversos factores de riesgo como: historia de teniasis, higiene personal y casera deficiente, crisis convulsivas, a mayor edad el

porcentaje de individuos seropositivos aumentó (Ref. 60). En cambio en Angahuan en el estado de Michoacán que es una comunidad con una estructura sociocultural diferente de las anteriores se encontró una seropositividad del 4.9% en 1005 diferentes sueros pero con claras asociaciones también a los factores de riesgo ya mencionados así como a mayor edad mayor posibilidad de ser seropositivo.

Otro estudio de campo realizado en Perú, (Ref. 17), con un menor número de muestras y enfocado a evaluar la sensibilidad del inmunoblot frente a la búsqueda de anticuerpos y antígenos en un ensayo inmunoenzimático en pozo, reveló que el (IB) tuvo una especificidad del 100% mientras que el ELISA para anticuerpos fue del 86% y para antígeno del 62% cruzando principalmente con muestras de individuos parasitados con *E. granuloseus* e *Himenolepis nana*.

La frecuencia con que los individuos reconocieron las siete diferentes bandas antigénicas de la fracción LL-GP mostró que la GP50; GP42 y GP24 fueron las más destacadas en este orden en las tres comunidades y las otras cuatro se evidenciaron de forma diferente en cada comunidad; mientras que en Tetelilla las bandas GP18; GP14; GP21 y GP13 tuvieron este orden decreciente en Atotonilco fueron las GP18; GP13; GP14; GP21 y para Chalcatzingo las GP21; GP13; GP18 y GP14, indicando que los tres antígenos de peso molecular más grande son de características diagnósticas y los cuatro restantes probablemente con otras funciones en esta relación huésped parásito, cabe destacar que en estas mismas comunidades los resultados obtenidos en cerdos por el mismo inmunoblot IB revelaron también a las 3 glicoproteínas de mayor peso molecular como las más recientemente reconocidas. (Ref. Tesis de Adela Segura).

Finalmente el hecho de contar con valores de seroprevalencia en comunidades rurales permite, además de reforzar la observación, definir las como áreas endémicas para *T. solium*.

Además nos ayuda a esclarecer los mecanismos de transmisión al correlacionar los casos positivos con individuos que presenten algún factor de riesgo para *T. solium*.

## BIBLIOGRAFIA

FALLA DE ORIGEN

1. ACEVEDO HERNANDEZ (1989). Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: A. Flisser, F. Malagón. Cisticercosis Humana y Porcina. Su conocimiento e investigación en México. *Linusa-Noriega México*, D.F. pp. 251-253.
2. ACHA, P. y Szifres, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales, 2a. edición. *Organización Panamericana de la Salud*. Publicación Científica 503, Washington, D.C.
3. ALUJA, A.S. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. En: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A. Willms, K., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds.). *Academic Press*, New York. p. 47.
4. ALUJA, A.S. (1987). En: Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Escobedo, F., Escobar, A., Flisser, A., Lacleste, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, V. *Fondo de Cultura Económica, México*. p. 115.
5. BARKER, F.C. y Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25:1.
6. BOTERO, D. (1988). Cisticercosis en Colombia investigaciones hasta 1988. *Annales Académicos de Medicina*. Medellín. Vol. 11, No. 2 Junio 1989.
7. BIAGI, F. Tay, J. (1958). A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. *Am. J. Trop. Hyg.* No. 7:63-65.

8. CORREA, D., Morales, Z., Medina, Y., García, C., Mandujano A., Ortiz, D., Meza, A. (1991). Publicación Técnica del Indre No. 4. Teniasis y cisticercosis por *Taenia Solium*. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos, México, D.F.
9. COOK, G. C. (1986). The clinical significance of gastrointestinal helminthis. A review. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:675-685.
10. COX, F.E.G. (1982). Modern Parasitology. *Blackwell Scientific Publications, Oxford.* pp. 126-1259.
11. CRUZ, M. Proaño, J. Staceg, P. (1986). Epidemiología clínica y tratamiento de la cisticercosis cerebral. En: Teniasis Cisticercosis. *Revista de Divulgación Científica de Ecuador.* Vol. No. 1:71-78.
12. CHENG, C.I. (1978). Parasitología General. *Edit. Delta, A.C. España.*
13. CHESTER, P., Clifot, J., Wagne, E.C. (1986). Parasitología Clínica. *Salvat. Edit. México.*
14. DIAZ-CAMACHO, S.P., Candil, A., Uribe, M., Willms, M. (1989). Epidemiología de teniasis-cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: A. Flisser, F. Malagón. (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. *Limusa-Noriega, México, D.F.* pp. 243-250.

