



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"DETERMINACION DE ANTIGENOS SOLUBLES DE Cysticercus
cellulosae MEDIANTE PRUEBAS DE AGLUTINACION CON
PARTICULAS INERTES"

- TESIS MANCOMUNADA -

Guzmán Bracho María del Carmen
Romero Ramírez Victoria Norma

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1980

M-21690



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Dr. Dionisio Peláez
VOCAL	QFB Magdalena Acosta S.
SECRETARIO	Dr. Oscar Velasco C.
1er SUPLENTE	Dr. Salvador Martín S.
2o. SUPLENTE	QFB Ramón Méndez L.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Immunoparasitología del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

NOMBRE DE LAS SUSTENTANTES:

Guzmán Bracho Ma. del Carmen

Romero Ramírez Victoria Norma

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA:

Dr. Oscar Velasco Castrejon



Agradecemos al Dr. Jorge Tav Z.,
Jefe del departamento de Ecología --
Humana, y al Dr. Manuel Gutierrez O.,
Jefe del laboratorio de Inmunopara-
sitología, el habernos permitido la
realización de este trabajo.

A nuestro director,
maestro u amigo Dr. Oscar
Velasco Castrejón.

A.....

.....mis queridos padres, Victoria y Enrique,

.....mis hermanos Carlos, Margarita, Patricia,
Enrique y Guillermo.

..... Mercedes por su gran ayuda

..... Manuel por su cariño.

A: - David y Zoila, mis padres y amigos.

A: - David, Mauricio y Eva, mis hermanos

Aj - mi tía Eva.

A: - Fernando.

I N D I C E

I	GENERALIDADES	1
II	HIPOTESIS DE TRABAJO.....	19
III	MATERIAL Y METODOS.....	20
IV	RESULTADOS.....	64
V	CON CLUSIONES.....	81
VI	BILBIOGRAFIA.....	84

Definición

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por Cysticercus cellulosae, etapa larvaria de Taenia solium y por Cysticercus racemosus, larva cuyo adulto no ha sido aún identificado, pero que algunos autores suponen se trata de la de un cétodo de anfibios o de la etapa larvaria degenerada de T. solium.

Sinonimia

Cisticercosis, tomatillo, zahuate, granillo, sano, --liendrilla, granizo, etc.

Antecedentes históricos

Padecimiento conocido desde remota antigüedad. Misototeles u' Históhanes, por ejemplo, desde el siglo V A.C. (1) describían la cisticercosis de la lengua del cerdo --similar al granizo, aunque desconocían su origen.

Los israelitas, en la época de Moisés, ya tenían conocimientos, que dejaron consignados en sus leyes, de la --relación entre algunos alimentos humanos y la infección --por helmintos. Dichas leyes ordenaban la separación de animales limpios de los impuros, por estar infectadas sus --carnes con "piedras" (cisticercos) y prohibían su ingestión.

En 1550 D.C., Paranozi encontró vesículas redondas, blancas, llenas de líquido, en el cuerno caloso de un hombre.

En 1558, Gessner y Pumbler (2) publicaron el primer caso humano al encontrar un cisticerco en la duramadre de un epiléptico.

En 1588, Arseni y Sanicta, estudiaron larvas extraladas del músculo del cerdo y la denominaron Cisticercus cellulosa (3).

Trescientos años después, Kuchenmeister (2) logró establecer la relación entre la forma larvaria del cestodo en el músculo del cerdo y el gusano adulto (Taenia solium) en el intestino humano, al infectar experimentalmente a un presidiario, con carne de cerdo parasitada con los cisticercos y recuperar en la autopsia cuatro meses más tarde los vermes adultos.

En 1874, Heller(1) describió la meningitis cisticercosa en el hombre.

En 1888, Ramos(4) publicó el primer caso de cisticercosis ocular en México y, desde entonces, este tipo de publicaciones han sido frecuentes.

Basándose en el gran número de estas publicaciones -- Vosgien(5) en 1911, aventuró que la cisticercosis ocular,-

tenía una frecuencia del 42%, siguiéndole en orden de importancia la del sistema nervioso central (36), la generalizada (13%) y la del tejido celular subcutáneo (9%); proporción en la que aún están acordes muchos oftalmólogos mexicanos (5), correspondiendo, según Gavez, un caso de cisticercosis ocular por cada 4,000 - enfermos del aparato óptico.

A partir del artículo de Ramos, se han publicado numerosos trabajos de autores mexicanos, destacando - Pobles (6), Puig-Solanes (7), Nieto (8 y 9), Zenteno -- (10-12), Rabiela (13), Padilla (14), Sánchez (15), López-Hernández (16) y Cuevas (17) quines con sus informes - sobre prevalencia en población hospitalizada, clientela privada y en autopsias realizadas en diferentes instituciones hospitalarias de la ciudad de México, han constatado la elevada frecuencia de este padecimiento en - nuestro país. (TABLAS I y II).

P a n o r a m a e p i d e m i o l ó g i c o

La cisticercosis es un padecimiento cosmopolita, común en los pueblos eslavos, en China, Manchuria, Pakistán e India, así como en los países latinoamericanos como México algunos de Centroamérica, Venezuela, Brasil, Perú y Chile (8) y en algunos países africanos.

