

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS SÉRICOS Y
DEL ANTÍGENO PARASITARIO HP10 EN SUERO Y LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DE CERDOS INOCULADOS
EXPERIMENTALMENTE EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL CON
ONCOSFERAS ACTIVADAS DE *Taenia solium*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

HUMBERTO IVÁN MORENO BOTELLO

ASESORAS:

MVZ. M.SC. ALINE SCHUNEMANN DE ALUJA
DRA. AGNES ODILE MARIE FLEURY



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera expresar mi agradecimiento a todos y cada una de las personas que, de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis, probablemente se me olvide algún nombre, y por lo tanto ofrezco mis más sinceras disculpas para ell@s.

A esa fuerza misteriosa que muchos llaman DIOS, por haber guiado mi camino hasta aquí.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO y en especial a la FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA por permitirme formar parte de ellas, muchas gracias.

A mi madre: Margarita Botello Muñoz, por darme el regalo más hermoso que se puede dar: la vida, por guiar mis pasos, por enseñarme que no hay imposibles y que todo se puede lograr, por brindarme su apoyo incondicional durante todo este camino, *Gracias mamá.*

A mi padre: Daniel Moreno Alcantar, por enseñarme el respeto hacia la vida, por nunca darse por vencido a pesar de las adversidades y siempre mantener el buen ánimo, *Gracias papá.*

A mis hermanos, Jorge y Víctor por que somos parte de una gran familia y juntos somos invencibles.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Ciudad de México.

A mis asesoras de tesis:

A la Dra. Aline Schunemann, quien sin conocerme me brindó la oportunidad de trabajar a su lado; de compartir su conocimiento y por ser un ejemplo de paciencia, ética y de vida.

A la Dra. Agnes Odile Marie Fleury que me apoyo para que este trabajo concluyera cuando estaba a punto de darme por vencido, por su asesoría y paciencia durante estos meses de espera y por la gran labor que desempeña en el ámbito de la neurocisticercosis humana.

A mis amigos, *Cepi, Bofo, Pirru, José, Oso, Jaz, Adri, Gelos, Cuyo, Araceli, Moreno, Rojo, Nata, Conrado, Tona, Humberto, Ismael, Mariana, Fran, Macarenas, Prof. Ocadiz*, y si le sigo nunca terminaría de anotarlos a todos, gracias por compartir momentos de mi vida que quedaran por siempre grabados en mi memoria.

A MVZ Diana Reyes (Dianet, Nana), quien ocupa un lugar muy especial a mi lado, mi pareja, mi novia, mi amiga, mi amor; por su especial colaboración en el desarrollo y finalización de esta tesis, por esos fines de semana que dedico al cuidado de los cerditos y másí. Por siempre mantener viva su esperanza y por enseñarme que la magia si existe, muchas gracias.

A DRA Nelly Villalobos, quien sin conocerme me brindó su apoyo, su orientación, que me motivó a concluir y siempre confió en mí, muchas gracias.

A MVZ Dipl. E. Zarahit R. González por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo y por qué con su apoyo he podido desarrollarme y aplicar todo lo aprendido en la FMVZ, gracias.

CONTENIDO

Paginas

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACION	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
MATERIAL Y METODOS	11
1. Animales e instalaciones	11
2. Obtención de la <i>Taenia solium</i>	11
3. Inoculación	12
4. Serología	14
5. Realización de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-T. solium en suero y LCR	15
6. Realización de la prueba de ELISA para la detección de antígeno HP10 en suero y LCR	16
7. Obtención de los encéfalos	17
8. Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	51

RESUMEN

MORENO BOTELLO HUMBERTO IVÁN. Determinación de los anticuerpos específicos séricos y del antígeno parasitario hp10 en suero y líquido cefalorraquídeo de cerdos inoculados experimentalmente en el sistema nervioso central con oncosferas activadas de *Taenia solium* (bajo la dirección de: MVZ, MS Aline Schunemann de Aluja y DRA. Agnes Odile Marie Fleury).

El complejo teniasis-cisticercosis (T/C), sigue representando actualmente en México un problema de salud pública, ya que a pesar de todos los esfuerzos por controlarlo aún prevalece en áreas rurales y en menor grado en áreas urbanas del país. La *Taenia solium* adulta ocasiona la teniasis en el hombre, la cisticercosis (afección por la forma larvaria de la *T. solium*) se desarrolla al ingerir los proglótidos grávidos (segmentos del parásito lleno de huevos) o los huevos. La cisticercosis ocurre en el cerdo, considerado como el único hospedero intermediario natural, pero también puede ocurrir en el humano. Cuando los cisticercos se desarrollan en el SNC ocurre la neurocisticercosis, la cual presenta sintomatología neurológica inespecífica y de consecuencias a veces fatales, su diagnóstico es difícil, ya que éste sólo se puede corroborar con técnicas de imagen como resonancia magnética (R.M.) o tomografía computarizada (T.C.). En este trabajo se evaluó la presencia de anticuerpos específicos IgG-anti-*T. solium* y del antígeno específico HP10 determinados mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en 12 cerdos experimentalmente inoculados con oncosferas activadas en dos compartimentos del SNC: espacio subaracnoideo y cavidad ventricular. Esta evaluación se realizó en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). Las muestras de suero se obtuvieron una semana antes y cada 14 días posteriores a la inoculación. Una vez concluidos los tres meses de duración del experimento, el total de las muestras se procesaron mediante la técnica de ELISA. Los anticuerpos en suero mostraron incremento en siete de los animales inoculados aunque solo en tres de ellos al estudio postmortem se encontraron estructuras compatibles con metacestodos en estadio vesicular. El antígeno HP10 en suero alcanzó valor positivo en seis de los animales inoculados, en dos de los cuales se recuperaron parásitos vesiculares, por lo tanto, los cuatro restantes se clasificaron como falsos positivos ya que el antígeno HP10 es detectable solamente cuando existen metacestodos vesiculares. En el LCR los anticuerpos no mostraron incremento y el antígeno HP10 obtuvo valor positivo en dos de los animales inoculados (cerdos #94 y #100), en el cerdo #94, el cual presentó una lesión sugerente al desarrollo de un metacestodo con una reacción inflamatoria caracterizada por eosinófilos y linfocitos. En conclusión, los anticuerpos se generan tempranamente en los animales inoculados sin que existan diferencias significativas en función del éxito de la parasitosis. La detección de antígeno HP10 por medio de la prueba de ELISA mostró cierto grado de confiabilidad en el caso de cisticercos vesiculares con localización subaracnoidea en animales inoculados experimentalmente y con desarrollo exitoso del parásito en el sistema nervioso central, aunque no es recomendable utilizarla como prueba de rutina en la investigación de neurocisticercosis porcina.

INTRODUCCIÓN

El complejo teniasis/cisticercosis (T/C), en la actualidad sigue siendo un problema de salud pública en México ya que prevalece en áreas rurales y en menor grado en áreas urbanas del país. Es igualmente endémico en la mayoría de los países de América Latina, Europa del Este, Asia y África subsahariana donde se consume carne de cerdo^{1, 2, 3, 4, 5, 6}. La presencia del parásito adulto en el intestino delgado del hombre ocasiona la teniasis, siendo esta la forma más benigna de la infección al no generar sintomatología específica en los pacientes que la padecen. La cisticercosis se desarrolla después de la ingestión de segmentos grávidos o huevos presentes en la materia fecal humana. Puede ocurrir en el cerdo (coprófago natural), pero también en el humano que suele infectarse consumiendo alimentos o agua contaminados con huevos de *Taenia solium*. Cuando los parásitos se desarrollan en el sistema nervioso central del hombre se produce la neurocisticercosis (NCC) y cuando se alojan en el ojo se produce la cisticercosis ocular, que son las formas más graves de la enfermedad^{7, 8, 9}. Datos conservadores calculan 50,000 muertes cada año en el mundo debido a esta enfermedad^{10, 11, 12}. Fleury *et al*, realizaron un estudio de prevalencia hospitalaria entre 1994 y 2004, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez de la Secretaría de Salud en la Ciudad de México y reportaron que la frecuencia de neurocisticercosis no ha variado en esos 10 años, demostrándose que entre los pacientes atendidos en este Instituto era de 2.4% (100/4098) en 1994, y de 2.5% (120/4706) en el 2004.¹³

En el siglo XIX, Küchenmeister, Leuckardt y otros investigadores de la época principalmente en Alemania y Francia, describieron la naturaleza parasitaria y el ciclo de la

enfermedad, dando como resultado, el poder implementar medidas de control y erradicación, lográndose casi por completo a principios del siglo XX en países de Europa occidental y en E.U.A⁷. Quinientos años después de su llegada al nuevo mundo, la T/C sigue causando estragos entre la población humana y porcina hospederos definitivo e intermediario respectivamente, necesarios para completar su ciclo de vida¹⁴.

CICLO BIOLÓGICO

Taenia solium (*T. solium*), es un platelminto de la clase cestoda con un ciclo biológico que requiere de dos hospederos: el ser humano, que es el único hospedero definitivo natural y el cerdo, principal hospedero intermediario^{2, 6, 8, 9}.

La *T. solium* en su fase adulta se localiza en el intestino delgado del ser humano, comúnmente es llamada "solitaria" debido a que en la mayoría de los casos se encuentra un solo parásito en cada paciente; posee un escólex con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos (22-32), las cuales son estructuras de fijación. Tiene un estróbilo que mide entre 1.5 y 5 m de largo y está formado por 700 a 1000 proglótidos, cada proglótido grávido (útero lleno de huevos) puede llegar a contener hasta 50,000 huevos^{8, 16}, estos son los más alejados del cuello, los que se separan del estróbilo y son expulsados en la materia fecal (4-5 por día) 2-3 meses post-infección^{8, 15}.

El ciclo continua cuando las personas portadoras de la *T. solium* defecan a ras de suelo dejando las deyecciones contaminadas con los huevos o los proglótidos al aire libre y al alcance de los cerdos que deambulan libremente por muchas comunidades rurales del país y llegan a consumirlas. En el medio rural, las letrinas están diseñadas con frecuencia expresamente para que los cerdos tengan acceso a la materia fecal humana^{7, 8, 16, 17, 18}.

Una vez ingeridos, los huevos pierden su cubierta en el tracto digestivo del cerdo por acción de las sales biliares y enzimas proteolíticas, el embrión hexacanto (también llamado oncosfera) es liberado, estos atraviesan la pared del intestino delgado donde alcanzan la circulación general a través de capilares sanguíneos o linfáticos y son distribuidos a los diferentes tejidos, principalmente músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado y sistema nervioso central (SNC). Una vez instalados, las oncosferas evolucionan hasta la etapa de metacestodo o *Cysticercus cellulosae* ocasionando la cisticercosis o neurocisticercosis según su localización. Posteriormente el ciclo se completa cuando los seres humanos consumen carne o vísceras de cerdo infectadas con metacestodos viables y mal cocidas. Una vez ingeridos los cisticercos, por acción de las sales biliares son activados y el escólex evagina de su vesícula para anclarse a la pared del intestino, dos a tres meses después el cisticerco alcanza la etapa adulta (*T. solium*) productora de proglótidos grávidos^{8, 9, 11, 16}.

La neurocisticercosis es adquirida por el ser humano cuando de manera accidental llega a consumir alimentos o agua contaminados con los huevos del parásito. Después de la ingestión, las oncosferas atraviesan la pared intestinal y por vía circulatoria alcanzan el SNC transformándose en cisticercos los que dependiendo del número, estado y localización ocasionan incapacidad física, convulsiones, signos neurológicos focales y en ocasiones la muerte^{19, 20, 21, 22}.

Dadas las características de infección y del ciclo de vida de este parásito, la neurocisticercosis humana y cisticercosis porcina (consideradas como un marcador de pobreza y marginación) prevalecen en áreas rurales y en menor grado en áreas urbanas del país^{1, 4, 5, 9, 16, 18}. Los principales factores de riesgo para presentar cisticercosis en el humano son: comer alimentos no lavados adecuadamente y que han sido contaminados por huevos

de *T. solium*, convivir con un teniásico o que este se encuentre en el ambiente cercano, vivir en un medio permitiendo que el ciclo del parásito se complete como lo son: fecalismo al aire libre, porcicultura rustica, consumo de carne cruda infectada o indebidamente cocida e higiene personal deficiente. En México la enfermedad persiste por la problemática antes mencionada^{1,22}.

En dos estudios realizados en el medio rural en los estados de Morelos y Puebla, se encontraron prevalencias de NCC en humanos del 9 y 9.5%, tomando como criterio de diagnóstico la tomografía computarizada (TC)^{18,19}. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud en México, la neurocisticercosis fue en este centro hospitalario la novena causa de mortalidad y la quinta causa de morbilidad hospitalaria entre 1995 y 2001^{23,24}, afectando mayoritariamente a personas jóvenes en edades productivas²³. México informó frecuencias de hasta 8.6% de hospitalizados y en series de necropsias de hasta 2,453 por cada 100,000 habitantes y se señala que un 43.3% eran asintomáticos y 80% fue únicamente hallazgo a la necropsia^{4, 21}. Según las estadísticas oficiales, la disminución de la incidencia de teniosis y cisticercosis en humanos ha sido considerable desde 1990 hasta el 2005, ya que en 1990 se tenía un reporte nacional de 14013 casos de teniosis y 586 casos de cisticercosis, en el 2005 fue de 393 casos de teniosis y 306 de cisticercosis.²² Estas cifras deben ser tomadas con mucha precaución, ya que subestiman la situación real debido a que en muchos casos de neurocisticercosis en la población rural no se diagnostican cuando cursan con síntomas leves o no se reportan por falta de información y en la mayoría de los casos los servicios de salud se encuentran muy alejados de las comunidades rurales o son insuficientes.

En los últimos años se han utilizado varias pruebas inmunodiagnósticas para determinar la frecuencia de anticuerpos anticisticerco en diferentes poblaciones humanas. Las técnicas como fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta (HI) y la inmunolectroforesis, al ser muy poco sensibles para detectar cisticercosis y neurocisticercosis han dejado de utilizarse³⁴. En la actualidad, la prueba más utilizada en estudios de seroprevalencia (presencia de anticuerpos) y como primer paso en el diagnóstico de Neurocisticercosis conjuntamente con la tomografía computarizada³⁴, es la prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que presenta una sensibilidad para el diagnóstico de NCC en humanos de 85-90% en suero y 95% en líquido cefalorraquídeo^{25, 33}. La seropositividad (presencia de anticuerpos) puede presentarse a causa de la exposición al parásito, pudiendo haber infección neurológica o no, además de existir falsos positivos por reacciones cruzadas con otros helmintos como *T. saginata* o *Echinococcus granulosus*, o simplemente por teniasis⁶. La detección de antígenos ha mostrado en el humano ser muy sensible y específica a la presencia de parásitos viables en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo. El cisticerco es un organismo complejo y como tal, expresa un extenso grupo de antígenos (Ramos-Kuri et al, 1992). Uno de los antígenos más caracterizados es el denominado HP10, este antígeno es secretado por el cisticerco en estadio vesicular al medio circundante, esta característica hace posible su detección en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con Neurocisticercosis^{26, 27}, es una herramienta diagnóstica sensible y específica para la detección de cisticercos viables localizados en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo y en el sistema ventricular del encefalo²⁸. Este antígeno también es sensible y específico, basado en ELISA de captura para el diagnóstico de cisticercos viables de *T. saginata* en el ganado bovino³⁵. A esta prueba se le encontró un gran uso en el diagnóstico

de cisticercos viables de *T. solium* en cerdos y humanos, además de ser una herramienta para estudios epidemiológicos en las áreas de transmisión activa de cisticercosis^{36, 37}. Sciutto et al., 1998³⁸, realizaron varios estudios dirigidos a evaluar la sensibilidad y especificidad de diferentes métodos para el diagnóstico de la cisticercosis porcina. Utilizaron tres diferentes procedimientos inmunológicos para la detección de anticuerpos y de antígenos en el suero: 1. Niveles de anticuerpos en ELISA. Utilizando antígenos del fluido vesicular de cisticercos de *T. solium*, 2. Un repertorio de antígenos reconocidos en inmunoelectrotransferencia utilizando el método comercial disponible originalmente diseñado por Tsang et al., 1989⁴⁰ y 3. La detección del antígeno de secreción HP10 utilizando el anticuerpo monoclonal HP10 producido y originalmente reportado por Harrison et al., 1989³⁵. La detección de anticuerpos y de antígeno HP10 por ELISA mostró alta especificidad (93 y 100%) cuando se utilizaron sueros de animales de granja libres de cisticercosis. En cerdos mantenidos en condiciones controladas e infectados experimentalmente se obtuvo 86% de especificidad y 96% de sensibilidad en el ensayo de detección de anticuerpos anti-cisticercos por ELISA y 84% de sensibilidad y 96% de especificidad utilizando el método de detección del antígeno HP10³⁸.