FALLA DE ORIGEN

15. ESCOBEDO, F. (1989). Tratamiento de cisticercosis-teniasis humana. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. *Limusa-Noriega*, México, D.F. pp. 199-204.
16. ESPINOZA, B., Ruiz, G., Tovar, A., Sandoval, M., Plancarte, A., 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.
17. Epidemiología y control de la Teniasis y Cisticercosis en América Latina. Versión 2.0. (1993). Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.
18. Epidemiología Boletín mensual. Sistema Nacional de Salud. Mayo (1991). Vol. 6,5.
19. ESTAÑOL, B., Coronado, T., Abad, P. (1989). Clasificación pronóstica de la cisticercosis cerebral. Implicaciones terapéuticas. En Cisticercosis Humana y Porcina. Su conocimiento e investigación en México. *Limusa-Noriega*, México, D.F. pp. 53-56.
20. FLISSER, A., Tarrab, R., Willms, K., Larralde, C. (1975). Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Archivo Investigación Médica México*. pp. 51-58.
21. FLISSER, A., Bulnes, I., Díaz, M., Luna, R., Woodhouse, E., Beltrán, F., Martínez, I., Larralde, C. (1976). Estudio seroepidemiológico de la cisticercosis humana en poblaciones

predominantemente indígenas y rurales del estado de Chiapas. *Archivo. Invest. Méd. (Méx.)* 3:107.

22. FLISSER, A., Pérez,, R., Larralde, C. (1979). The immunology of human and animal cysticercosis: A review. *Bull. WHO* 57:839.
23. FLISSER, A., Woodhouse, E. Larralde, C. (1980). Human cysticercosis: Antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39:27.
24. FLISSER, A., (1986). Cysticercosis. En: Immunodiagnosis of parasitic disease. Helminthic diseases. Walls, K., Schanz, P. (eds.). *Academic Press*, New York. p. 109.
25. FRONHER, H. (1982). Propiedades farmacológicas, toxicológicas y farmacocinéticas del prazicuantel. *Salud pública de México*.
26. GEMMELL, M., Matjas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E.J.L. (1983). Guidelines for surveillance, prevention and control of teniasis-cysticercosis. *WHO publication vph/83.49* Switzerland.
27. GOLDSMITH, R.S., Kagan, I.G., Reyes, M.A., Ferreira, J. (1971). Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. 1. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 69:500.

28. GOTTSTEIN, B., Tsang, V., Schantz, P., (1986). Demonstration of species-specific and cross-reactive component of *Taenia solium* metacestodes antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35:308-315.
29. GOTTSTEIN, B., Zini, D., Schant, P. (1987). Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and Immunoblotting. *Tropical Medicine and Parasitology*, 38:299-303.
30. GONZALEZ, D., Sandoval, M. Trujillo, V. (1978). Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. *Archivo Invest. Méd.* 9:51-58.
31. GONZALEZ, D., Trujillos, V., Estañol, B. (1989). Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por IFI, HAI, ELISA, En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, CONACyT, *Limusa-Noriega*. México. pp.169-174.
32. GUERRA, G., Flisser, A., Cañedo, L., Larralde, C. (1982). Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticercy of *Taenia solium*. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleite, P., Larralde, C., Beltrán, F. *Academic Press*. New York. pp. 437-451.
33. GUTIERREZ, M. (1989). Diagnóstico inmunológico de la cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. CONACyT. *Limusa-Noriega*. pp. 175-178.