T A B L A 1
 FRECUENCIA DE CISTICEROSIS EN ALGUNOS HOSPITALES DE
 LA CIUDAD DE MEXICO

HOSPITAL	AÑO	NUM. DE CASOS/TOTAL	%
Neurología, Hospital General, SSA	1943	2/100/-	
Neurología, Hospital General, SSA	1944	25/100	25
Manicomio General, SSA	1942-46	30/5000	0.6
Manicomio General, SSA	1942-55	168/12,200	1.3
Neurología, Hospital General, SSA	1959	31/265	11.0
Neurología, Hospital General, SSA	1959-63	63/2000	3.1
Hospital de la Raza, IMSS	1956-68	87/228956	0.03
Instituto Nacional de Neurología	1973	132/333	3.9
Hospital Infantil, SSA	1944-54	12/68216	0.017

T A B L A II

FRECUENCIA DE CISTICERCOSIS EN ALGUNAS SERIES DE AUTOPSIAS REALIZADAS EN LA CIUDAD DE MEXICO

HOSPITAL	AÑO	NUM. DE CASOS/TOTAL	%
Manicomio General, Méx.D.F.	1935	2/-	
Hospital General, Méx.D.F.	1942	38/1357	2.8
Hospital Civil, Jal.	1944	13/2250	0.57
Hospital General, Méx.D.F.	1946		3.6
Hospital de la Nutrición, Méx.D.F.	1947-57	25/884	2.8
Hospital General, Méx. D.F.	1954-59	36/2238	1.6
Hospital General, Méx. D.F.	1953-66	155/7206	2.1
Hospital General, Méx.D.F.	1954-66	103/6558	1.5
Hospital 20 de Noviembre, Mex.D.F.	1963-73	66/6644	2.03
Hospital del Niño, Méx.D.F.	1970-75	6/1563	0.30

En Europa se observa a menudo en los países centrales y orientales.

En general podemos afirmar que la cisticercosis -- constituye una parasitosis con repercusiones importantes en Salud Pública, en aquellos países que gustan de consumir carne de cerdo, especialmente en platillos donde se sirve semicruda o mal cocida.

La cisticercosis en México es aún grave problema de Salud Pública y desde luego un pesado lastre socioeconómico, por las pérdidas que ocasiona, no sólo en días de--- trabajo perdidos, hospitalización y muerte humanas, sino también por la mengua cuantiosa de carnes, especialmente de cerdo, animal que con frecuencia sufre esta parasitosis.

Respecto a sexo y edad, esta enfermedad es prevalente en adultos, especialmente del sexo masculino y en particular en los estratos socioeconómicos más débiles.

Su frecuencia es mayor en las áreas rurales y sub---urbanas, más que nada debido al nulo control sanitario de la carne de cerdo y a la elevada contaminación fecal de los alimentos y aguas, a la ignorancia y a la miseria que muchas veces les invade (debido al alto costo) "desperdiciar" el agua comprada a pipas o acarreada en la espalda por largas distancias, en el lavado de manos y baño.

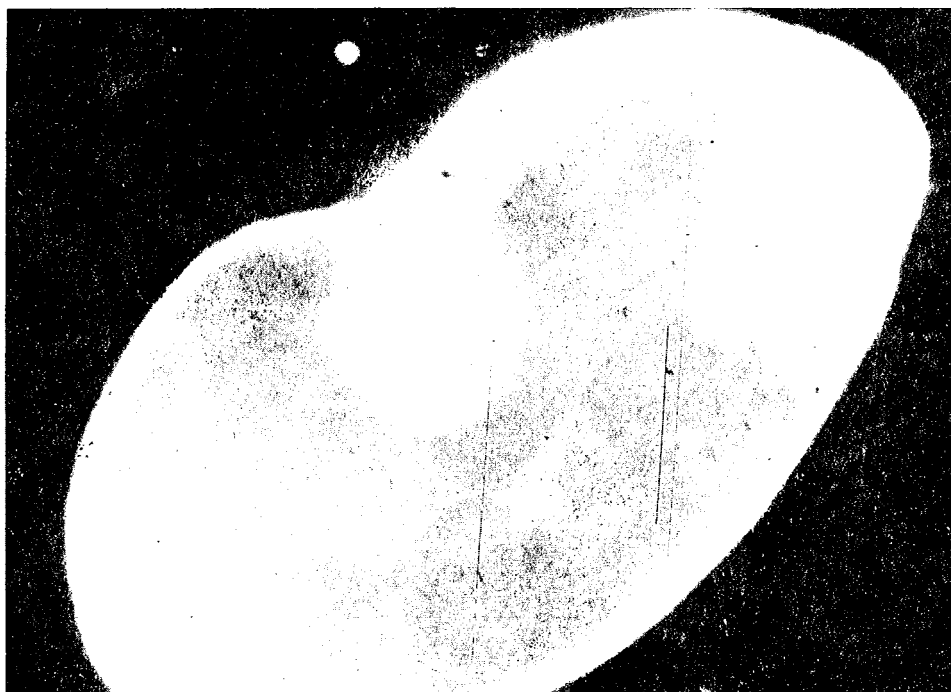
La cisticercosis en nuestro país disputa a la tuberculosis el "privilegio" de ocupar el primer lugar entre las causas de hipertensión intracraneana (6), -- causando el 10% de las mismas.

Para dar una somera idea de su importancia en México, basta decir que en 1973 la cisticercosis ocupó el octavo lugar como causa de muerte, según las estadísticas vitales de ese año (19); que el Hospital General tuvo una frecuencia de 3.5% en las autopsias realizadas y su presencia, en una tercera parte de los casos con procesos tumorales expansivos del sistema -- nervioso central y que en el Hospital de las Enfermedades de la Nutrición encontraron esta parasitosis en un 2.8% de los casos que se llevaron a autopsia (20) cifras muy similares a las descritas en otras instituciones -- hospitalarias.

Según Zenteno (12) el 3% de la población general de México tiene cisticercosis, sin embargo, ésta muchas -- veces cursa en forma asintomática, debido al escaso número de larvas o al sitio donde éstas se encuentran parasitando.

E t i o l o g í a

El agente etiológico más conocido de esta parasito-



FOTOGRAFIA 1

Cysticercus cellulosae invaginado (aumentado 17 veces). En la parte superior central se observa una zona de mayor opacidad que corresponde al - scolex.



FOTOGRAFIA 2

Escólex de C. cellulosa evaginado (aumentado 40 veces). Se observa claramente el rosetelo con su doble corona de ganchos, tres de sus cuatro ventosas y el cuello.

sis es Cysticercus cellulosae (2), etapa larvaria de Taenia solium.

En 1808, Rudolphy, consideró a C. cellulosae como una entidad zoológica independiente y durante muchos años este error estuvo presente en múltiples publicaciones y libros de texto.