Una investigación reciente en la cual se infectaron animales por vía oral con huevos de *T. solium*, determinaron que los anticuerpos anti-cisticercos medidos por IET (Western-Blot) aparecen a partir del día 30 post infección (p.i.) con una dosis de 1000 huevos y hasta el día 60 (p.i.) cuando se infectaron con una dosis de 10 huevos; los animales presentaban quistes ubicados en el SNC y en el músculo esquelético³⁰.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente poco se sabe sobre la presencia de anticuerpos específicos en cerdos afectados por Neurocisticercosis. Así mismo, la detección de antígeno específico HP10 no ha mostrado por el momento ser una herramienta de relevancia para el diagnóstico de cisticercosis porcina. El modelo experimental de neurocisticercosis permitirá ampliar los conocimientos acerca de estos dos puntos.

HIPOTESIS

La presencia de anticuerpos y antígenos específicos en el suero y en el líquido cefalorraquídeo de cerdos inoculados experimentalmente con oncosferas activadas en el sistema nervioso central, son un indicador del éxito de la infección y del estado en el cual se encuentran los cisticercos al momento del muestreo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de anticuerpos específicos séricos y del antígeno parasitario HP10 en suero y líquido cefalorraquídeo de cerdos inoculados experimentalmente en el sistema nervioso central con oncosferas activadas de *T. solium*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar antes, y a diferentes tiempos después de la inoculación la presencia de anticuerpos específicos y del antígeno parasitario HP10 en suero y LCR determinados por medio de la prueba de ELISA en cerdos inoculados con diferentes cantidades de oncosferas activadas de *T. solium* en dos compartimientos (espacio subaracnoideo y sistema ventricular) del encéfalo.
2. Correlacionar los resultados de estas determinaciones con los de la necropsia de los animales inoculados (número, estado y localización de los parásitos *in situ*).

MATERIAL Y METODOS

1. Animales e instalaciones.

Se utilizaron 12 cerdos híbridos de Landrace con Yorkshire, seis hembras y seis machos de dos meses de edad, en buen estado de salud, los cuales fueron comprados en una granja tecnificada libre de cisticercosis porcina; los animales se albergaron en la unidad de experimentación de la línea de investigación teniasis/cisticercosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México, se formaron tres grupos de cuatro animales cada uno únicamente para alojamiento, la distribución de los machos y hembras se hizo al azar. Cada grupo fue colocado en un corral con piso, paredes y techo de cemento, las dimensiones de cada corral son: 4 metros de largo por 2.2 metros de ancho (8.8m²), la unidad también tiene iluminación natural y artificial, extractores de aire, drenaje y tomas de agua mediante sistemas de chupón para los animales, además de un área verde para que los animales salieran a pastar por periodos de 30 a 40 minutos por día. Una semana después de la llegada de los cerdos a las instalaciones de la FMVZ, se obtuvieron muestras de sangre de la vena cava anterior, una por cada animal con la finalidad de utilizarlas como referencia.

2. Obtención de la *Taenia solium*.

A través del interrogatorio y análisis coproparasitológicos realizados a personas que radican en comunidades rurales con alta prevalencia de cisticercosis porcina, principalmente en los estados de Guerrero y Morelos, se identificó un paciente portador de *T. solium* del cual se desconoce el momento de la infección y el tiempo de duración de la misma. Se le

administró un tratamiento estándar con niclosamida (Yomesan®, Bayer S.A.), dos gramos por vía oral, seguido de una purga intestinal dos horas después. Este tratamiento se administró bajo supervisión médica. Al obtener la Taenia se llevó al laboratorio donde se lavó tres veces con solución salina fisiológica (SSF) para eliminar los restos de materia fecal. Se conservó en PBS con antibióticos (penicilina + estreptomicina) y se guardó en refrigeración a 4⁰C hasta su utilización. Se realizó la evaluación microscópica basada en las características morfológicas de las tenias para diferenciar entre *T. saginata* y *T. solium*. Se colocó un proglótido grávido en una caja de Petri, el cual se rompió de manera manual obteniendo los huevos, a los cuales se les eliminó la estructura externa liberando los embriones, los cuales fueron activados agregando bilis de cerdo en una suspensión para posteriormente ser observados al microscopio hasta que el 90% de las oncosferas estuviesen activadas (procedimiento del hatching³², eclosión de las oncosferas); una vez terminado este proceso, se mantuvieron a una temperatura de 37°C hasta ser trasladados a los quirófanos, donde los cerdos estaban listos para ser inoculados. Este procedimiento se llevó a cabo el día de la inoculación.

3. Inoculación.

Los embriones activados se inocularon directamente en el sistema nervioso central de los cerdos por dos diferentes rutas:

1) Implantación en los surcos del espacio subaracnoideo: por medio de craneotomía fronto-parietal, se inocularon las oncosferas en el espacio subaracnoideo, al abrir la duramadre se hace un pequeño orificio para depositar las oncosferas. Se pretende que el inoculo se disemine por todo el espacio subaracnoideo de la convexidad.

2) Implantación ventricular: por medio de craneotomía fronto-parietal se realizó una punción en el parénquima del hemisferio izquierdo del encéfalo con un catéter de látex de 5mm de diámetro hasta alcanzar el ventrículo lateral a partir de la tabla externa del cráneo. Se depositaron las oncosferas en el sistema ventricular del cerdo. Se pretende que la circulación del LCR disemine las oncosferas por todo el sistema ventricular.

Se inocularon siete animales por la vía subaracnoidea (s.a.), dos con cantidad baja de oncosferas (100-150), cerdos #92, y #97 y cinco con cantidad alta de oncosferas (1000 a 1500), cerdos #93, #95, #96, #97 y #98) y cinco animales por la vía intraventricular (i.v.), tres con cantidad baja de oncosferas (100-150), cerdos # 89, #99 y #100 y dos con cantidad alta de oncosferas (1000-1500) cerdos #91 y #94 (cuadro 1).

Cuadro 1. Numero de cerdos y cantidad de oncosferas inoculadas por cada vía.

Vía de inoculación	Cerdos inoculados	Cantidad baja de oncosferas inoculadas (100-150)	Cantidad alta de oncosferas inoculadas(1000-1500)
Intraventricular (i.v.)	5	3	2
Subaracnoidea (s.a.).	7	2	5*
TOTAL	12	5	7

*Al cerdo #93 se le inocularon 2000-2500 oncosferas, está considerado dentro de este grupo.

Cuadro 1.1. Numeración asignada a los animales

CERDO #	VÍA DE INOCULACIÓN	TIEMPO DE INFECCIÓN (DÍAS)	NUMERO DE ONCOSFERAS INOCULADAS	SEXO
89	i.v.	119	100-150	Hembra
90	s.a.	119	1000-1500	Hembra
91	i.v.	122	1000-1500	Hembra
92	s.a.	123	100-150	Hembra
93	s.a.	27	2000-2500	Macho
94	i.v.	101	1000-1500	Hembra
95	s.a.	116	1000-1500	Macho
96	s.a.	119	1000-1500	Macho
97	s.a.	105	100-150	Hembra
98	s.a.	102	1000-1500	Macho
99	i.v.	102	100-150	Macho
100	i.v.	102	100-150	Macho
PROMEDIO		104.75		

4. Serología.

Una semana antes y cada 14 días posteriores a la inoculación, se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular con un sistema de sangrado *Sarstedt* con aguja de 21 G (verde); una vez formado el coagulo se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, separando el suero y colocándolo en un tubo *Eppendorf* de 1.5 ml, las muestras se congelaron a -20° C hasta su uso.

La muestra de referencia de líquido cefalorraquídeo se obtuvo en el momento de la inoculación puncionando el encéfalo con un catéter de látex de 5mm de diámetro hasta

alcanzar el ventrículo lateral a partir de la tabla externa del cráneo, obteniendo así 1ml de LCR con una jeringa de 3ml sin aguja. Las muestras de LCR para medición de anticuerpos y antígeno HP10 se obtuvieron al momento de la necropsia en el animal ya muerto, puncionando directamente el foramen magno de los cerdos con una jeringa de 10 ml y aguja de 21 G (verde).

Las muestras se colocaron en un tubo *Eppendorf* de 1.5 ml y se congelaron a -20° C hasta su uso.

5. Realización de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti- *T. solium* en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de cerdos

Se sensibilizó la placa para ELISA con una muestra de antígeno de *T. solium* a 4.2mg/ml en una solución de buffer de carbonatos a un pH de 9.6 (95.2µl en 40 ml de buffer), a una concentración de 1µl/pozo a una temperatura de 4°C durante 8 hrs. Posterior a esto, se realizó un primer lavado de la placa cuatro repeticiones, con una solución PBS-Tween al 0.3% en un lavador de placas para ELISA marca Labsystem, modelo Wellwash 4, posteriormente se bloqueó con PBS-BSA al 1%-Tween al 0.3% cantidad/pozo 200µl, se incubó por 1 hora a una temperatura de 37°C. Se realizó un segundo lavado de la placa cuatro repeticiones con solución PBS-Tween al 0.3%, se agregó el suero problema de cerdo a una dilución optimizada 1:100 en PBS-BSA al 1%-Tween al 0.3% cantidad/pozo 100µl incubándose a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Se realizó un tercer lavado cuatro repeticiones PBS -Tween al 0.3%, después se adicionó el conjugado Anti-IgG total de Cerdo-HRP a una cantidad/pozo 100µl, posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos; se realizó un cuarto lavado de la placa cuatro repeticiones con solución PBS -Tween al 0.3%, se agregó el sustrato a una cantidad/pozo de 100µl a una temperatura de 4°C, se

esperó un tiempo máximo de 10 minutos para observar la reacción, posteriormente se realizó una lectura con el lector de placas para ELISA con filtros para leer densidad óptica a 450 nm y 650 nm. marca Device molecular modelo versa max microplate reader.

6. Realización de la prueba de ELISA para la detección de antígeno HP10 en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR)

Se sensibilizó la placa con un anticuerpo monoclonal Anti-HP10 a 5mg/ml en un buffer de boratos a un pH de 8.2 (20µl de anticuerpos en 10ml de buffer) a una concentración/pozo 100µl a una temperatura de 4°C durante 8 horas, se realizó un primer lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, en un lavador de placas para ELISA Marca Labssystem, Modelo Wellwash 4, se bloqueó con PBS-BSA al 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 200µl a temperatura ambiente por 1 hora, se realizó un segundo lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó el suero problema, la muestra sin diluir (LCR, suero, etc.) a una cantidad/pozo 100µl, se incubó a 37°C por 30 minutos

Se realizó un tercer lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó un primer conjugado Anticuerpos anti-HP10 biotinilado a una dilución optimizada a 1:4000 en PBS-BSA al 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 100µl, se incubó a una temperatura de 37°C por 1 hora, se realizó un cuarto lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó un segundo conjugado de Streptoavidina-HRP (Peroxidasa) a una dilución optimizada de 1:4000 en PBS-BSA 1%-Tween 0.05% cantidad/pozo 100µl, se incubó a 37°C por 30 minutos; se realizó un quinto lavado de la placa cuatro veces con solución salina al 0.9%-Tween 0.05%, se agregó el sustrato cantidad/pozo 100µl a una temperatura entre 4-37°C por 30

minutos, se realizó la lectura con el lector de placas para ELISA con filtros para leer densidad óptica a 450 nm y 650 nm. marca Device molecular modelo versa max microplate reader.

Estos resultados se correlacionaron con los resultados de la necropsia de los animales (localización, estado y número de parásitos *in situ*).

7. Obtención de los encéfalos.

El sacrificio de los cerdos se realizó 3 meses después de la inoculación mediante técnicas humanitarias³² utilizando electro insensibilización y degüello. Una vez muertos los cerdos, se obtuvo el encéfalo incidiendo la cavidad craneana y la médula espinal realizando un corte sagital sobre las vertebrae de la columna vertebral, se realizó la inspección macroscópica de los mismos con la finalidad de observar la localización, el estado y el número de parásitos *in situ*.

8. Análisis estadístico.

Se realizó la prueba de Mann Whitney para evaluar las posibles diferencias entre las variables: anticuerpos (P1: comparación Ac) y antígeno (P2: comparación Ag) en los tiempos durante todo el experimento.

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con la finalidad de establecer diferencias significativas entre las muestras.

Se realizó una correlación (Spearman) para establecer la interdependencia entre la variable tiempo y la variable anticuerpos y antígeno HP10.

RESULTADOS

I- Grupo 1: vía intraventricular (i.v.)

Cinco animales fueron inoculados por vía i.v., 3 con cantidad baja de oncosferas y dos con cantidad alta de oncosferas (Tabla 2).

Cuadro 2. Cerdos inoculados por vía intraventricular (grupo 1).

CERDO #	TIEMPO DE INFECCION (DIAS)	NUMERO DE ONCOSFERAS INOCULADAS	SEXO
89	119	100-150	Hembra
91	122	1000-1500	Hembra
94	101	1000-1500	Hembra
99	102	100-150	Macho
100	102	100-150	Macho
PROMEDIO	109.2		

I a- Cantidad baja de oncosferas Cerdos núm. 89, 99 y 100

El cerdo #89 fue inoculado con una cantidad baja (100-150) de oncosferas. Los anticuerpos en suero tuvieron un incremento casi constante (regresión lineal significativa con un R^2 : 0.75, $P=0.001$). Fueron positivos a partir de los días 70, 84, 98 y 119 post-infección p.i. (fig.1). Al contrario, el antígeno HP10 no se observó incremento (fig.2) y no se encontró en el LCR incremento de anticuerpos ni antígeno. En la necropsia, macroscópicamente no se encontraron lesiones sugerentes de desarrollo de metacestodos en el encéfalo y la médula espinal, microscópicamente tampoco se encontró desarrollo de metacestodos.