34. HOUNSFIELD, G. (1973). Computed transverse axial scanning (Tomography), I. Description of the system. *Br. J. Radiol.* 46:1016.
35. KAPLAN. (1988). Química Clínica, 2a. edición. *Médica Panamericana*.
36. KUMAN, F., Gaur, S. (1989). Comparative evaluation of various immunodiagnostic tests for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in pigs, using fractionated antigens. *J. Helmit.* 63:13-17.
37. LACLETTE, P., Ornelas, Y., Merchant, M., Willms, K., (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Larralde, C. *Academic Press*. New York. pp. 375-388.
38. LACLETTE, P., Merchant, M. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* 73:121-129.
39. LAEMMLI, K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4.
40. LOMBARDO, L. (1982). Colección de textos médicos. Cisticercosis cerebral. IMSS, México, D.F. Vol. 4:71.
41. LOWRY, O. Rosenbrough, N., Lewis-Farr, A., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

FALLA DE ORIGEN

42. LUMSDEN, R., Voge, M., Beltrán, F. (1982). The metacystode tegument; fine structure, development, topochemistry and interaction with the host. En: *Cysticercosis Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Larralde, C. pp. 307-361.
43. MACIAS, V.; Maqueo, M. (1958). Cisticercosis cerebral. *Rev. Invest. Clin.* **10**:443.
44. MADRAZO, I., Sandoval, M., León, V. (1989). Clasificación de la neurocisticercosis. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. CONACyT.
45. MAHAJAN, R. (1982). Geographical distribution of cysticercosis. En: Flisser, A., Willms, K. (ed.). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. pp. 39-46.
46. MATEOS, G. Neurocisticercosis, análisis de 1000 casos. *Neurología. Neuropsiquiatría y Psiquiatría*. Vol. 27, España.
47. MOREIRA, P. Ronceray, J., Dubim, P. (1982). Acute pancreatitis from obstruction of wirsung's canal by *T. saginata*. *J. Chir. Pcris* **117**:193-194.
48. MUSOKE, A. (1975). Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to *T. taeniaformis* in the moses. *Immunology*. **24**:97-101.
49. NIETO, D. (1956). Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology*. **6**:725-738.

50. Organización Mundial de la Salud. (OMS, 1979). Infecciones intestinales por protozoarios y helmintos. *Serie de informes técnicos No. 666*, Ginebra, 1981.
51. PLANCARTE, A., Espinoza, B., Flisser, A. (1989). Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por el ensayo de ELISA. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. CONACyT. *Limus-Noriega*. pp. 159-163.
52. PLANE, P., Dubin, P. (1980). Acute pancreatitis from obstruction of wirsungls canal by *T. saginata* *J. Chir. Paris*. 117:193-194.
53. RABIELA, T., Rivas Cancino, F. (1982). Anatomopathology aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Beltrán, F. *Academic Press*. New York. pp. 179-200.
54. RABIELA, T., Castillo, S., González, A. (1985). Pruebas morfológicas de que *C. celulosae* y *C. racemosus* son larvas de *Taenia solium*. *Archivo. Invest. Méd. (México)* 16:83.
55. RABIELA, T. (1989). Patología de la neurocisticercosis benigna y de la grave. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. *Limusa-Noriega*. pp. 107-122.
56. RAMOS, J. (1988). Nota sobre un caso de cisticercosis en cuerpo vítreo. *Rev. Méd. Méx.* 1:13.

57. RAMIREZ-BON, Merchant, M., González, M. (1982). Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. *Academic Press*. New York. pp. 261-280.
58. ROBLES, C. (1982). Symposium internacional sobre tratamiento médico de la neurocisticercosis. *Salud Pública Mexicana* 24:599-603.
59. RODRIGUEZ-CARBAJAL. (1989). El diagnóstico de la neurocisticercosis humana por tomografía axial computarizada. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., *Limusa-Noriega*. CONACyT. pp. 75-77.
60. SARTI, E., Flisser, A. (1988). *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop. Med. Parasit.* 39:194-198.
61. SARTI, E. (1989). Epidemiología de la teniasis-cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. *Limusa-Noriega*. pp. 233-242.
62. SARTI, E. (1992). Schant, P., Plancarte, A., Wilson, M., Flisser, A. Prevalencia and risk factors for *Taenia solium* and pigs in a village in Morelos, México. *Am. J. Med. Hyg.* 46:677-685.
63. SCHANTZ, P.M., Sarti, E. (1990). Diagnostic methods and epidemiology surveillance on *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia* (en prensa).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