C. cellulosae es una larva vesiculosa, redondeada u ovoidé, de color blanco lechoso, mide de 5 x 8-10 mm, y está formada por un escólex, cuello y un cuerpo vesicular que limita una cavidad que contiene un líquido incoloro y límpido. El escólex presenta un rostelo con dos coronas de ganchos, y se encuentra en la vesícula invaginada o evaginada (22). (FOTOGRAFÍAS 1 Y 2).

C i c l o B i o l ó g i c o

El ciclo biológico de este parásito comprende un huésped intermediario que generalmente es el cerdo, y con frecuencia el hombre (23), sólo que este último es un huésped intermediario ineficiente por razones obvias.

La cisticercosis se adquiere por ingestión de los huevos maduros de T. solium. Los huevos escapan del útero del cestodo a través de una hendidura longitudinal ventral, ya sea antes o después de que los proglótidos grávidos se liberen (apóllisis). Al abandonar el

útero del céstodo a través de una hendidura longitudinal ventral, ya sea antes o después de que los proglótidos gravidos se liberen (anólisis). Al abandonar el útero del proglótido grávido y ser depositados en el suelo, puede permanecer viable por espacio de muchas semanas. Ingeridos por el cerdo o por el hombre y más raramente por otros mamíferos, llegan a duodeno o yeyuno, en donde ocurre la desintegración de la cubierta de los huevos se desintegra, liberándose la oncosfera o embrión hexacanto al intestino medio, y mediante sus ganchos y secreciones proteolíticas atraviesa la pared intestinal, y penetra a las venas mesentéricas pasando al sistema porta, y por éste, a la gran circulación, en donde es retenido por su volumen, evolucionando en un lapso de 60 a 70 días a la forma larvaria o cisticerco. (25).

Existen tres mecanismos por los cuales los huevos de Taenia solium llegan al estómago del individuo:

a) Heteroinfección.- Es la forma más común de la ingestión accidental de los huevos del céstodo, y consiste en la contaminación de agua y alimentos, por las heces de un paciente con teniasis. Estos pueden ser contaminados directamente o por las manos del paciente u por vectores mecánicos, como las moscas.

b) *Autoinfección externa.* - Consiste en la ingestión de huevos por el propio individuo portador del verme adulto por contaminación ano-mano-boca o alimentos.

c) *Autoinfección interna.* - Es debida a los movimientos antiperistálticos del intestino, por lo que los proglóditos de *T. solium* o sus huevos libres retroceden al estómago en donde los jugos gástricos favorecen la eclosión de embriones infectantes. Esta forma en la actualidad ha sido negada por múltiples autores (24).

Localización

Sus principales localizaciones son: el tejido celular subcutáneo, músculos, ojo y sistema nervioso central (18) (22) y (23). Aparentemente, la localización más común es el tejido celular subcutáneo en donde causa problemas leves, que la mayoría de las veces no producen sintomatología.

En el músculo, la presencia de la larva en crecimiento, provoca una secuencia típica de reacción inflamatoria local (26) la cual, casi siempre, pasa inadvertida.

Las localizaciones cerebral y ocular son las que producen los daños más graves. En el sistema nervioso central, la cisticercosis, puede ser única o múltiple u

Los sitios de localización más frecuentes son: cerebro, meninges, ventrículos cerebrales u protuberancia. Casi nunca afecta médula espinal.

P a t o g e n i a

La severidad de la enfermedad depende de la localización de las vesículas, en algunos casos el padecimiento es asintomático, en cambio, si se encuentra en lugares estratégicos (tercer ventrículo, por ejemplo) puede producir la muerte.

Hasta hace poco tiempo se creía que era la reacción inflamatoria producida en los tejidos del huésped, consecutiva a la muerte del parásito, la causa fundamental de la patogenia. En la actualidad se ha visto que es el parásito vivo el principal responsable de ésta (6) (27).

I n m u n o l o g í a

Se han realizado estudios acerca de la inmunidad de la cisticercosis animal u humana que parecen confirmar - que, por razón de su volumen, un C. cellulosa establecido en los tejidos del huésped no puede ser fagocitado, e ~~excepto~~, cuando el parásito ha muerto u entrado en involución (25).

Quando la larva de T. solium penetra al huésped, --

los linfocitos T y B, así como los eosinófilos y células cebadas, al ponerse en contacto con los antígenos secretados u/o excretados por el cisticerco, inician la reacción inmune, que seguramente tiende a matar algunos de ellos durante su viaje por la sangre, o destruye muchos de los que se establezcan en tejido celular subcutáneo, vísceras u músculo, pero muy difícilmente a aquellos que lleguen a encefalo o aparato ocular.

La mayoría de los cisticercos establecidos en el tejido muscular originan una reacción inflamatoria perivascular de intensidad variable, semejante a la reacción de Arthus, caracterizada por leucocitos polimorfonucleares u vasculitis. Es importante considerar que la simple reacción inflamatoria del huésped, al tratar de penetrar la oncosfera la mucosa intestinal, puede ser capaz de matar algunos embriones.

En 1971, Soulé (28) describió la presencia de eosinofilia, que persiste durante la evolución del cisticerco en el huésped, a diferencia de los anticuerpos que, a pesar de estar siempre presentes, disminuyen con la vitalidad del parásito.

La velocidad de aparición de los anticuerpos depende de la cantidad de huevos ingeridos, es decir, a mayor grado de infestación los anticuerpos aparecerán en menor

tiempo (26). En esta respuesta humoral participan todas las inmunoglobulinas, con diferentes porcentaje de frecuencia cada una de ellas, siendo la más importante la IgG con 100% de frecuencia, le siguen la IgM con 80%, IgE 55%, IgA 39% y por último la IgD con 35% (29).

En la actualidad, como apuntamos al principio, se cree que, aparentemente, la acción de los eosinófilos es el mecanismo más importante en la defensa del huésped contra *Cysticercus cellulosae*.

D i a g n ó s t i c o

En el diagnóstico de la cisticercosis se han empleado diversos métodos: técnicas de gabinete, como la radiografía, la gammagrafía y la tomografía axial computarizada; procedimientos de laboratorio, principalmente inmunológicos, que incluyen algunas técnicas tan sencillas como la inmunodifusión doble (IDD), la intradermorreacción (IDR) y las reacciones de precipitación (RP) o bien de complejidad media, como la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunoelectroforesis (IEF) y, en la actualidad, algunas otras, muy complejas como lo son el radioinmunoensayo (RIA) y el enzimoimmunoensayo (ELISA).