Figura 1. Cerdo #89, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

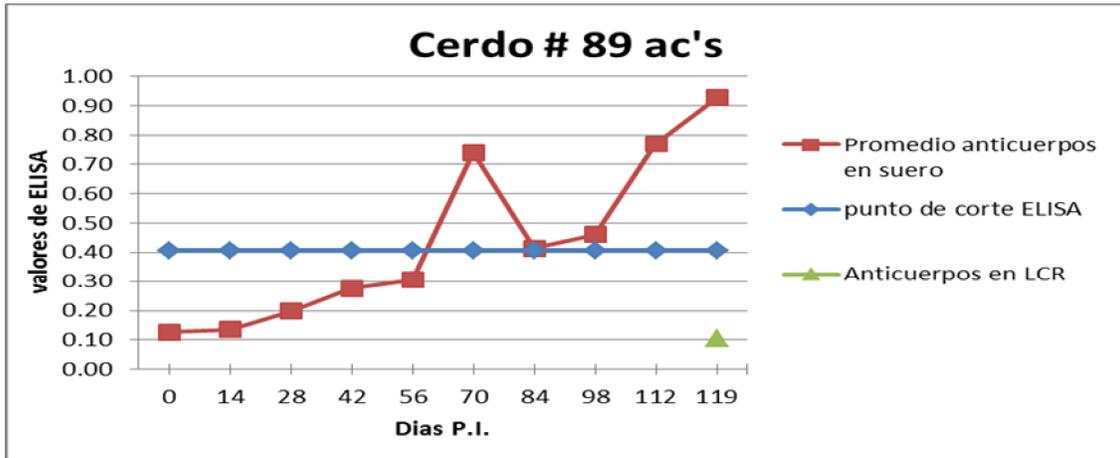
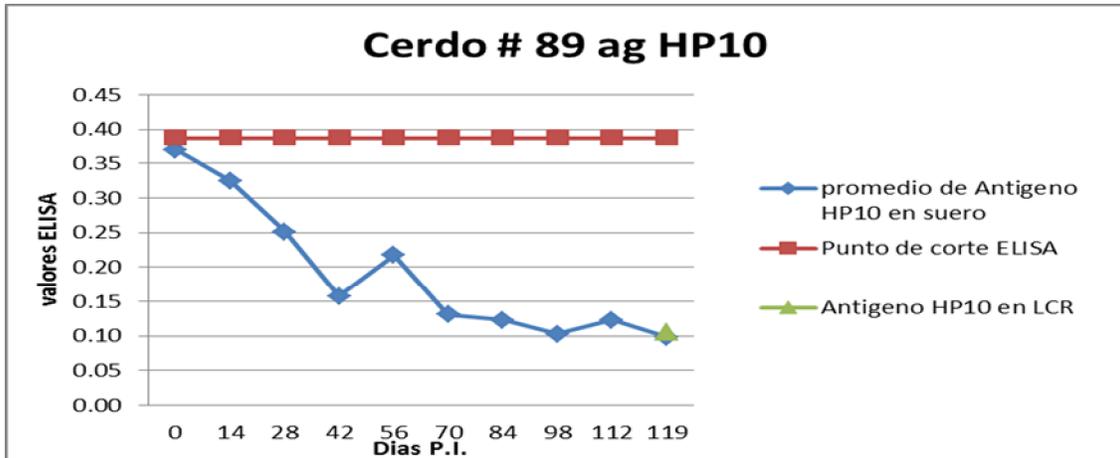


Figura 2. Cerdo #89, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #99 fue inoculado con una cantidad baja de oncosferas (100-150). Como se observa en las gráficas (fig. 3 y fig.4) aunque los anticuerpos tuvieron un incremento durante las 5 primeras muestras (56 días p.i.), no alcanzaron resultado positivo, el antígeno HP10 se mantuvo negativo durante todas las observaciones. En LCR no hubo incremento de anticuerpos ni de antígeno. En la necropsia, no se encontró desarrollo de metacestodos.

Figura 3. Cerdo#99, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

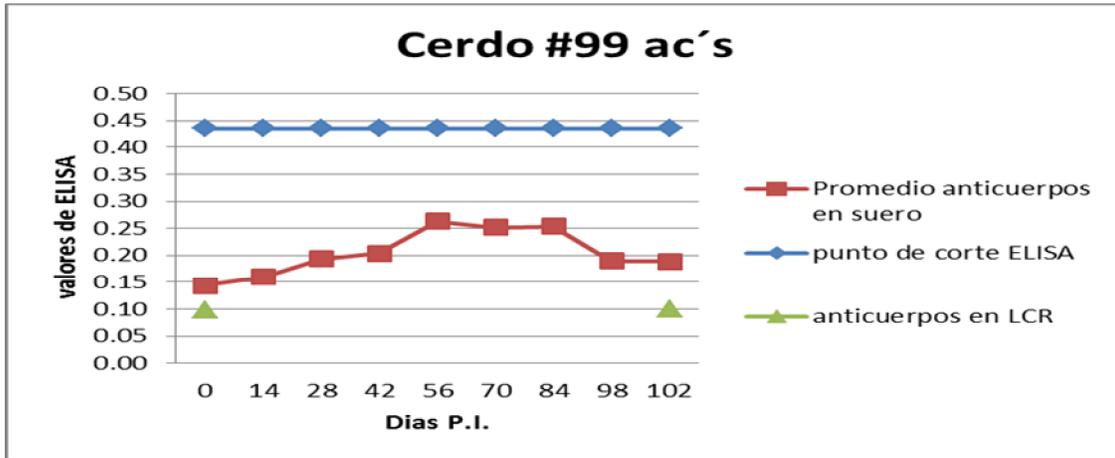
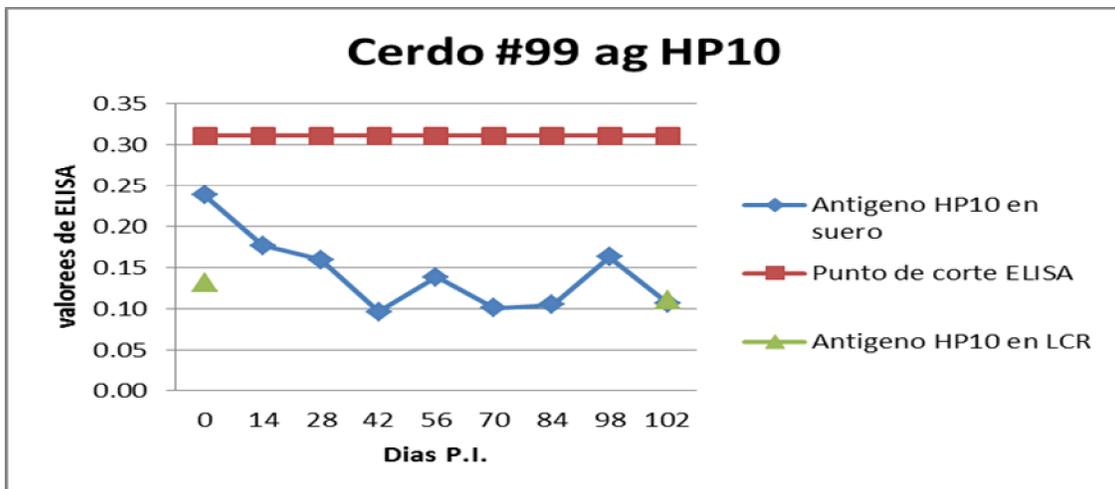


Figura 4. Cerdo#99, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #100 fue inoculado con una cantidad baja de oncosferas (100-150). Como se observa en la gráfica (fig. 5), hubo un aumento constante a partir del día 56 p.i. de los anticuerpos en suero siendo positivos en las 4 últimas muestras (70, 84, 98 y 102 días p.i.). Realizando una regresión lineal, el aumento es significativo ($R^2=0.76$; $P= 0.001$). El antígeno HP10 aumentó en la última muestra en suero (102 días p.i.) con un resultado positivo (fig.6). En el LCR los anticuerpos no aumentaron, mientras que el antígeno

aumentó de manera importante alcanzando resultado positivo (102 días p.i.). En la necropsia no se encontró desarrollo de metacestodos en encéfalo y medula espinal.

Figura 5. Cerdo #100, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

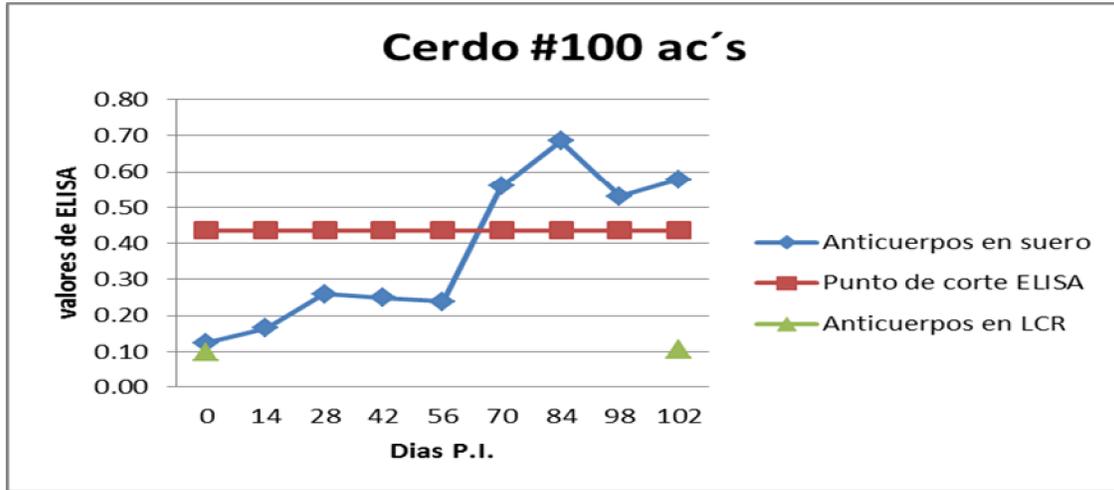
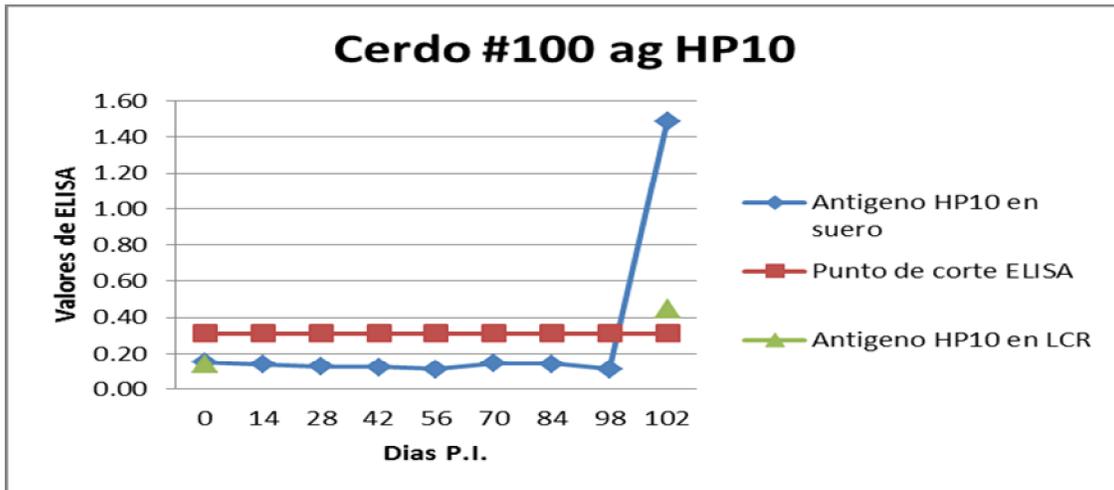


Figura 6. Cerdo #100, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



I b-Cantidad alta de oncosferas. Cerdos núm. 91 y 94

El cerdo #91 fue inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). El título de anticuerpos en suero aumentó rápidamente desde la cuarta muestra (42 días p.i.) pero bajó después de la séptima muestra (84 días después de la infección). Sin embargo, los títulos se consideraron positivos de la quinta hasta la novena medición (fig.7). El antígeno HP10 en el suero no mostró cambios (fig.8). Los anticuerpos y el mismo antígeno HP10 en el LCR no mostraron cambios comparados con la muestra de referencia (fig.7 y fig.8). En la revisión macroscópica del encéfalo se constató la presencia de una estructura vesicular compatible con un metacestodo (fig. 9 y fig. 10) y se corroboró al estudio microscópico (fig. 11 y fig. 12). El metacestodo se localizó en el parénquima del hemisferio izquierdo por debajo del sitio de inoculación y en estado vesicular, a la revisión microscópica presentó una respuesta inflamatoria entre un grado 0 y un grado 2 en la clasificación de Aluja y Vargas³⁹ (Fig. 12).

Figura 7. Cerdo #91, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

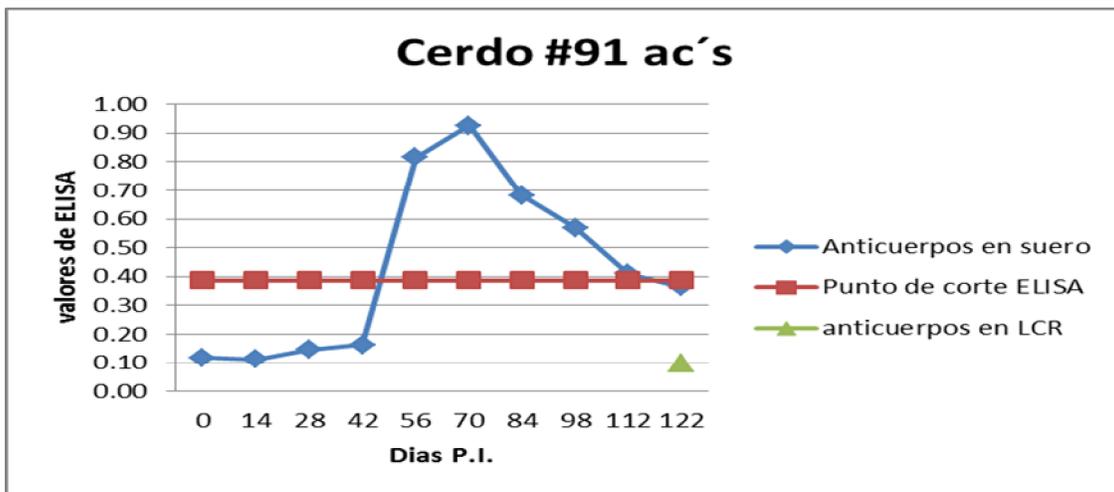


Figura 8. Cerdo #91, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

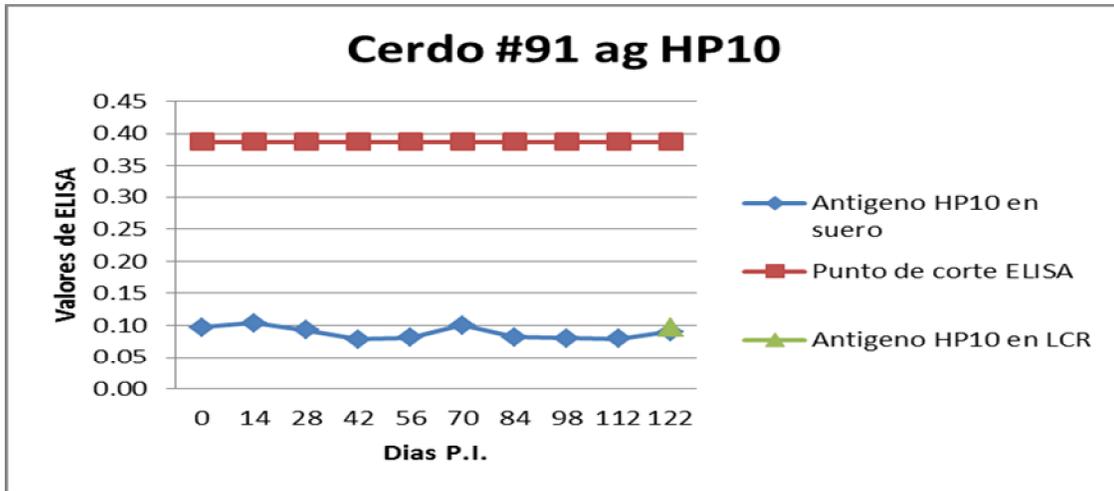


Figura 9. Cerdo #91. Se observa un metacestodo parenquimatoso en estado vesicular en el giro cruciado de aproximadamente 0.3 a 0.4 cm de diámetro cercano al sitio de inoculación (Flecha).