64. SCHENONE, H., Ramírez, R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Beltrán, F., *Academic Press*. New York. pp. 25-38.
65. SLAIS, J. (1982). Morphology of the scolex of *Cysticercus cellulosae* in brain cysticercosis. En: Flisser, A. Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. *Academic Press*. New York. pp. 235-260.
66. SOTELO, J. (1989). ELISA en el diagnóstico de neurocisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., *Limusa*. pp. 165-167.
67. STERN, W. (1981). Neurosurgical consideration of cysticercosis of the central nervous system. *J. Neurosurg.* 55:385.
68. THOMAS, H. Andrews, P. (1982). New results on the effect of praziquantel in experimental cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31(4):803-810.
69. TOWBIN, H., Gordon, J. (1979). Electro-phoretic-transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocelulosa sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354.
70. TSANG, V., Brand, J. (1989). An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoproteins antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Inf. Dis.* 159:1.

71. TSANG, V., Pilcher, J., Darwin, M., Schantz, P. and Gilman, R. (1991). Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunolog. and Immunophat.* 29:69-78.
72. VARGAS, G. Navarro, R. Acevedo, A., Flisser, A., Aluja, A. (1986). Localización del cisticerco de la *Taenia solium* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. *Vet. Méx.* 17:275-279.
73. VILLAGRAN, J. (1989). La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. CONACyT, *Limusa-Noriega*. pp. 97-205.
74. WALLS, K., Schantz, P. (1986). Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Helminthic Diseases, *Academic Press*, New York. p. 301.
75. WATSON, J.M. (1960). *Medical Helminthology*. Balliere Tindal and cox. London.
76. WILSON, M., Bryan, R. Fried, J.A., Schantz, P., Tsang, V. (1991). Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J. Inf. Dis.* 164:1007-1009.
77. WOODHOUSEM, K., Flisser, A., Larralde, C. (1982). Seroepidemiología de la cisticercosis humana en México. En: Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. *Academic. Press*. New York. pp. 11-23.

78. YOSHINO, K. (1933). Studies on the post-embrional development of *Taenia solium*. J. Med. Ass. Formosa. 32:139-171.
79. ZENTENO, G. (1982). Clasificación de la cisticercosis humana. En: *Cysticercosis present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. pp.107-126.
80. ZHI-BIAO, X., When-kei, Ch., Hui-lan, Z. Man-ling, F., and Wei-ji. (1993). Praziquantel in treatment of cysticercosis cellulosae. Report of 200 casos. Chinese Med. J. 98:489-494.

## APENDICE

<i>Amortiguador de fosfato de sodio</i>	(AFS)	
Fosfato de sodio dibásico	( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	13.8 g
Fosfato de sodio monobásico	( $\text{NaHPO}_4$ )	14.2 g
Cloruro de sodio	( $\text{NaCl}$ )	87.6g
Azida de sodio	( $\text{N}_3\text{Na}$ )	0.4 g
Agua destilada desionizada		800 ml
llevar a 1000 ml con agua destilada y medir pH 7.0		

#### *Solución de Lowry*

Carbonato de sodio anhidro	( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	2% en:
Hidróxido de sodio	( $\text{NaOH}$ ) 0.1 N	9.8 ml
Tartrato de sodio y potasio	2% 0.1 ml	
Sulfato de cobre pentahidratado	( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	% 0.1 ml
Hidróxido de sodio	( $\text{NaOH}$ ) 0.1 N	0.4 g
Agua destilada		100 ml

#### *Procedimiento:*

Se agrega a cada tubo el volumen de muestra elegido tanto para la curva patrón como para el problema y se afora cada tubo a 1 ml con AFS 1X. Se incluyó un tubo más con AFS 1 ml como blanco.

Se agregó a todos los tubos 4 ml de solución de Lowry y se agitó.

Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se adicionó a todos los tubos 0.4 ml de solución de Folin previamente diluido 1:1 con agua destilada y se agitó vigorosamente.

Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó en un espectrofotómetro a 600 nm.