El diagnóstico clínico sólo puede confirmarse mediante la intervención quirúrgica, aunque esto, no es de nin-

guna manera conveniente realizarlo en casos de cisticercosis del sistema nervioso central (32), ocurriendo lo mismo con la obtención de biopsias.

Diversos autores basándose en su experiencia, indican que la radiografía es poco útil para el diagnóstico de la cisticercosis, pues las imágenes radiográficas de los cisticercos vivos pasan fácilmente inadvertidas, aún para el observador experto (3); sin embargo, en los casos en que el cisticerco degenerado se calcifica, su utilidad es grande, si bien se ha notado que dicho proceso tarda bastante tiempo en efectuarse (33), por lo que no es una técnica -- muy útil.

La reacción de fijación del complemento (RFC) se empleó por primera vez en el diagnóstico de la cisticercosis por Weinberg en 1909 (34) con aparentes buenos resultados. Nieto y otros autores (9) la emplearon con relativo éxito en casos de cisticercosis del sistema nervioso central, utilizando líquido cefalorraquídeo. Esta técnica presenta como inconvenientes su laboriosidad, alto costo y, sobre todo la inespecificidad, que es mayor del 50%.

La técnica de hemaglutinación indirecta (HAI), ha sido utilizada por varios autores (33, 35-37), quienes observaron que es más sensible, si se emplea suero sanguíneo en lugar de líquido cefalorraquídeo. En cuanto a la especifici-

cidad, estos autores informaron de frecuentes reacciones cruzadas con otras parasitosis, por lo que esta reacción se considera sensible, pero poco específica.

Biagi y Tar en 1958 (38) encontraron que la prueba de precipitación en gel y tubo capilar, además de sensible es muy específica y cuantitativa. Flisser y cols. en 1978 (4) observaron que la inmunoelectroforesis sólo detecta al 50% de los enfermos, "debido aparentemente a que la mitad de los pacientes carecen de suficientes anticuerpos circulantes para dar resultados positivos a las técnicas de precipitación en gel" o a que "el agente etiológico no es siempre C. cellulosa".

Petithory en 1971 (39), usó la intradérmica reacción -- (IDR) en pacientes con cisticercosis comprobada por otros métodos, obteniendo cierta reactividad al antígeno utilizado.

La inmunofluorescencia (IF) como técnica de diagnóstico no es aconsejable debido a su poca especificidad -- (40); sin embargo en 1978, González Barranco y cols. (27) reportaron sólo 12% de falsas positivas utilizando como antígeno, cortes de cisticercos hechos con criostato, y suero sanguíneo.

En la actualidad se han desarrollado técnicas con -- alta especificidad y sensibilidad, como el radioinmuno--

ensayo y el inzimoinmunoensayo, desarrollada esta última, por ~~Ana~~ ^{Amihulo} en 1978 (41). Las desventajas de estos métodos son el elevado costo, del equipo, material y de los reactivos que se utilizan, así como la necesidad de personal especializado, factores que constituyen un impedimento para su aplicación en el laboratorio de rutina.

Sin embargo, a pesar de la sencillez o de la gran complejidad de estas técnicas, que utilizan suero sanguíneo o lloído cefalorraquídeo, aún no existe alguna que sea realmente eficiente ya que la mayoría de ellas son, además de inespecíficas, más o menos complejas y de elevado costo. Estos factores han ocasionado que estas pruebas queden fuera del alcance de los laboratorios de campo o inclusive del consultorio médico. Esto es más notorio en las áreas rurales, donde su carencia repercute en el diagnóstico de una antropozoonosis tan importante en nuestro país.

Una prueba serológica sencilla y algunas veces con implicaciones diagnósticas en diversas enfermedades, lo ha sido la aglutinación con partículas inertes adsorbidas con antígenos específicos, tal como ha ocurrido en la triquinosis (42) o bien en micosis profundas (43) ya que ha coadyuvado al diagnóstico de cuadros compatibles con ellas, en cuestión de minutos, y en algunas se considera

el medio diagnóstico de elección (44).

Para el diagnóstico de la cisticercosis se ha usado esta técnica, adhiriendo antígenos del parásito a partículas inertes, tanto en el diagnóstico en ovinos (45 y 46), como en el hombre (47) pero se han obtenido resultados poco satisfactorios.

La misma técnica se ha utilizado para diagnosticar criptococosis, con la variante de adherir a las partículas inertes anticuerpos específicos para poder detectar la presencia de antígenos solubles en muestras biológicas (44). lo que hace innecesario contar con fracciones antigénicas bien determinadas.

Esta prueba ha brindado excelentes resultados, al grado de constituir la de elección en la criptococosis meningoencefálica (44).

En esta base, hemos tratado de adaptarla para el diagnóstico de la cisticercosis, con el fin de obtener una técnica sensible, específica y sencilla en su manejo, de tal manera que pueda usarse fácilmente en el laboratorio de campo para ayudarnos a conocer mejor la frecuencia e importancia de esta zoonosis en nuestro medio.

H I P Ó T E S I S d e T R A B A J O

La hipótesis, en la cual apoyamos nuestro trabajo, - se basa en que un organismo vivo como lo es Cysticercus cellulosae colocado, o en relación directa, en un medio - lluido, debe elaborar metabolitos que se difunden en el mismo, tal como lo hace Criptococcus neoformans (44).

La producción y, por ende, la cantidad de antígenos - solubles procedentes del metabolismo de Cysticercus cellulosae posiblemente se hallen en relación directa --- con el número de larvas presentes.

Por esta razón creemos que, hasta ahora la dificultad diagnóstica de la cisticercosis humana obedece, entre otras causas, a que se han tratado de detectar anticuerpos en el lluido cefalorraquídeo, medio en el que suponemos existen antígenos en abundancia, los cuales inhiben - este tipo de técnicas, o en la sangre, donde la barrera - hematoencefálica impide la llegada de los antígenos en - concentraciones suficientes para que el huésped elabore - cantidades adecuadas de inmunoglobulinas.