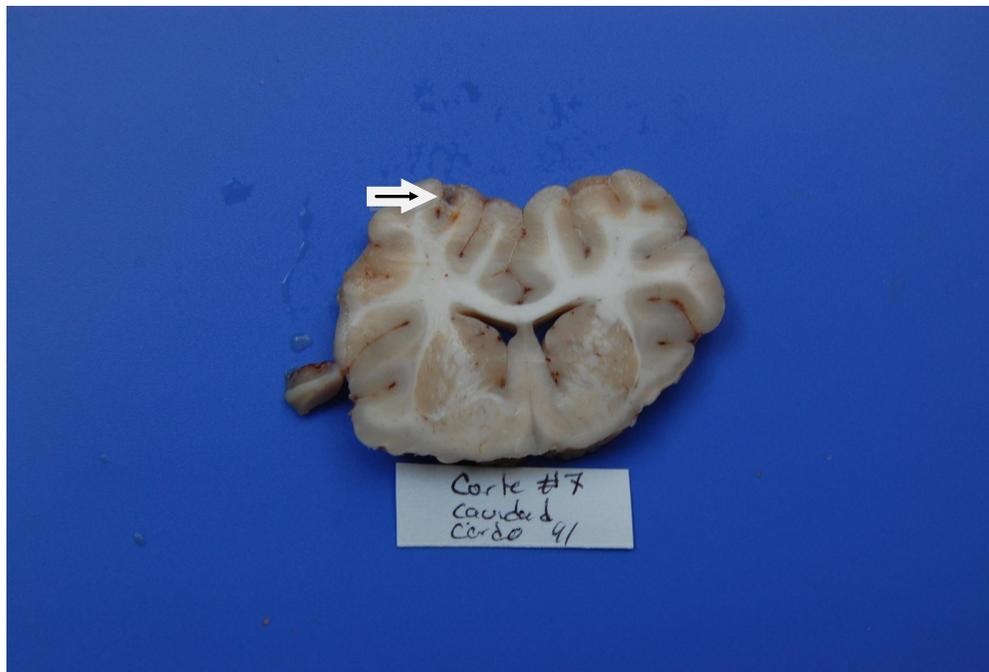


Figura 10. Cerdo #91. Se observa un metacestodo en estado vesicular localizado en el parénquima cerebral. Al centro de la imagen se aprecia la larva de color blanquecino dentro de la vesícula rodeada de fluido y recubierta por una membrana de aspecto hialino.



Figura 11. Cerdo #91. Corte histológico de un metacestodo en estadio vesicular localizado en el parénquima cerebral del hemisferio izquierdo de aproximadamente 0.3 a 0.4 cm de diámetro cercano al sitio de inoculación. Técnica H/E.10X

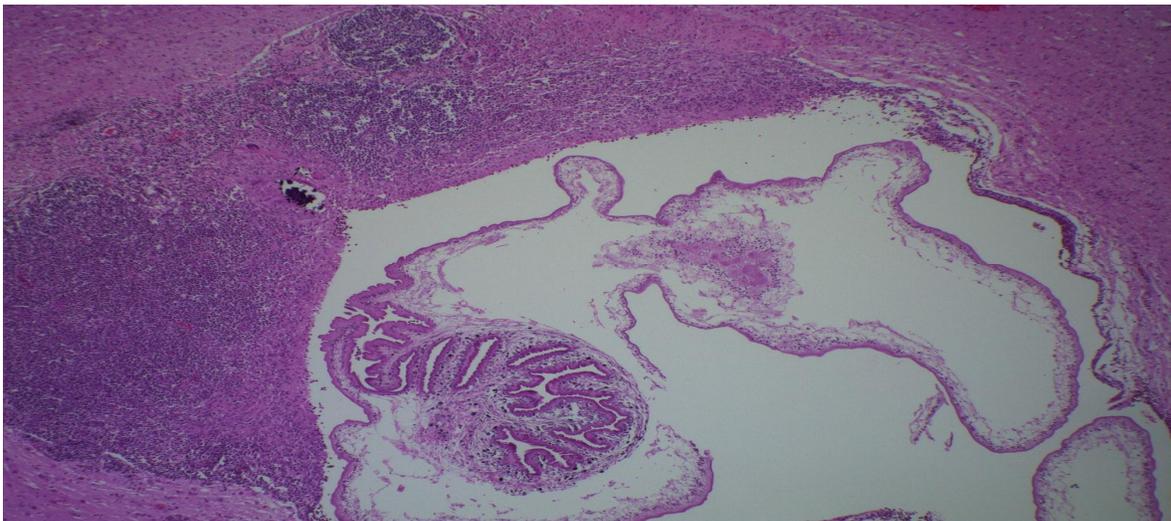
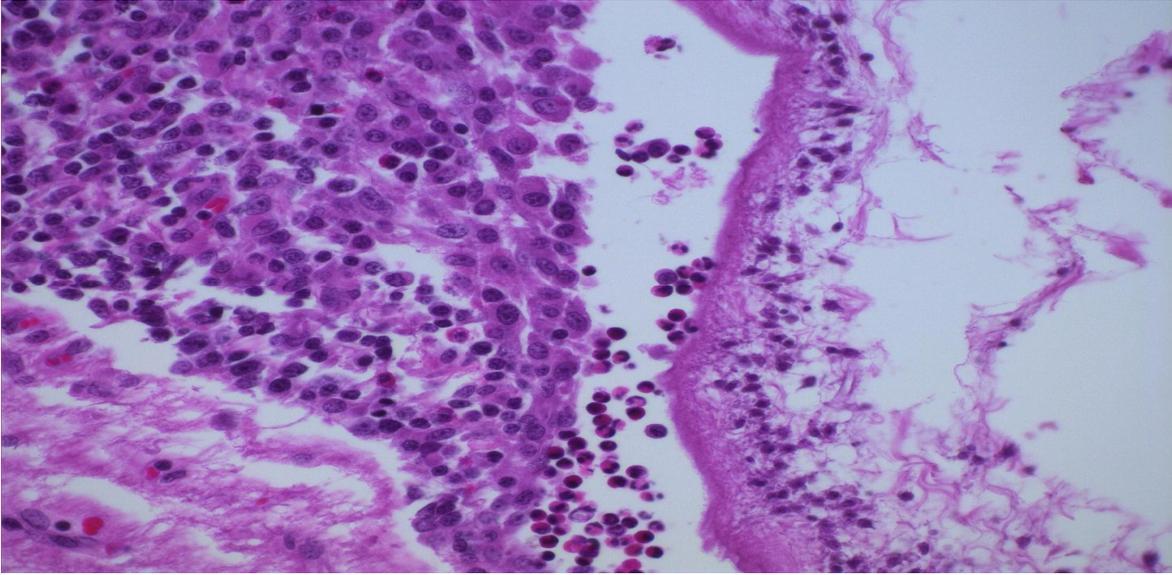


Figura 12. Cerdo #91. Corte histológico donde se muestra la respuesta inflamatoria caracterizada por eosinofilos y linfocitos rodeando al parásito. Técnica H/E.40X



El cerdo #94 fue inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). En este cerdo, los anticuerpos tanto en suero como en LCR no aumentaron (fig.13); sin embargo, presentó título de antígeno positivo en suero en las tomas 2, 3 y 5 (14, 28 y 56 días p.i.) y en LCR en la segunda muestra (101 días p.i.)(fig.14). Al examen macroscópico se observó una estructura con localización subaracnoidea por arriba de la cisura longitudinal siendo probablemente un cisticerco. Esta estructura se localizó en el lóbulo parietal del hemisferio izquierdo (fig. 15 y fig. 16). Al realizar el corte histológico solo se observa una respuesta inflamatoria caracterizada por eosinofilos y linfocitos alejado del sitio de inoculación (Fig.17).

Figura 13. Cerdo # 94, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

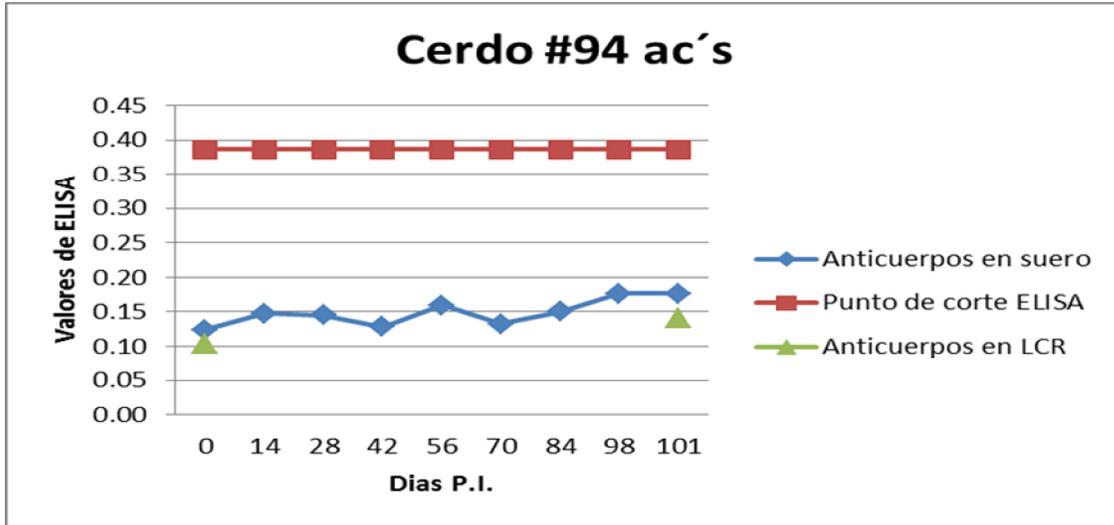


Figura 14. Cerdo # 94, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

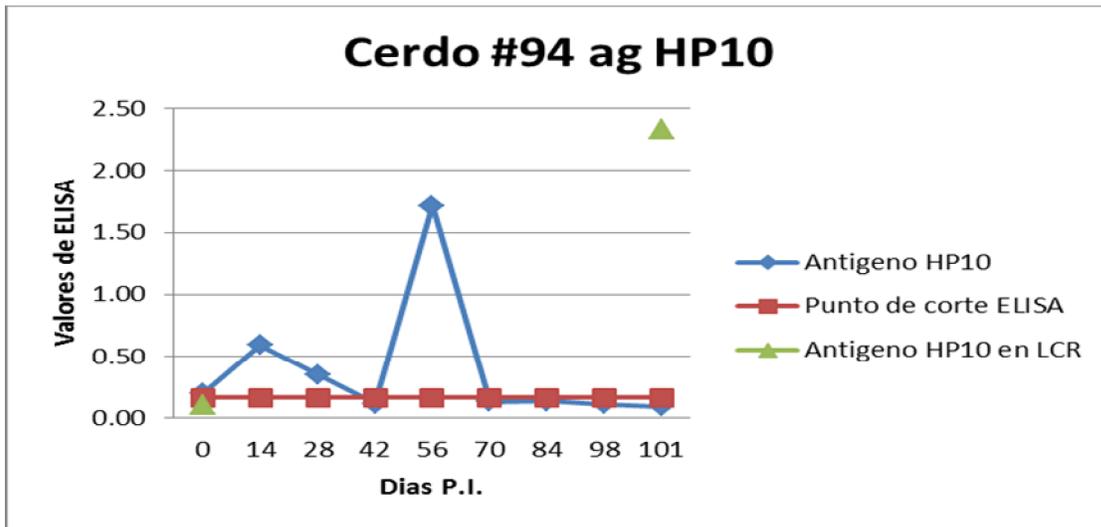


Figura 15 Cerdo #94. Fotografía del encéfalo donde se muestra el sitio de inoculación (punta de flecha) y la estructura vesicular (flecha).

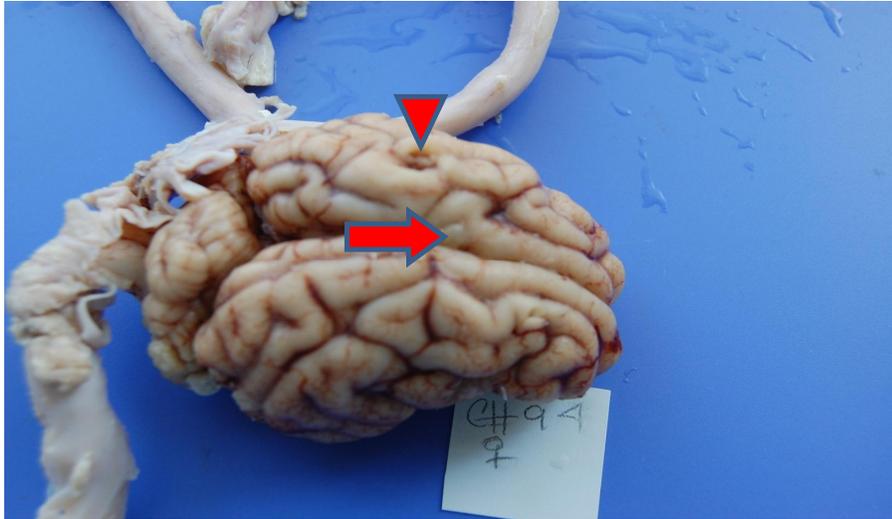


Figura 16. Cerdo #94. Corte histológico de la estructura vesicular rodeada de una reacción inflamatoria severa (eosinófilos y linfocitos). Técnica H/E. 10X

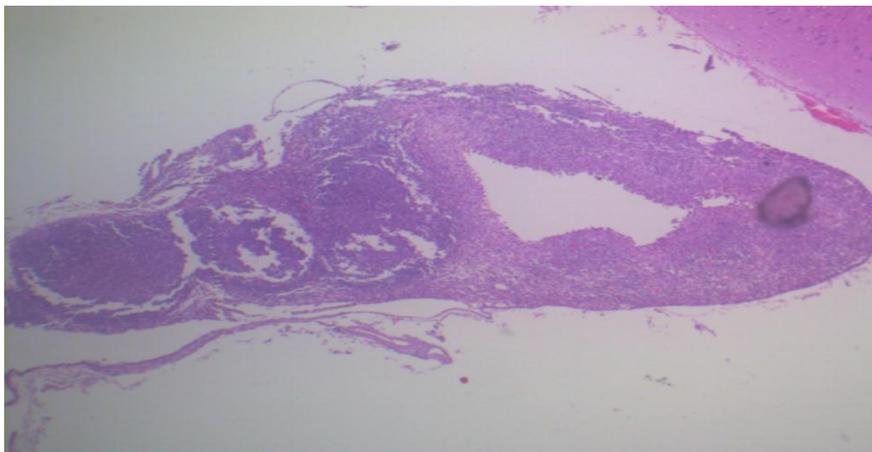
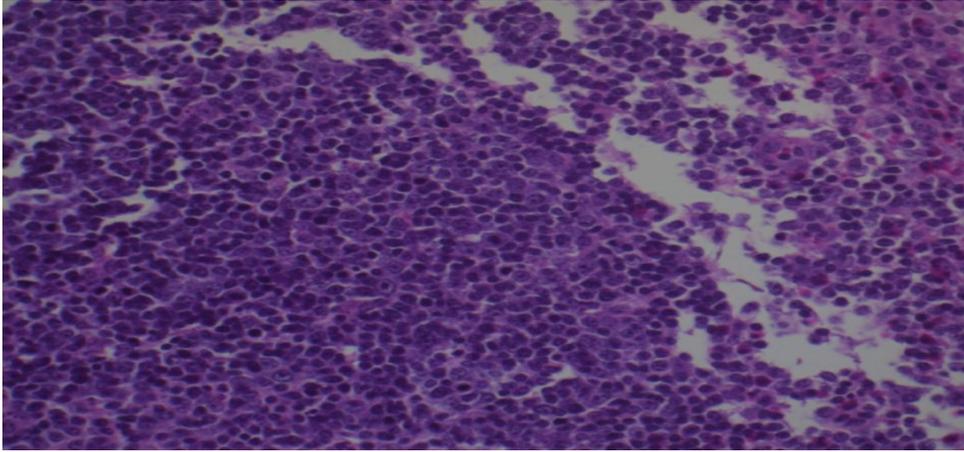


Figura 17. Cerdo #94. Respuesta inflamatoria asociada a la estructura vesicular (eosinófilos y linfocitos). Técnica H/E. 40X



I c-Comparación de los títulos de anticuerpos y antígenos en los cerdos inoculados I.V. con cantidad baja y cantidad alta de oncosferas.