<b>ELECTROFORESIS</b>		
<b>Tipo de reactivo</b>	<b>Gel Superior</b>	<b>Gel Inferior</b>
Acrilamida 30% bis-acrilamida 0.8%	3.5 ml	44 ml
Tris-HCl 2M; pH 6.8	0.65 ml	—
Tris-HCl 2M; pH 8.8	—	24 ml
S D S 10%	0.1 ml	1.2 ml
Persulfato de amonio (10 mg/ml)	0.1 ml	1 ml
TEMED	0.001 ml	0.050 ml

### PREPARACION DE ACRILAMIDA 30%

## PREPARACION DE ACRILAMIDA 30%

Acrilamida	30 g.
N,N' - metileno - bis - acrilamida 0.8%	0.8 g.

Se afora a 100 ml con agua destilada y se disuelve por agitación vigorosa. Se guarda a 4°C.

## PREPARACION DE TRIS-HCL 2 M. pH 8.8

Tris (hidroximetil aminometano)	24.22 g
---------------------------------	---------

Se afora a 100 ml con agua destilada y se ajusta el pH con HCl. Se guarda a 4°C.

## PREPARACION DE TRIS -HCl 2M. pH 6.8

Se sigue el proceso anterior pero se ajusta el pH a 6.8.

## PREPARACION DE SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10 g.
--------------------------------	-------

Se afora a 100 ml con agua destilada y se disuelve por agitación vigorosa. Se guarda a temperatura ambiente.

## PREPARACION DE PERSULFATO DE AMONIO

Persulfato de sodio	10 mg.
agua destilada	1 ml.

Este reactivo se debe preparar inmediatamente antes de usarse.

## PREPARACION DE COCTEL

SDS	0.1g
EDTA	7.4 mg
Glicerol	1 ml
Tris -HCl 0.05 M.pH 6.8	50 $\mu$ l

Se afora a 10 ml con agua destilada y se adiciona azul de bromofenol, la cantidad suficiente para tener un color azul intenso. Se guarda a 4°C en alícuotas de 50ml.

El mercaptoetanol se adicionó hasta el momento de poner el coctel a las muestras (1  $\mu$ l/ml).

## PREPARACION DE TRIS-HCL 0.05 M.pH 6.8

TRIS (Hidróximetil Aminometano)	121.14 g
---------------------------------	----------

Se afora a 20 ml con agua destilada y se ajusta el pH a 6.8 con HCl.

## AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS

Tris-base	8.4 G
Glicina	40.32 G
SDS 10%	28 ML

Se afora a 3500 ml con agua destilada, se disuelve y se coloca en la cámara de corrida.

### AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

Tris-base	3.08 g
Glicina	14.48
Metanol	200 ml

Se afora a 1000 ml con agua destilada, se disuelve y se coloca en la cámara.

### PREPARACION DE AMORTIGUADOR DE FOSFATO SALINO (AFS)

#### *SOLUCION A*

0.01 M. Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2 \text{H}_2 \text{PO}_4 \text{H}_2\text{O}$ )	1.37 g
0.015 M. Cloruro de sodio (NaCl)	8.76 g

Se afora a 1000 ml con agua destilada y se disuelve.

#### *SOLUCION B*

0.01 M. Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	2.687 g
0.015 M. Cloruro de sodio (NaCl)	8.766 g

Se afora a 1000 ml y se disuelve.

Se toma de la solución A, la cantidad necesaria para ajustar la solución B a un pH de 7.2. Esta solución se llama AFS, la cual se esteriliza y es guardará a temperatura ambiente hasta su uso.

### PREPARACION DE TWEEN 20/AFS

Se colocó 0.3 ml de tween 20 en 100 ml de AFS. Se mezcla y se guarda hasta su uso.

### PREPARACION DE AFS/TWEEN 20/LECHE

Se coloca 100 ml de la solución anterior y se le adiciona 5 g de leche semidescremada, se disuelve y se usa de inmediato.

### PREPARACION DE DAB

Diaminobenzidina (DAB) 0.5 g

Se afora a 10 ml con AFS. Se disuelve en agitación por una hora libre de luz, se guarda en alicuotas de 0.5 ml a 4°C.