En cambio, si buscamos antígenos en el lluido cefalorraquídeo, donde suponemos que se encuentran en gran - cantidad, su detección debe ser relativamente sencilla - al utilizar una técnica similar a la empleada en la criptococcosis.

MATERIAL Y METODOS

1.0 LIQUIDOS CEFALORRAQUIDEOS DE ENFERMOS NEUROLOGICOS

Estudiamos un total de 127 líquidos cefalorraquídeos, procedentes de 4 grupos de pacientes: I) Enfermos con cisticercosis del sistema nervioso central es comprobada. II) Pacientes con síndrome cerebeloso. -- III) Casos con otras afecciones neurológicas de etiología diversa u diferente a C. cellulosa. IV) Individuos sospechosos de padecer cisticercosis. (Ver Cuadro 1).

En el grupo de otras afecciones neurológicas, -- (Cuadro 2) se descartó el diagnóstico de cisticercosis mediante diversas pruebas de gabinete u fue utilizado como control para averiguar la especificidad de nuestro método, igual que el grupo I, que comprendió 6 líquidos cefalorraquídeos provenientes de cisticercosis comprobados.

Todos los líquidos cefalorraquídeos, fueron estudiados utilizando la prueba de aglutinación con partículas inertes, a las cuales se les adhirió gamma-globulina de conejos hiperinmunizados a tres antígenos - de C. cellulosa según la metodología que se describe

CUADRO 1

GRUPO	CARACTERISTICA DE LOS PACIENTES	NUM. DE MUESTRAS
I	CON CISTICERCOSIS <u>COM-</u> PROBADA. *	6
II	CON SINDROME DE REBELOS ¹	2
III	CON OTRAS AFECIONES NEU- ROLOGICAS. **	19
IV	SUSPECHOSOS DE CISTICERCO- SIS. ***	100

* Mediante tomografía axial computarizada u/o cirugía.

** Todas ajenas a la cisticercosis; la cual fue descartada por tomografía axial computarizada u serología.

*** Enviadas por el ISET para su estudio.

CUADRO 2

PADECIMIENTOS NEUROLOGICOS	CASOS
Síndrome de Guillain Barre	3
Esclerosis Múltiple	2
Epilepsia	2
Traumatismo Craneoencefálico	2
Criptococcosis*	1
Crisis convulsivas subintrantes	1
Enfermedad Tipo Ahan -Duchenne	1
Enfermedad de Davis	1
Hidrocefalia normotensa	1
Meduloblastoma	1
Neuropatía diabética	1
Tumoración del VI Ventriculo	1

* Es importante hacer notar que este líquido cefalorraquídeo fue positivo, tanto al cultivo micológico como a la prueba de aglutinación de partículas de látex para detectar antígenos solubles de-----
Criptococcus neoformans.

más adelante, " los resultados se compararon con los obtenidos por otras técnicas: hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta*, para valorar la sensibilidad y especificidad de nuestra técnica.

Por último, para valorar estadísticamente los resultados obtenidos, los datos fueron procesados en la computadora Hewlett-Packard 3,000, de la Coordinación de Servicios de Computo de la Universidad Autónoma Me tropolitana (Unidad Xochimilco). **

Se empleó el programa para pruebas no paramétricas como: la prueba de Milcoxon " la prueba de los -- signos, obteniendo con estas resultados que indican -- la existencia o ausencia de diferencias significativas entre las técnicas diagnósticas utilizadas.

Para saber si existía o no diferencia significativa en los datos que nos proporcionó la computadora, se estableció un alfa (α) de 0.05, valor que da una efectividad de 95% en fenómenos biológicos: el 5% restante corresponde a las colas de la gráfica de frecuencia.

* La técnica de inmunofluorescencia indirecta fue practicada en el Instituto de Enfermedades Tropicales por la DRP Isabel Moreno y el DRP Luis Angel Sapián, a quienes damos las gracias por su cooperación.

** Agradecemos al DRP Rubén del Muro D. la ayuda brindada.

2.0 OBTENCION DE Cysticercus cellulosae

Se utilizó carne de cerdo parasitada, que nos -- proporcionaron en el rancho de Texcoco, Edo. de Méxi- co.

Los cisticercos se obtuvieron por disección y -- fueron lavados varias veces en solución salina isotó- nica (0.85%). Hecha la recolección completa de las -- larvas, se sometieron a un tratamiento antimicrobia- no, colocándolas en solución salina isotónica con Pe- nicilina (1,000,000 U/ml) y Estreptomina (1.0 g), - durante una hora.

Posteriormente se lavaron varias veces con el -- fin de eliminar los antibióticos utilizados.

La cantidad de cisticercos relavados se dividió en tres lotes para la obtención respectiva de cada -- uno de los antígenos.

3.0 PREPARACION DE ANTIGENO SOMÁTICO COMPLETO POR EL METO- DO DE SACAROSA-RETONA. (Beltrán y cols., 1974) (48)

3.1 MATERIAL

Balanza analítica

Homogenizador Virtis 23

Frascos de tapón esmerilado, de boca ancha, de 1.0 lts

Jeringa de 50 ml, estéril

Aguja del Núm. 16, de 9.5 cm de longitud

Bomba de vacío

Agitador de vidrio de 30 cm de longitud, estéril

Liofilizadora Virtis

Tubos de centrifuga de 50 ml, estériles

3.2 REACTIVOS

Solución de sacarosa 0.24 M

Acetona pura a -20°C

Solución amortiguadora de fosfatos, estéril, pH 7.2

3.3 METODO

- Del lote Núm 1 de larvas se tomó una cantidad deter-
minada del material.

- Se liofilizó, pesó y trituró en un mortero.

- Al polvo obtenido ~~de la~~ agregó una pequeña cantidad de sacarosa 0.24M, se pasó a un vaso del homogeniza-
dor agregando el resto de la sacarosa en proporción -
de 100 ml por gramo de larvas (peso seco).

- la mezcla se homogenizó durante tres minutos en ba-
ño helado.