Se realizó un análisis (Prueba de Mann Whitney) para evaluar posibles diferencias en los títulos de anticuerpos y antígenos en función de la cantidad de oncosferas inoculadas en los tiempos durante todo el experimento. No hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los títulos de anticuerpos y antígenos entre dosis bajas y dosis altas de oncosferas.

Tiempos del estudio	Cantidad alta de oncosferas, N= 2		Cantidad baja de oncosferas, N=3		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
14	0.13±0.02	0.35±0.34	0.15±0.02	0.21±0.1	0.4	1

28	0.14±0.0	0.22±0.18	0.21±0.04	0.18±0.06	0.2	1
42	0.15±0.02	0.097±0.02	0.24±0.03	0.12±0.03	0.2	0.4
56	0.49±0.46	0.89±1.15	0.26±0.02	0.15±0.05	1	1
70	0.53±0.56	0.11±0.02	0.51±0.24	0.12±0.02	1	0.4
84	0.42±0.38	0.10±0.03	0.44±0.22	0.12±0.01	0.8	0.8
98	0.37±0.28	0.09±0.02	0.39±0.17	0.12±0.03	1	0.8
112	0.29±0.16	0.08±0.008	0.47±0.24	0.57±0.79	0.4	0.8

*P1: comparación Ac / *P2: comparación Ag / M: media) / SD: desviación estándar

Se muestra la comparación entre los títulos de anticuerpos y de antígeno en función de la presencia y de la ausencia de metacestodos en los encéfalos, en ambos casos, no hay diferencias significativas (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los títulos de anticuerpos y antígenos en función del éxito de la implantación de los parásitos.

Tiempos del estudio	Presencia de metacestodos en la necropsia N= 2		Ausencia de metacestodos en la necropsia N=3		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
Días						
14	0.129±0.02	0.34±0.34	0.15±0.01	0.21±0.09	0.34	0.68
28	0.14±0.00	0.22±0.18	0.21±0.04	0.17±0.06	0.12	0.79
42	0.14±0.025	0.09±0.02	0.23±0.03	0.12±0.03	0.04	0.36
56	0.48±0.46	0.89±1.15	0.26±0.02	0.15±0.05	0.62	0.53
70	0.52±0.56	0.11±0.02	0.51±0.24	0.12±0.02	0.97	0.65
84	0.41±0.37	0.10±0.03	0.44±0.22	0.12±0.01	0.92	0.60
98	0.37±0.27	0.09±0.02	0.38±0.17	0.12±0.03	0.95	0.36
112	0.29±0.16	0.08±0.00	0.46±0.24	0.57±0.79	0.45	0.47

*P1: comparación Ac / P2: comparación Ag / M: media / SD: desviación estándar

II- Grupo 2: Vía subaracnoidea (s.a.)

Siete animales fueron inoculados por vía subaracnoidea (s.a.), dos con cantidad baja de oncosferas y cinco con cantidad alta de oncosferas (cuadro 3).

Cuadro 3. Cerdos inoculados por vía subaracnoidea (grupo 2).

CERDO	TIEMPO DE INFECCION (DIAS)	NUMERO DE ONCOSFERAS INOCULADAS	SEXO
90	119	1000-1500	Hembra
92	123	100-150	Hembra
93*	27	2000-2500	Macho
95	116	1000-1500	Macho
96	119	1000-1500	Macho
97	105	100-150	Hembra
98	102	1000-1500	Macho
PROMEDIO	101.5		

*Al cerdo #93 se le inocularon 2000-2500 oncosferas, está considerado dentro del grupo de cantidad alta de oncosferas.

II a- Cantidad baja de oncosferas. Cerdos núm. 92 y 97

El cerdo #92 fue inoculado con una cantidad baja de oncosferas (100-150), como se observa en la gráfica (fig.22) el título de anticuerpos en el suero se incrementa a partir de la tercer muestra (28 días p.i.), alcanza valor positivo hasta la octava muestra (98 días p.i.) y se mantiene positivo hasta el día de la necropsia. El antígeno HP10 se mantuvo negativo durante todo el experimento (fig.23). En LCR no hubo incremento de anticuerpos ni de

antígeno. En la necropsia, los resultados macroscópicos y microscópicos fueron negativos, no se encontró desarrollo de metacestodos.

Figura 22. Cerdo #92, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

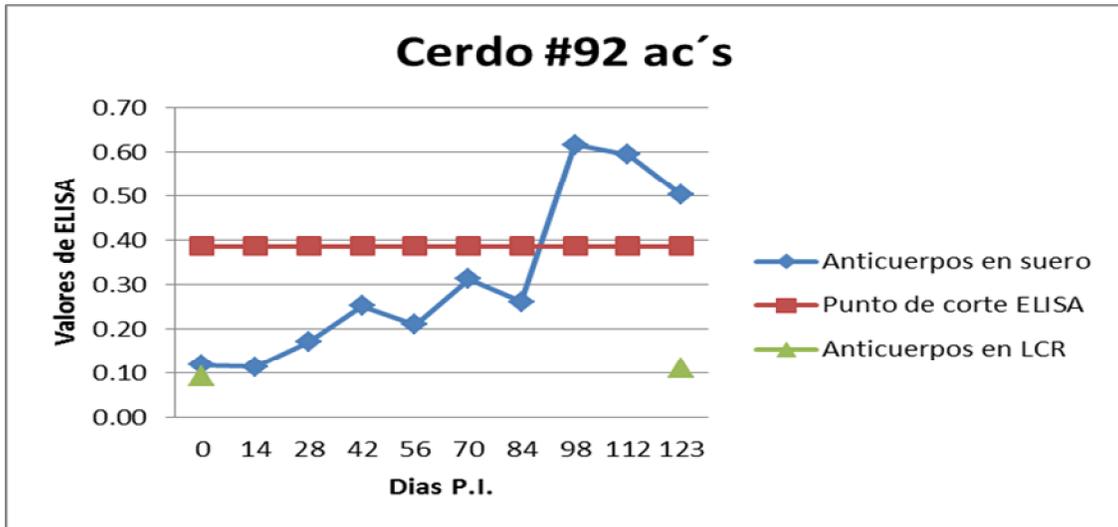
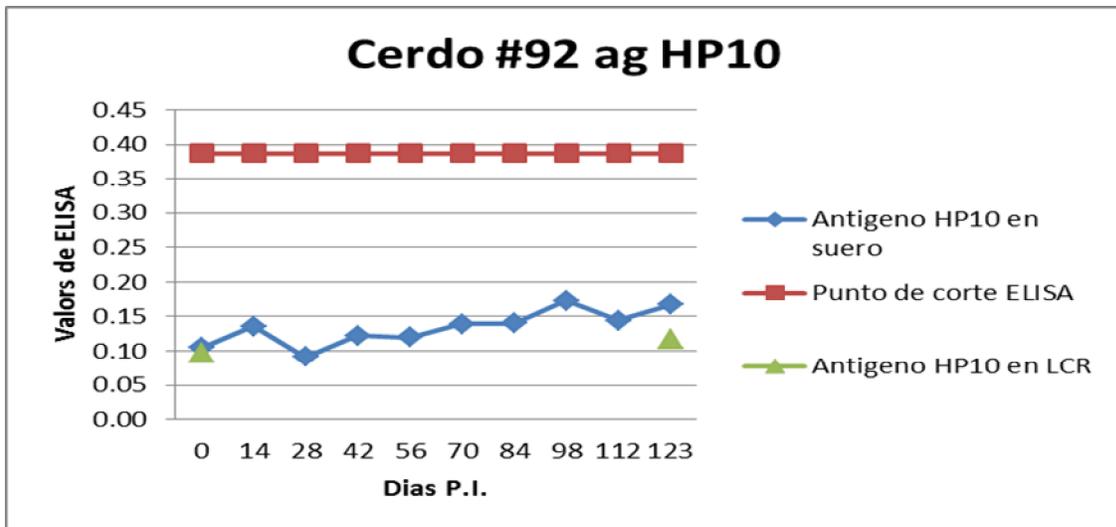


Figura 23. Cerdo #92, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #97 fue inoculado con una cantidad baja de oncosferas (100-150). Como se observa en la gráfica (fig.24) el título de anticuerpos en el suero presentan incremento desde el día 14 p.i. alcanzando un valor positivo hasta la sexta muestra (70 días p.i.), manteniéndose positivo hasta el día de la necropsia (105 días p.i.). El antígeno HP10 en el suero logra resultado positivo en la octava muestra (98 días p.i.) (fig.25). Los Anticuerpos y el antígeno HP10 en el LCR no se incrementaron. Macroscópicamente y microscópicamente, los resultados de la necropsia fueron negativos al desarrollo de metacestodos en el encéfalo.

Figura 24. Cerdo #97, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

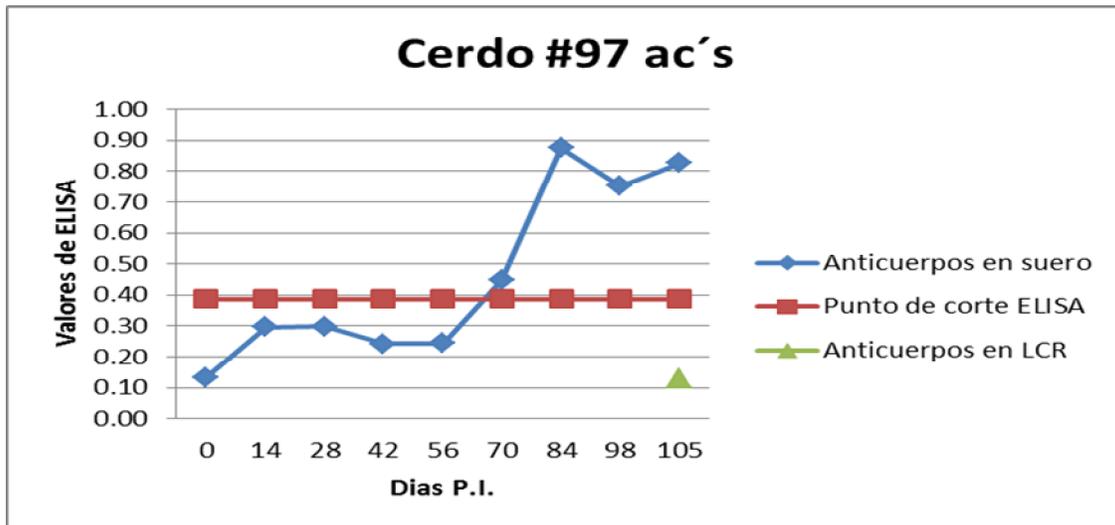
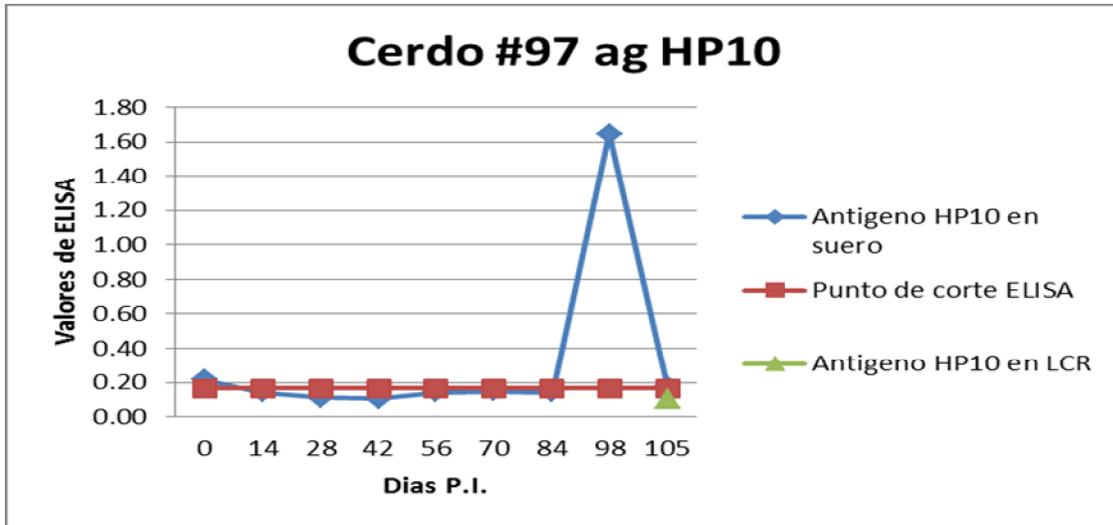


Figura 25. Cerdo #97, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



II b- Cantidad alta de oncosferas. Cerdos núm. 90, 93, 95, 96 y 98.

Al cerdo macho aretado con el #93 se le realizó la eutanasia 27 días después de la inoculación por presentar signología nerviosa (ataxia, convulsiones) a causa de la formación de un absceso por debajo del sitio de la inoculación. Se le inocularon 2000-2500 oncosferas por la vía subaracnoidea. En la inspección macroscópica externa del encéfalo no se observaron quistes parasitarios, sin embargo, en la revisión microscópica de los cortes del encéfalo se observó la presencia de un metacestodo vesicular con localización subaracnoidea (Fig.20 y Fig.21). En los resultados de la serología se mostró un ligero incremento de los niveles de anticuerpos anti-*T. solium* (fig.18). La detección del antígeno HP10 muestra valor positivo en la segunda y tercer muestra (14 y 27 días p.i.), en LCR se mantuvo negativo (fig.19). Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para la

variable anticuerpos (IgG) obteniéndose un nivel de significancia de $p < 0.001$ donde existe diferencia significativa entre las muestras.