Se colocaron 800 ml de acetona fría a -20°C por ca

da 50 ml.

- El homogenizado se aspiró con jeringa de 50 ml u a guja del Núm. 16, depositándose lentamente por debajo de la superficie de acetona, tapando y agitando vigorosamente durante un minuto.

- Se dejó reposar en baño helado durante 15 minutos.

- Se aspiró el sobrenadante turbio de acetona y se agregó nuevamente acetona fría, en igual cantidad al volumen inicial; se agitó energicamente durante unos minutos y se dejó reposar nuevamente en baño helado durante una hora.

- Pasando ese tiempo, se aspiró con bomba de vacío la mayor cantidad de acetona posible, para resuspender luego el sedimento en 200 ml de acetona, agregando primero un pequeño volumen de ésta y agitando, para desprender algunas partículas adheridas en el fondo y las paredes del frasco.

- Todo el material se pasó a botellas de centrifuga de 250 ml; pero, antes se homogenizó para obtener una suspensión fina.

- Se centrifugó a 300 x G durante 15 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C, colocando tapones de hule a las botellas.

- El sobrenadante se decantó con cuidado y los fras--

cos con el sedimento se colocaron en baño helado para ser secados posteriormente con bomba de vacio a -70°C durante dos horas.

- El polvo así obtenido se resuspendió en solución salina amortiguada de fosfatos, pH 7.2, estéril y frla, en proporción de 40 ml por gramo de larvas.

- Esta suspensión se pasó a un baño helado en el --- cuarto frlo durante toda la noche (16 horas) con agitación constante.

- Al día siguiente se centrifugó a $300 \times G$ en centrífuga refrigerada a 4°C durante una hora.

- En el sobrenadante obtenido se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry (49), así como el de carbohidratos por el método de la antrona (50).

- Cuando el contenido de carbohidratos fue muy elevado (mayor de $100 \mu\text{g/dl}$) se efectuó una diálisis del antígeno contra amortiguador de boratos, pH 8.4, a -4°C , durante varios días, cambiando la solución de diálisis 2 ó 3 veces al día, hasta obtener la concentración de carbohidratos menor de $100 \mu\text{g/dl}$.

- Una vez que se obtuvo dicha concentración, se determinó nuevamente el contenido de proteínas por el método anteriormente citado, ajustando la concentración protéica a 3.0 mg/ml , y envasando en alícuotas de ---

1.0 ml en frascos de vidrio que se etiquetaron.

- Antes de envasar el antígeno se le añadió azida de sodio como preservador. (0.1 mg/dl).

- El almacenamiento se realizó a 4°C.

4.0 PREPARACION DE ANTIGENO DE FLUIDO VESICULAR

4.1 MATERIAL

Mechero Bunsen

Pinzas de disección, estériles

Aguja de disección, estéril

Matraz Erlenmeyer de 250 ml, estéril

4.2 METODO

- A cada uno de los cisticercos del lote Núm. 2 se le extrajo el líquido vesicular, rompiendo la membrana con una aguja de disección, recibiendo en un matraz. Este procedimiento se efectuó en condiciones de esterilidad.

- Se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry, ajustando la concentración a un contenido final de 3.0 mg/ml de proteínas.

- Se adicionó azida de sodio como preservador (0.1 mg/dl).

- En frascos de vidrio estériles, se envasó el antígeno en alícuotas de 1.0 ml y se etiquetó.
- Una vez realizado esto, se almacenó a 4°C.

5.0 PREPARACION DE ANTIGENO DE EXCRECIONES Y SECRECIONES

5.1 MATERIAL

Matraces Erlenmeyer de 250 ml, estériles
Baño maría a 37°C

5.2 REACTIVOS

Solución salina isotónica (0.85%), estéril

5.3 METODO

- Este tipo de antígeno se produce durante el "crecimiento" del parásito, por lo tanto los cisticercos -- del lote N.º 3 fueron incubados a temperatura de --- 37°C durante 22 horas en solución salina isotónica, - añadiendo 0.1 ml por cada cisticercos. Debido a que -- las larvas son viables, han durante este lapso la producción de cierto tipo de sustancias metabólicas con poder antigénico, las cuales se liberan durante la in cubación, en la solución salina isotónica.
- Se separaron los cisticercos de la solución de incu

bación.

-El líquido de incubación, que constituye el antígeno de excreciones u secreciones, se sometió a la determinación de proteínas por el mismo método utilizado anteriormente.

- Se ajustó el contenido proteico a 3.0 mg/ml.

- Se añadió azida de sodio como preservador (0.1 --- mg/ml).

- El antígeno se envasó en frasco de vidrio, en alícuotas de 1.0 ml y se etiquetó.

- Se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.0 DETERMINACION DE PROTEINAS (Método de Lowry)

6.1 FUNDAMENTO

Dado que la tirosina se presenta en muchas proteínas a intervalos regulares, el método de Folin-Ciocalteu para determinar grupos hidroxil-fenólicos constituye una de las técnicas más utilizadas para cuantificar la proteína total.

La reacción de una proteína en solución con el reactivo de Folin-Ciocalteu se efectúa en dos fases - que llevan, finalmente, a la aparición del color:

Fase 1.- Reacción con el cobre alcalino.

Fase 2.- Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con el cobre.

En la reducción del reactivo de Folin, el color máximo se obtiene cuando la reacción se lleva a cabo a pH 10; a este pH el reactivo es activo durante poco tiempo.

Lowry y cols. (1951) han señalado las ventajas - de este método, el cual es de 10 a 20 veces más sensible que la estimación que se hace por absorción a --- 280 nm; varias veces más sensible que la reacción de la ninhidrina u aún más fácil de realizar a microescala; el reactivo de Folin da más color con las proteínas completas que con los aminoácidos u es cien veces más sensible que la reacción de Biuret.

Existen dos desventajas en la reacción de Folin: a) la cantidad de color no varía con diferentes proteínas u b) el color no es estrictamente proporcional a la concentración de proteínas.