Figura 18. Cerdo #93, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

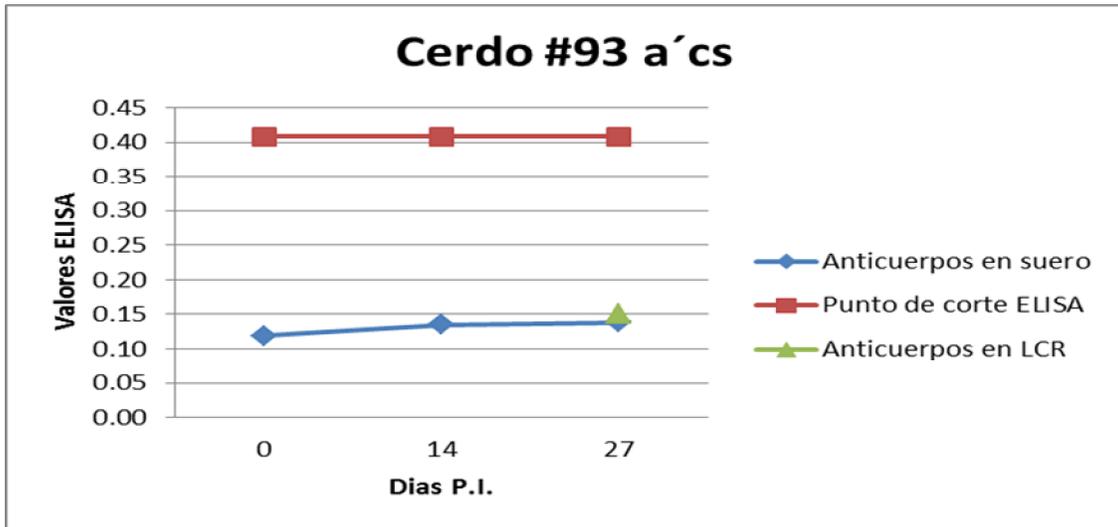


Figura 19. Cerdo #93, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

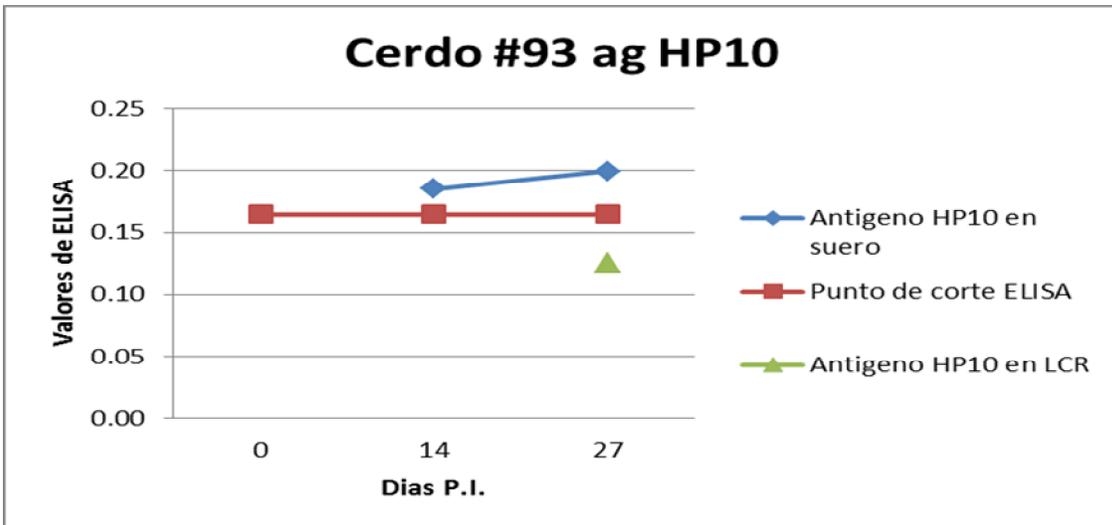
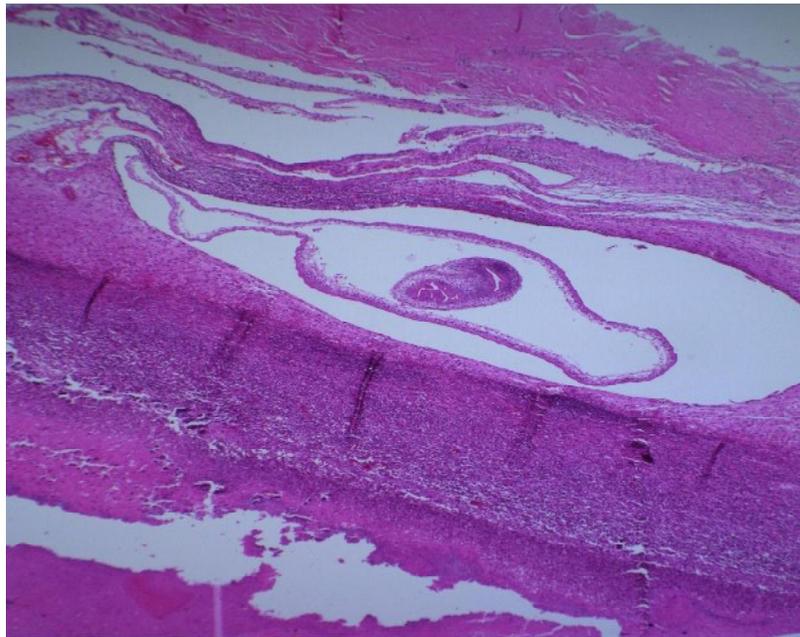


Fig.20 Cerdo #93. Se observa un metacestodo con localización subaracnoidea (flecha) en estado vesicular en el sitio de inoculación por arriba del absceso formado por la infección en el área quirúrgica.



Fig.21. Cerdo #93. Se observa un metacestodo con localización subaracnoidea en estado vesicular. Al centro de la imagen se aprecia la larva rodeada por una reacción inflamatoria masiva. Técnica HE. 10X.



El cerdo #90 fue inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). Como se observa en la gráfica (fig. 26), en este cerdo los anticuerpos en el suero presentan incremento en la novena toma (112 días p.i.) y se mantienen elevados hasta el día de la necropsia (112días p.i.) pero no alcanzan resultados positivos y en LCR los anticuerpos no aumentaron en ninguna de las mediciones, el antígeno HP10 en el suero y en el LCR no tuvo incremento (fig.27). En la necropsia, no se encontró desarrollo de metacestodos.

Figura 26. Cerdo #90, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

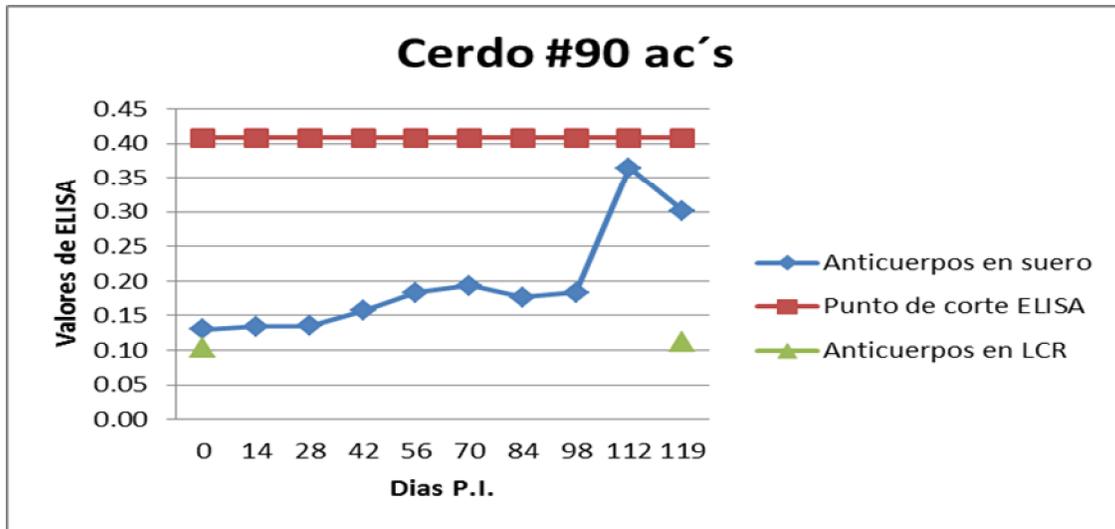
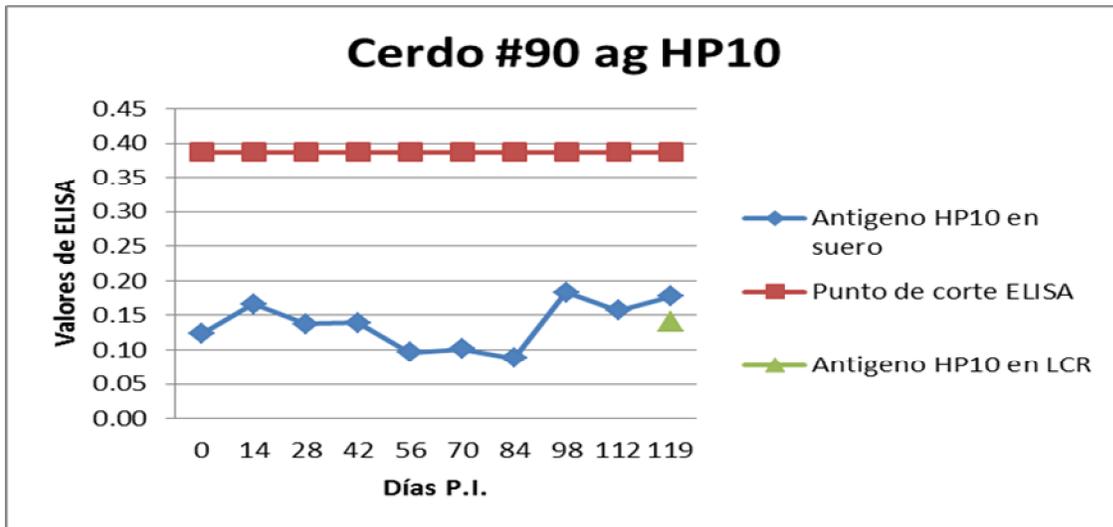


Figura 27. Cerdo #90, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #95 fue inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). Como se puede observar en la gráfica (fig. 28) se presenta un claro incremento de anticuerpos en suero a partir de la cuarta muestra (42 días p.i.), considerándose positivo de la sexta a la novena medición (70 a 112 días p.i.) alcanzando un máximo nivel en la séptima medición (84 días p.i.). Se observa el incremento del antígeno HP10 en la séptima toma (84 días p.i.) alcanzando valor positivo (Fig. 29). Los anticuerpos y el antígeno HP10 en LCR no mostraron incremento. En la necropsia, los resultados macroscópicos y microscópicos fueron negativos, no se encontró desarrollo de metacestodos.

Figura 28. Cerdo #95, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

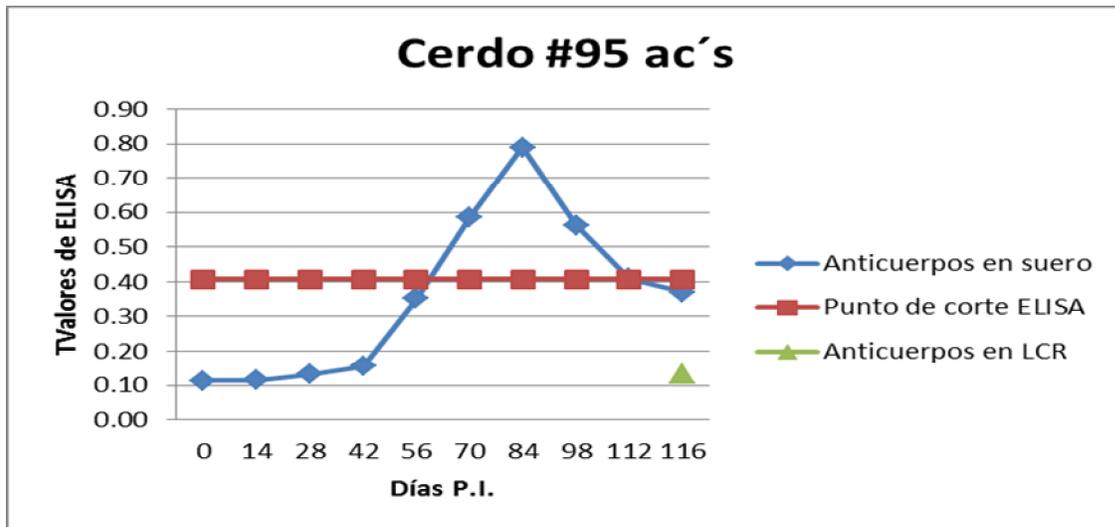
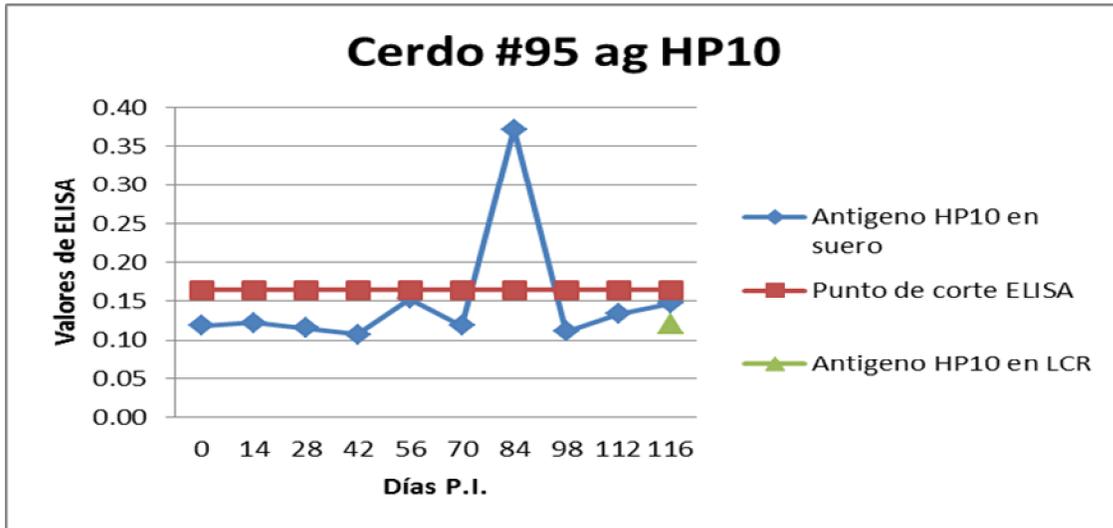


Figura 29. Cerdo #95, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #96 fue inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). En la gráfica (fig. 30) se puede observar incremento en los niveles de anticuerpos en suero desde la tercer muestra (día 28 p.i.), posteriormente alcanza valor positivo en la cuarta muestra (42 días p.i.) para después descender gradualmente y mantenerse casi constante hasta el día de la necropsia (119 días p.i.). El antígeno HP10 (fig. 31) de este cerdo presenta títulos positivos en las muestras tres, cinco, ocho y nueve (días 28, 56, 98 y 112 p.i. respectivamente). Los anticuerpos y el antígeno HP10 en LCR no presentan incrementos. En la necropsia, los resultados macroscópicos y microscópicos no indicaron desarrollo de metacestodos.

Figura 30. Cerdo #96, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

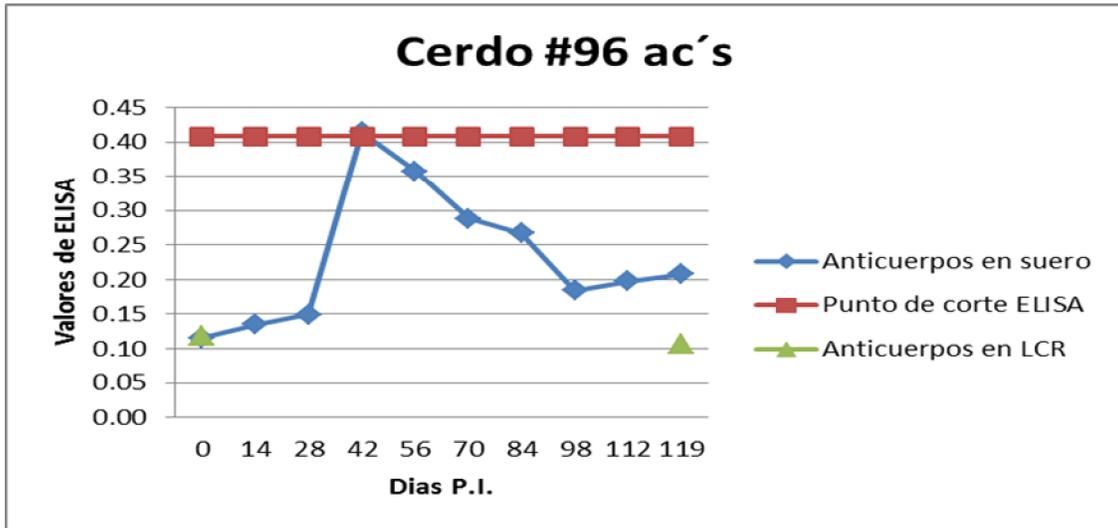
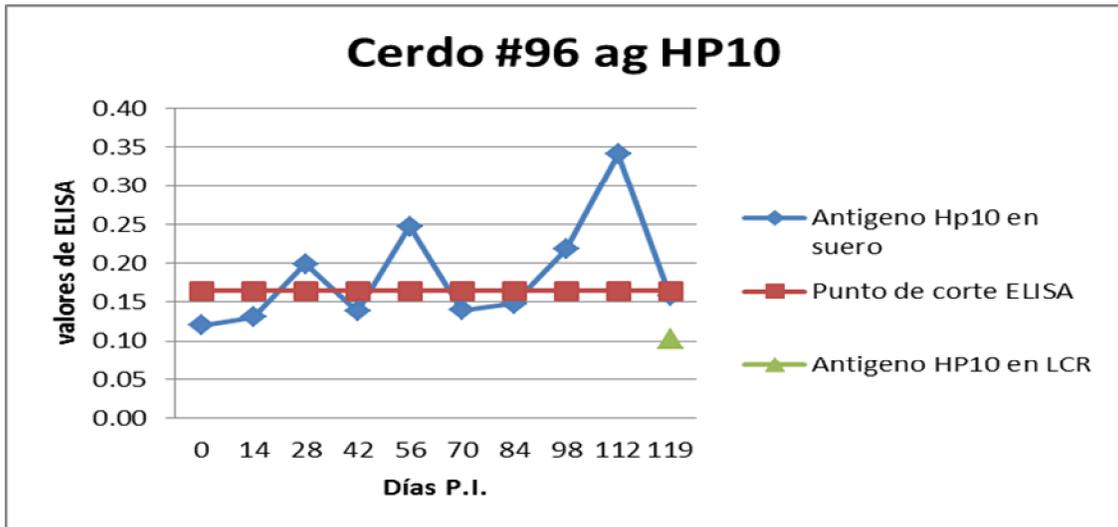


Figura 31. Cerdo #96, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



El cerdo #98 fué inoculado con una cantidad alta de oncosferas (1000-1500). Las gráficas (fig. 32 y fig. 33) muestran un claro incremento en los niveles de acø y de antígeno HP10 en suero desde la segunda toma (día 14 p.i.), la curva de anticuerpos disminuye posterior a la cuarta toma (42 días p.i.) para mantenerse estable hasta la última muestra (102 días). El

antígeno HP10 muestra un comportamiento similar hasta llegar al mismo valor que en la primera muestra. A la revisión macroscópica del encéfalo no se encontró ninguna lesión sugerente de desarrollo de metacestodos. Microscópicamente al revisar los cortes teñidos con hematoxilina/eosina (HE), no se encontró ninguna lesión sugerente al desarrollo de metacestodos de *T. solium*

Figura 32. Cerdo #98, anticuerpos en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.

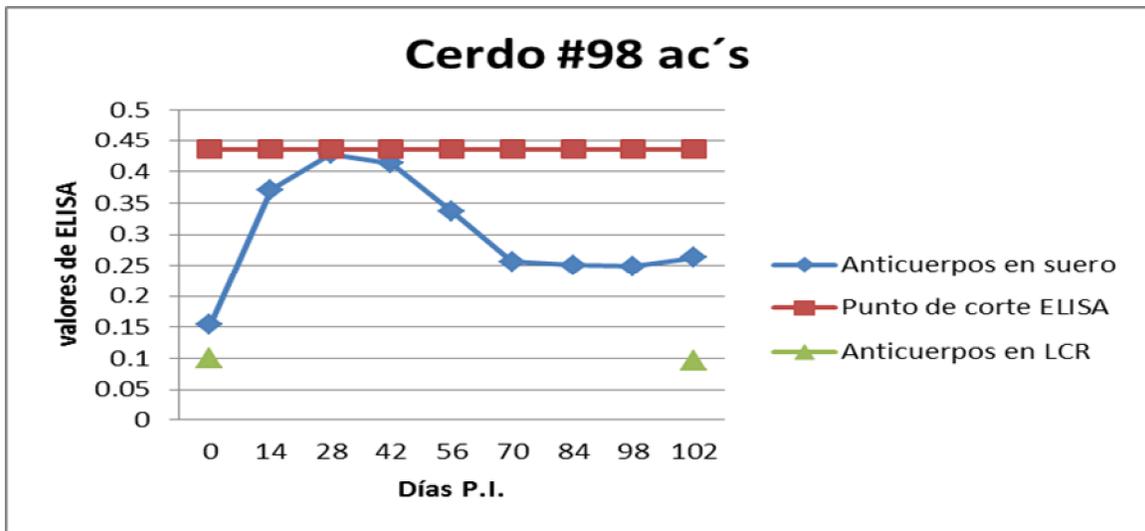
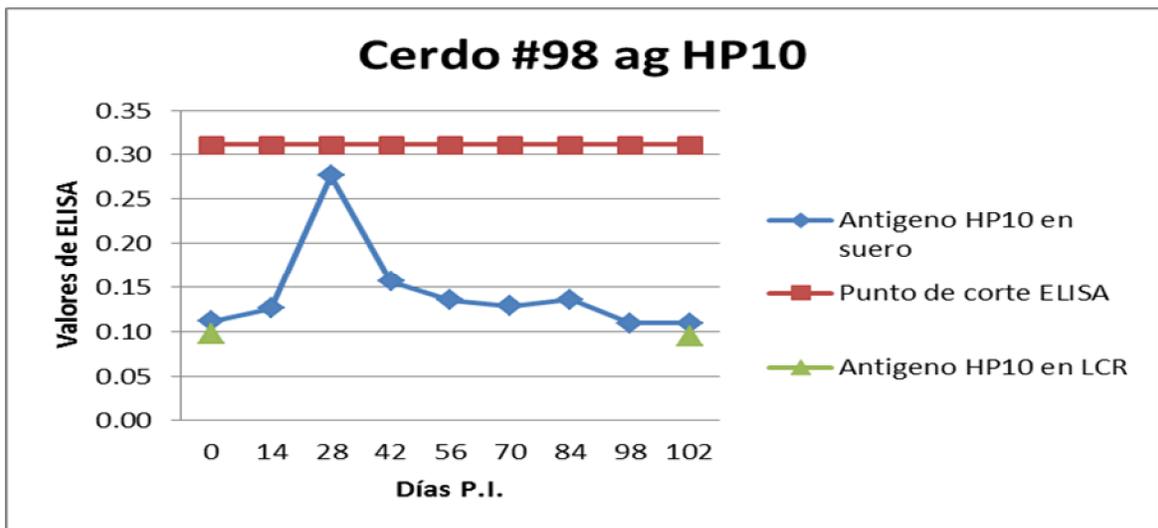


Figura 33. Cerdo #98, antígeno HP10 en suero y LCR a diferentes tiempos durante todo el experimento.



En la tabla 3, se muestra la comparación entre los títulos de anticuerpos y de antígeno HP10 en los cerdos inoculados vía subaracnoidea con cantidad baja y cantidad alta de oncosferas, en ambos casos no hubo diferencias significativas. El cerdo #93 no está contemplado.

Tabla 3. Comparación de los títulos de anticuerpos y antígenos en los cerdos inoculados SA con cantidad baja y cantidad alta de oncosferas. El cerdo #93 no esta contemplado.

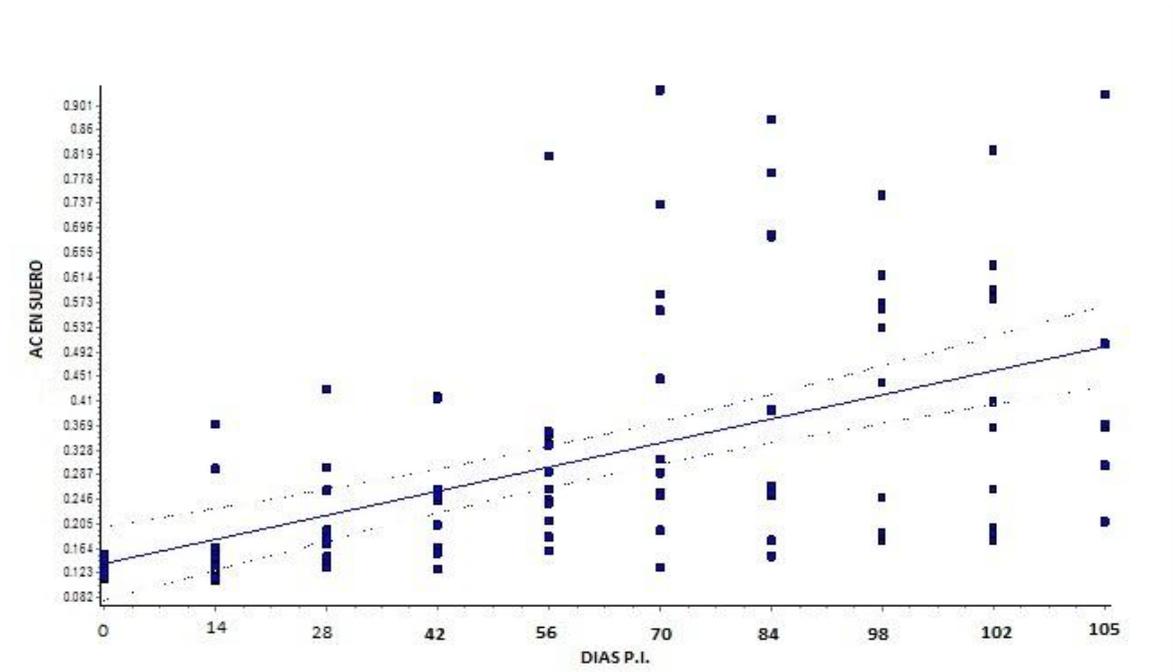
Tiempos del estudio	Cantidad alta, N= 4		Cantidad baja, N=2		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
14	0.18±0.11	0.15±0.03	0.20±0.13	0.14±0.00	1	0.86
28	0.20±0.13	0.18±0.07	0.23±0.09	0.10±0.01	0.38	0.09
42	0.28±0.15	0.13±0.02	0.25±0.00	0.11±0.01	1	0.27
56	0.31±0.08	0.16±0.06	0.23±0.02	0.13±0.01	0.53	0.8
70	0.33±0.17	0.12±0.01	0.37±0.09	0.14±0.00	0.53	0.27
84	0.37±0.28	0.18±0.12	0.56±0.43	0.14±0.00	0.53	1
98	0.29±0.18	0.15±0.05	0.68±0.09	0.91±1.04	0.13	0.53
101	0.30±0.09	0.18±0.10	0.71±0.16	0.16±0.02	0.13	0.8

*P1: comparación Ac / P2: comparación Ag / M: media / SD: desviación estándar

III- Evolución en el tiempo del título de anticuerpos en suero de todos los animales.

El título de anticuerpos aumentó de manera significativa en los diferentes tiempos del estudio (fig. 34). Tomando en cuenta las 108 muestras y realizando una correlación (Spearman), el coeficiente de correlación R fue de 0.538 y la significancia $P < 0.0001$.

Figura 34. Evolución en el tiempo del título de anticuerpos en suero, se incluyen todos los promedios de los 12 animales.



IV- Evolución con el tiempo del título de antígeno en suero, todos los animales del experimento.

El título de antígeno no mostró ningún cambio significativo entre los diferentes tiempos del estudio. Tomando en cuenta las 108 muestras y realizando una correlación (Spearman), el coeficiente de correlación R fue de 0.06 y la significancia $P= 0.51$.

Se compararon los títulos de anticuerpos y de antígeno HP10 entre los animales inoculados por vía s.a. e i.v. (Tab. 4), en ambos casos, no se encontró diferencia significativa entre los grupos.

Tabla 4. Comparación de los títulos de Ac y Ag entre los animales inoculados en s.a. e i.v.

Tiempos del estudio	Implantación SA N= 6		Implantación IV N= 5		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
14	0.13±0.01	0.13±0.04	0.13±0.01	0.21±0.10	0.64	0.25
28	0.19±0.10	0.14±0.02	0.14±0.02	0.27±0.20	1	0.34
42	0.21±0.11	0.16±0.07	0.18±0.05	0.19±0.10	0.64	0.64
56	0.27±0.12	0.13±0.02	0.20±0.05	0.11±0.03	0.54	0.54
70	0.28±0.08	0.15±0.05	0.35±0.26	0.45±0.70	0.93	1
84	0.35±0.14	0.13±0.01	0.52±0.33	0.12±0.02	0.66	0.54
98	0.44±0.31	0.17±0.10	0.43±0.24	0.12±0.02	0.93	0.08
102	0.42±0.25	0.41±0.60	0.38±0.18	0.11±0.03	0.66	0.08
105	0.44±0.23	0.18±0.08	0.40±0.21	0.37±0.62	0.66	0.18

*P1: comparación Ac / P2: comparación Ag / M: media / SD: desviación estándar

Se compararon los títulos de anticuerpos y de antígeno HP10 entre macho y hembras (Tab.5), en ambos casos no se encontró diferencia significativa.

Tabla 5. Comparación de los títulos de ac y ag HP10 entre los machos y hembras s.a. o i.v.

Tiempos del estudio	Hembras N= 6		Machos N=6		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
14	0.13±0.006	0.18±0.10	0.13±0.02	0.15±0.05	1	0.93
28	0.15±0.07	0.24±0.19	0.18±0.09	0.15±0.03	0.31	0.48
42	0.18±0.06	0.17±0.11	0.22±0.11	0.18±0.06	0.82	0.48
56	0.20±0.05	0.12±0.03	0.29±0.12	0.12±0.02	0.43	0.93

70	0.32±0.25	0.39±0.65	0.31±0.05	0.16±0.05	0.25	0.79
84	0.46±0.31	0.12±0.02	0.39±0.17	0.13±0.02	0.93	1
98	0.42±0.29	0.12±0.03	0.45±0.26	0.18±0.11	0.79	0.25
102	0.45±0.23	0.38±0.62	0.34±0.18	0.14±0.04	0.66	0.93
105	0.50±0.23	0.13±0.03	0.33±0.16	0.43±0.59	0.33	0.54

*P1: comparación Ac / P2: comparación Ag / M: media / SD: desviación estándar

Se compararon los títulos de anticuerpos y de antígeno HP10 entre cantidad alta y cantidad baja de oncosferas inoculadas (Tab.6), en ambos casos no se encontró diferencia significativa.

Tabla 6. Comparación de los títulos de Ac y Ag entre los animales inoculados con dosis altas o bajas.

Tiempos del estudio	Dosis altas N= 6		Dosis bajas N=5		P1*	P2*
	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)	Anticuerpos (M, SD)	HP10 (M, SD)		
14	0.12±0.01	0.12±0.03	0.12±0.01	0.21±0.10	0.34	0.13
28	0.16±0.09	0.20±0.18	0.17±0.07	0.18±0.08	0.53	0.43
42	0.18±0.11	0.19±0.10	0.22±0.05	0.14±0.06	0.048	0.34
56	0.23±0.13	0.12±0.02	0.24±0.02	0.12±0.02	0.43	0.93
70	0.36±0.23	0.40±0.64	0.24±0.02	0.14±0.04	0.43	0.93
84	0.39±0.30	0.12±0.01	0.46±0.19	0.13±0.01	0.54	0.18
98	0.38±0.27	0.16±0.10	0.49±0.27	0.13±0.01	0.33	0.93
102	0.32±0.19	0.13±0.05	0.50±0.21	0.43±0.67	0.18	0.66
105	0.30±0.10	0.15±0.09	0.56±0.23	0.40±0.60	0.08	0.43

*P1: comparación Ac / P2: comparación Ag / M: media / SD: desviación estándar

V- Tabla recapitulativa

Tabla 7. Se muestran los resultados de todos los cerdos al momento de la necropsia.