6.2 MATERIAL

Gradilla

Tubos de ensayo de 13 x 100

Pipetas de 1.0 ml

Pipetas de 5.0 ml

Vasos de precipitados de 100 ml
Espectrofotómetro

6.3 REACTIVOS

0.1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%

10 ml de carbonato de sodio al 2%, en hidróxido de -
sodio 0.1 N

0.1 ml de sulfato de cobre pentahidratado al 1%

- La mezcla de estos tres reactivos constituye el --
reactivo de trabajo, y se preparó inmediatamente an-
tes de ser utilizada.

Agua destilada

Reactivo de Folín 1.0 N:

1 volumen de agua destilada

+

1 volumen de reactivo de Folín-Ciocalteu

Solución estándar de albúmina (100 $\mu\text{g}/\text{dl}$)

6.4 METODO

tubo	blanco	1	2	3	4	5	problema
muestra	-	-	-	-	-	-	0.1
sol. patrón	-	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-
agua destilada	1.0	-	0.2	0.4	0.6	0.8	0.9
sol. de trabajo	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
<i>Agitar, reposar 10' a temp. ambiente</i>							
React. Folin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
<i>Agitar, reposar 30' a temp. ambiente</i>							
<i>Leer a 500 nm</i>							
conc. ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	-	100	80	60	40	20	?
TODAS LAS CANTIDADES ESTAN EN MILILITROS							

6.5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

El contenido de proteínas del problema se obtuvo interpolando su valor de densidad óptica en la curva patrón que se trazó con los valores de concentración conocida y la densidad óptica leída en el aparato de los tubos 1-5.

Es necesario tomar en cuenta la dilución del problema para conocer el valor real de su contenido proteico.

7.0 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS (Método de la antrona) (50)

7.1 FUNDAMENTO

La antrona en ácido sulfúrico es un reactivo general para la determinación de azúcares: polisacáridos, ésteres, pentosas, etc.

Se basa en la formación de derivados del furfural por deshidratación y ciclación de la molécula.

7.2 MATERIAL

Gradilla

Tubos de ensayo de 13 x 100

Pipetas de 1.0 ml

Pipetas de 5.0 ml

Vasos de precipitados de 100 ml

Espectrofotómetro

7.3 REACTIVOS

Antrona cristalizada, al 0.2% en ácido sulfúrico al 95% (recién preparada)

Agua destilada

Solución estándar de glucosa (100 μ g/dl)

7.4 METODO

tubo	blanco	1	2	3	4	5	problema
<i>Realizar la adición de los reactivos en baño de hielo.</i>							
<i>sol. reactivo</i>	2.0	2,0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
<i>muestra</i>	-	-	-	-	-	-	0.1
<i>agua destilada</i>	1.0	-	0.2	0.4	0.6	0.8	0.9
<i>sol. patrón</i>	-	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-
<i>Agitar y colocar en baño maría ebullición durante 16' exactos; pasar a agua fría.</i>							
<i>Leer a 625 nm</i>							
<i>conc. (g/dl)</i>	-	100	80	60	40	20	?
TODAS LAS CANTIDADES ESTAN EN MILILITROS							

7.5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Se realizó una gráfica de densidad óptica contra concentración de los tubos en los que se conocía su contenido de glucosa; el valor de densidad óptica que obtuvo para el problema se interpoló en la curva patrón, obteniendo así el valor de concentración correspondiente.

Fue necesario tomar en cuenta la dilución que se

utilizó del problema para conocer su contenido real - de carbohidratos.

8.0 OBTENCIÓN DE LA GANJA GLOBULINA

8.1 ESQUEMA DE INOCULACIÓN

- La inmunización se realizó en conejos de 3,000 g de peso aproximadamente, utilizando 3 conejos por cada antígeno.

- Antes de iniciar el esquema de inoculación, se sangraron todos los conejos, con el fin de emplear el suero obtenido como control negativo en las pruebas que se realizaron posteriormente.

- A 0.5 ml de antígeno, a temperatura ambiente, se le añadieron 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, mezclando hasta obtener una suspensión homogénea, la cual se inyectó a cada animal por diferentes vías, según el esquema de inoculación:

NOTA: A partir de la tercera semana se empleó adyuvante incompleto de Freund.

semana n.º	vías de inoculación	inóculo
1	coiinete plantar derecho	0.5 ml
	intraperitoneal	0.5 ml
2	coiinete plantar izquierdo	0.5 ml
	intraperitoneal	0.5 ml
3	subcutánea múltiple	0.5 ml
	intraperitoneal	0.5 ml
4	subcutánea múltiple	0.5 ml
	intraperitoneal	0.5 ml
5	subcutánea múltiple	0.5 ml
	intraperitoneal	0.5 ml

- Antes de realizar cada inoculación se efectuó un --
sagrado para prueba (5 ml).
- Con cada uno de los sueros obtenidos se realizaron --
las siguientes pruebas: hemaqlutinaçión indirecta, in-
munodifusión u contraimmunoelectroforesis.
- Una vez obtenido un título de :4096 o mayor, en la
prueba de hemaqlutinaçión indirecta, se procedió a --
sangrar a blanco a los conejos.
- Del suero así obtenido se separaron las gamma-globu-
linas, empleando la precipitación con sulfato de amo-
nio.

8.2 DOBLE INMUNODIFUSIÓN EN GEL (OUGHTERLOW) (40)

8.2.1 FUNDAMENTO

La doble difusión en gel es una prueba adecuada para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias y tiene la ventaja de ser simple, reproducible y económica. Consiste básicamente, en colocar una solución de un gel fundido sobre una placa de vidrio o plástico; se deja solidificar y se practican horadaciones en las que posteriormente se depositará el antígeno (cuya característica es la de ser soluble) y el suero (anticuerpos). Al llevar a cabo la difusión en forma radial, existen concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo, éstos se combinarán, formándose en el sitio de la reacción una banda de precipitación.

La concentración de los reactivos es un factor fundamental ya que, cuando son equivalentes y de peso molecular similar, las bandas de precipitación tienen forma recta y se encuentran equidistantes de las pozas; si no hay equivalencia en la concentración de los sistemas antígeno-anticuerpo, los precipitados se forman más cerca de aquel reactivo cuya concentración es menor.