# cerdo	Vía de inoculación	Cantidad de oncosferas	Anticuerpos en suero	Anticuerpos en LCR	Antígeno en suero	Antígeno en LCR	Cisticercos
89	i.v.	100-150	+	-	-	-	-
90	s.a.	1000-1500	-	-	-	-	-
91*	i.v.	1000-1500	+	-	-	-	+
92	s.a.	100-150	+	-	-	-	-
93*	s.a.	2000-2500	-	-	+	-	+
94*	i.v.	1000-1500	-	-	+	+	+
95	s.a.	1000-1500	+	-	+	-	-
96	s.a.	1000-1500	+	-	+	-	-
97	s.a.	100-150	+	-	+	-	-
98	s.a.	1000-1500	-	-	-	-	-
99	i.v.	100-150	-	-	-	-	-
100	i.v.	100-150	+	-	+	+	-

*Con parásitos vesiculares al momento de la necropsia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De los 12 cerdos inoculados, solamente en tres animales se encontraron metacestodos en estadio vesicular durante la necropsia realizada tres meses después de la inoculación; en dos de ellos y 27 días después de la inoculación en uno. Los tres animales presentaban quistes únicos.

Los anticuerpos en suero mostraron incremento en siete de los animales inoculados (58.33%) comprobando que la inoculación fue exitosa y que el sistema inmune del cerdo reaccionó de manera positiva al parásito. El incremento en los anticuerpos empezó a notarse entre los 28 y 70 días post inoculación (p.i.), lo que concuerda con lo reportado por Sciotto et al, 1998³⁷, que en cerdos con carga parasitaria alta, los anticuerpos y el antígeno parasitario HP10 fueron detectados a partir del día 29 p.i. hasta el día 200 p.i. y en cerdos con carga parasitaria baja tanto el antígeno HP10 como los anticuerpos se presentó entre el día 61 y 97 p.i.³⁷. Los cerdos que resultaron negativos a la medición de anticuerpos en suero fueron: 1) el #90, en este cerdo hay incremento de anticuerpos a partir del día 98 p.i. (fig.26), pero no alcanza valor positivo en comparación con los demás animales, muy probablemente se necesitaba un lapso mayor de tiempo para obtener un valor positivo en la prueba, ya que el antígeno HP10 en suero y en LCR se mantuvo negativo durante todo el experimento; 2) el #93: este cerdo fue eutanasiado a los 27 días de la inoculación y se encontró un parasito vesicular en la revisión microscópica del encéfalo. La negatividad de los ac's se debe probablemente al corto tiempo de infección; 3) el #94 no mostró incremento en los niveles de ac's en suero, en este cerdo se encontró una estructura vesicular con respuesta inflamatoria caracterizada por eosinofilos y linfocitos a su alrededor, la ausencia en el incremento de los anticuerpos séricos pudo deberse a que el

parásito ya no estaba viable. Espinoza et al, 1986³³, reportaron que en pacientes humanos con quistes parasitarios viables se estimula la producción de anticuerpos, particularmente IgG³³, lo que puede explicar la ausencia en la seropositividad del cerdo # 94; 4) en el cerdo # 98: se observa incremento desde los 14 días p.i., pero no alcanza valores positivos, probablemente el sistema inmune de este cerdo reaccionó tempranamente evitando el desarrollo de los parásitos, ya que no se encontraron metacestodos en la necropsia; 5) #99: en este animal cabe dudar del éxito de la inoculación. En efecto, los acø y el ag. HP10 no aumentaron y ningún parásito fue encontrado.

El antígeno HP10 fue positivo en suero en seis de los animales inoculados: #’s 93, 94, 95, 96, 97 y 100 (50 % de seropositividad) los cerdos #95, #96, #97 y #100 sin parásitos al examen macro y microscópico. Así mismo, los animales #93 y #94 durante el examen post-mortem presentaron estructuras parasitarias en estado vesicular con localización subaracnoidea. La prueba de ELISA-HP10 es recomendada como apoyo en el diagnóstico y seguimiento de pacientes humanos con neurocisticercosis en el espacio subaracnoideo y/o sistema ventricular, su costo es bajo y fácil de realizar en comparación con el alto costo de las pruebas de imagen o cuando estas sean inaccesibles²⁸. El cerdo #93 presenta valores positivos del antígeno HP10 en suero, por el contrario resultando negativo en LCR, probablemente por el corto tiempo posterior a la inoculación. El cerdo #94 presentó valores positivos del antígeno HP10 en suero a los 14, 28 y 56 días p.i., en humanos, la presencia del antígeno HP10 ha sido relacionada con la presencia de parásitos viables en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo o en los ventrículos^{26, 27, 28}, lo que puede sugerir la utilidad del ELISA HP10 en suero de cerdos que presentan cisticercos vesiculares con localización subaracnoidea. De los tres parásitos encontrados uno de ellos estaba localizado

en el parénquima lo que puede explicar la negatividad del cerdo #91 a la detección del Ag HP10 en suero y LCR. Los cuatro animales restantes (#95, #96, #97 y #100) que fueron positivos se clasificaron como falsos positivos. Llama la atención que en el cerdo #100 el aumento fue muy drástico, detectado en la última muestra, lo que nos puede hacer pensar en un error de manipulación o de técnica. En el otro animal (# 97), hubo un aumento similar al del cerdo #100 en la penúltima muestra (98 días p.i.) del ag HP10, esto también se puede tomar como un error en la manipulación o en el procesamiento de la muestra, Bobes et al, 2006²⁸, reportan que al no existir parásitos viables, el ag HP10 se encuentra ausente o que este disminuye posterior a la administración del tratamiento cestocida²⁸ corroborando el resultado obtenido en este cerdo.

En el LCR, los anticuerpos no mostraron incremento. Este hecho se podría explicar con que el sistema inmune del cerdo reacciona tardíamente o que el tiempo de infección experimental fue muy corto, aunque fueron inoculados en el espacio subaracnoideo y en los ventrículos, localización normalmente asociada en los humanos con un aumento de anticuerpos en LCR^{26, 28}.

El antígeno HP10 en el LCR resultó positivo en un solo animal (#94) en el cual se encontró una lesión sugerente al desarrollo del parásito, además de una reacción inflamatoria caracterizada por eosinófilos y linfocitos. Este resultado sugiere la necesidad de experimentar con un mayor número de cerdos inoculados por la vía subaracnoidea.

La ausencia de diferencia entre anticuerpos en suero, localización de los parásitos y entre cantidad alta y baja de oncosferas inoculadas es difícil de interpretar, ya que solamente en tres animales la implantación resultó exitosa, Sciutto et al, 1998³⁷ reportaron que los niveles de anticuerpos y antígeno HP10 dependen de la intensidad de la infección, aunque

en su estudio los animales fueron infectados por vía oral y por lo tanto presentaban quistes ubicados en el SNC y musculo esquelético donde la respuesta inmune es más intensa, corroborando que la detección del antígeno HP10 va en función de la cantidad de parásitos viables existentes en el animal.

Al comparar las pruebas serológicas mayormente usadas en el diagnóstico de cisticercosis porcina y neurocisticercosis humana, el inmunotransfer-blot (westernblot), es más sensible que el ELISA²⁵ y en ambas técnicas la sensibilidad se incrementa en los casos con múltiples quistes, lo que puede explicar la baja seropositividad obtenida en el presente estudio (58.33%), dado que los tres animales presentaban quistes únicos.

Aunque el westernblot presenta ventaja de mayor sensibilidad, es más complejo de realizar y su costo es diez veces mayor que el del ELISA, además de que el tiempo de realización es de dos semanas y el del ELISA de 20 horas²⁵.

Durante los tres meses que duró el experimento, solo el cerdo #93 presentó signología nerviosa (ataxia, convulsiones), esta pudo deberse a que en el sitio de la inoculación se formó un absceso que involucró parte del parénquima cerebral y no a la presencia del metacestodo ya que el resto de los animales no presentó ningún tipo de signología.

Al inocular las oncosferas en el sistema ventricular del cerdo, se pretendía que la circulación de LCR las dispersara por todo el sistema ventricular, lo cual no ocurrió al no encontrar en el examen postmortem indicios de presencia del parásito en los ventrículos.

En conclusión, el aumento de anticuerpos se genera tempranamente después de la inoculación y es independiente al éxito de la implantación del parásito rechazando la hipótesis en cuanto a anticuerpos.

La detección de antígeno HP10 por medio de la prueba de ELISA sugiere ser una herramienta diagnóstica en el caso de cisticercos vesiculares con localización subaracnoidea en animales inoculados experimentalmente y con desarrollo exitoso del parásito en el sistema nervioso central.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, no es posible recomendar la metodología empleada para la detección del antígeno HP10 como procedimiento de rutina en la investigación de neurocisticercosis porcina.

Sería necesario realizar un segundo estudio para corroborar la confiabilidad del ELISA HP10 en cerdos, utilizando un mayor número de animales con un grupo control al que solo se someta a la neurocirugía, pero sin inocularlo. Además es recomendable material parasitario más fresco, inocular a la mitad de animales por vía subaracnoidea y la otra por vía intraventricular y extender el tiempo de duración del experimento, de 3 a 6 meses.

REFERENCIAS

1. Larralde C., Padilla A., Hemández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutiérrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepúlveda J., Seroepidemiología de la cisticercosis en México, *Salud Publica México* 1992; 34(2):197-210.
2. Meza-Lucas A, Aguilar R. F, Teniasis humana por *Taenia solium*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2002; 49(2):92-99.
3. Fleury A., Gomez T., Alvarez I., Meza D., Huerta M., Chavarria A., et al, High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of México. *Neuroepidemiology*. 2003; 22:139-145.
4. Secretaría de Salud. Boletín Semanal de Epidemiología, 1994-1996. México, D.F.: Dirección General de Epidemiología, 1996. En Sarti E. La teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, México. *Salud Pública México*. 1997; 39(3):225-231.
5. Román G, La neurocisticercosis: una perspectiva de salud pública. *Rev Neurol*. 2003; 36 (1): 71-74
6. García H. H., González A. E., Evans C. A., Gilman R.H. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 2003; 362: 5476556
7. Aluja A. S. de, Villalobos A.N.M. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. *Veterinaria México*. 2000; 31(003):239-244.
8. Acha P. y Szyfres B. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los animales*. 2ª ed. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C, 1986.
9. Meza-Lucas A, Aguilar R. F, Teniasis humana por *Taenia solium*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2002; 49(2):92-99.
10. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette J P, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infection*. 2000; 2: 1875-1890.
11. Sotelo J, Del Brutto O H. Brain Cysticercosis. *Archives of Medical Research*. 2000; 31: 3-14.
12. Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* Teniasis/Cysticercosis from research towards implementation. *International Journal of Parasitology*, 2005; 35:1221-1232.

13. Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, et al. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2010 4(8):805.
14. Larralde C, Sciutto E. El control de la *Taenia Solium* en México, quinientos años después de su llegada al nuevo mundo. En: Larralde C, Aluja A. S. de, (coords). Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud. Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México DF. 2006:182-230.
15. Willms K, Vargas-Parada M, Laclette J P. Biología del parásito. En: Larralde C, Aluja A. S. de, (coords). Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud. Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México DF. 2006:182-230.
16. Aluja A. S. de. La cisticercosis porcina en México. En: Larralde C, Aluja A. S. de, (coords). Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud. Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México DF. 2006:104 ó132.
17. Copado B F, Aluja A, Mayagoitia L, Galindo F. The behavior of free ranging pigs in the Mexican tropics and its relationships with human faeces consumption. Applied Animal Behavior Science, 2004; 88:243-252.
18. Fleury A., Gomez T., Alvarez I., Meza D., Huerta M., Chavarria A., et al, High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of México. Neuroepidemiology. 2003; 22:139-145.
19. Fleury A., Morales J., Bobes RJ., Dumas M., Yañes O., Piña J., Carrillo-Mezo R., Lloyd C., Martinez J.J., Fragoso G., Dessein A., Larralde C., Sciutto E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. Trans R Soc Top Med Hyg 2006; 100:551-558.
20. Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, et al. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2010 4(8):805.
21. Sarti E. La taeniasis y cisticercosis en México (revisión bibliográfica).Salud Publica Mex 1986; 28:556-563.En Sarti E. La teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, México. Salud Pública México. 1997; 39(3):225-231.

22. Secretaria de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información. Boletín Semanal de epidemiología. 2007; 41(24):1-5.
23. Jiménez-Marcial M.E., Velásquez óPérez L. Morbidity at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía õManuel Velasco Suarezö, 1995-2004. Gaceta Médica Mexicana, 2004; 140(2):155-162.
24. Velásquez óPérez L., Jiménez-Marcial M.E., Hospital mortality at the Manuel Velasco Suarez National Institute of Neurology and Neurosurgery (1995-2001), Gaceta Médica Mexicana 2004; 140(3):289-294.
25. Proaño-Narvaez J. V., Meza-Lucas A., Mata-Ruiz O., García-Jerónimo R. C., Correa D. Laboratory Diagnosis of Human Neurocysticercosis: Double-Blind Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Electroimmunotransfer Blot Assay. J. CLIN. MICROBIOL 2002;6(40):2115-2118.
26. Fleury A, Hernández M, Avila M, Cárdenas G, Bobes RJ, Huerta M, et al. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 2007; 78(9):970-4.
27. Chavarria A, Sciutto E. Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana y porcina. En: Larralde C, Aluja A. S. de, (coords). Cisticercosis. Guía para profesionales de la Salud. Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México DF. 2006:133-166.
28. Bobes R. J, Hernández M, Márquez C, Fragoso G, García E, Parkhouse R. M. E, Harrison L. J. S, Sciutto E, Fleury A. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. TM & IH 2006: 11(6):943-50.
29. Tinoco F.Y, González Z. A, López U. T, Silva I.M. Uso del ELISA de captura de antígeno en el monitoreo de porcinos infectados naturalmente con *Cysticercus cellulosae* y tratados con oxfendazol. Rev Inv Vet Perú 2004; 15 (2):132-140.
30. Santamaría M. E., Plancarte A., Aluja A. S. de. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: Immune response and efficiency of establishment. J. Parasitol. 2002; 88(1):69-73.
31. Wang CI, Ma XY, Kuo KC, Fan CP. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. Int J Parasitol 1997(27):1311-1314.

32. Aluja A. S. de, Constantino F. Técnicas de Necropsias en Animales Domésticos. Manual Moderno, México, 2002.
33. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval M. A, Plancarte A, Flisser A. Characterization by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Humoral Immune Response in Patients with Neurocysticercosis and Its Application in Immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1986; 24(4):536-541.
34. Téllez G. E, Ramos M.C, Dufour L, Montante M. Aplicación del método ELISA para el diagnóstico de la cisticercosis. *Bol of Sanit Panam* 1984 97(1); 8-13.
35. Harrison L. J, Joshua G.W, Wright S.H, Parkhouse R.M, Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1989; 11(4):351-70.
36. Correa M.D, Plancarte A, Sandoval M.A, Rodríguez-del-Rosal E, Meza-Lucas A, Flisser A. Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia.* 1989; (57): 293-299.
37. Sciutto E, Hernández M, García G, Aluja A.S. de, Villalobos A. N. M, Rodarte L. F, Parkhouse R. M, Harrison L. J. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet Parasitol;* 1998(78) 185-194.
38. Sciutto E, Martinez J J, Villalobos A.N.M, Hernández M, José M V, Beltrán C, Rodarte L. F, Flores I, Bobadilla J. R, Fragoso G, Parkhouse M.E, Harrison L. J, Aluja A. S. de, Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol.* 1998; 79(4):299-313.
39. Aluja A, Vargas M G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 1988; 24(4):297-299.
40. Tsang V C, brand J A, Boyer A E. An enzyme-linked immunoelectrotransferblot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 1989; 159(1):50-9.