La presencia de más de una banda de precipitación es indicativa de la existencia de varios sistemas antígeno-anticuerpo u, en nuestro caso, puede obedecer a que los antígenos utilizados son crudos.

8.2.2 MATERIAL

Portaobjetos limpios u desengrasados

Sacañocados conectado a un sistema de vacío

Aplicadores de madera

Isopos

Capilares

Cámara húmeda

Plantilla de perforación

8.2.3 REACTIVOS

Amortiguador de veronal, pH 8.6

Agarosa al 2%

Agarosa al 1%

Azida de sodio

Controles positiva u negativa




Antígenos

Sueros hiperinmunes

8.2.4 METODO

- Con un isopo se barnizó el portaobjetos con agarosa al 2% y se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- Se colocaron los portaobjetos sobre una superficie bien nivelada.
- Se agregaron 3.0 ml de agarosa al 1% fundida, repartiendola uniformemente en el portaobjetos. Se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- Se perforó el gel con sacabocados, utilizando la plantilla especial.
- Se puso una gota de antígeno en la poza central, se dejó difundir unos minutos y luego se llenó nuevamente.
- En las pozas periféricas se pusieron los sueros problema, sin omitir controles positivo y negativo. Se renició el llenado de las pozas después de unos minutos.
- Se colocó en cámara húmeda para incubar a temperatura ambiente, durante 24 a 48 horas.
- Pasado este tiempo, se hizo la lectura y se registraron los resultados.

8.2.5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- a) *Identidad total*
- 
- b) *Identidad parcial*
- 
- c) *No identidad*
- 

8.3 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF) (40)

8.3.1 FUNDAMENTO

La contrainmunoelectroforesis es una prueba -- cualitativa o semicuantitativa, en la que se aprovechan las propiedades del amortiguador, del gel, de los reactivos u la acción de un campo eléctrico. El antígeno u el antisuero se colocan en pozas hechas en el gel, dispuestas una frente a la otra, haciendo pasar una corriente eléctrica, es decir, que no es más que una inmunodifusión acelerada, ya que los antígenos proteicos, debido al fenómeno electroendosmótico, se difunden hacia el ánodo u los anticuerpos esneclíticos hacia el cátodo: de esta manera, cuando ambos se encuentran se produce la reacción

antígeno-anticuerpo " en el sitio de la unión se --
 presenta una o varias bandas de precipitación apre-
 ciables a simple vista.

8.3.2 MATERIAL

Equipo para electroforesis

Portaobjetos

Sacabocados conectado a un sistema de vacío

Amara húmeda

Matraz Erlenmeyer de 250 ml

Capilares

Plantilla para perforación

Isoros

8.3.3 REACTIVOS

Amortiguador de venonal, pH 8.6

Agarosa

Cloruro de sodio

Controles positivo y negativo

Antígenos

Sueros hiperinmunes

8.3.4. METODO

- Se prepararon los portaobjetos siguiendo los tres primeros pasos de la técnica anterior.
- Se perforó el gel con el sacabobados, utilizando la plantilla especial.
- Se colocaron los sueros en las pozas que corresponden a la fila "R" de cada hilera (anodo) y el antígeno en las pozas de la hilera "B" (cátodo). Se usaron capilares para la colocación de los reactivos en las pozas, procurando no derramarlos.
- Se incluyeron controles positivo y negativo.
- Se colocó la placa en el aparato de electroforesis, ajustando los electrodos en las siguientes condiciones:
 - a.- amortiguador de verona? pH 8.6
 - b.- fuerza iónica 0.05
 - c.- voltaje 130-160 V
 - d.- potencial 4-5 V/cm
 - e.- intensidad de cámara:
 - 30 mA para la placa de 10 x 10 cm
 - 60 mA para la placa de 20.5 x 11 cm
- Se dejó correr durante 45 a 90 minutos,
- Se hizo la lectura de los resultados.

8.3.5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La presencia de una o más bandas de precipitación demuestra la identidad entre el antígeno y el anticuerpo que participan en la reacción.

8.4 HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI) (40)

8.4.1 FUNDAMENTO

En la hemaglutinación indirecta los glóbulos rojos de carnero o humanos tipo "O" se utilizan como sorbente, debido a que son fáciles de obtener y de conservar en ciertas condiciones durante 15 a 30 días en el laboratorio; además de adsorber espontáneamente a su superficie casi todos los polisacáridos y ciertas proteínas antigénicas, cualidad que se incrementa cuando son tratados con ácido tánico, produciendo la aglutinación cuando se ponen en contacto con inmunoglobulinas específicas. Esta técnica se utiliza para la cuantificación de anticuerpos.

La técnica de Boyden se considera altamente sensible y fácil de realizar, por lo que

su empleo se ha difundido ampliamente para el diagnóstico de un gran número de enfermedades parasitarias.

Para conocer la cantidad de inmunoglobulinas presentes, se efectúan diluciones seriadas del suero con cantidades constantes de una suspensión de glóbulos rojos sensibilizados con un antígeno específico: la dilución más alta del suero que determina una clara aglutinación se considera como punto final de la reactividad, además, representa el título de la dilución. La prueba (macro-técnica) o en placa (micro-técnica).

8.4.2 MATERIA L

Centrífuga clínica

Baño de agua a 56° y 37° C

Tubos de centrífuga cónicos de 15 ml, graduados

Pipetas serológicas de 0.2 y 1.0 ml, graduadas

Pipetas serológicas de 5.0 y 10.0 ml, graduadas

Vasos de precipitados de 50, 100 y 200 ml

Matraces Erlenmeyer de 50 y 125 ml

Equipo de microtitulación

8.4.3 REACTIVOS

Citrato de sodio al 3.8%

Amortiguador salino de fosatos, pH 6.4 u 7.2

Acido Tánico

Antigenos

Suero normal de conejo

Controles positivo u negativo

Eritrocitos de carnero. X

8.4.4 METODO

a.- Tanado de glóbulos rojos.

- Los glóbulos rojos suspendidos en citrato de sodio al 3.8%, se lavaron tres veces con amortiguador con pH 7.2, centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos cada vez.

- Se midió el paquete u se ajustó a una suspensión al 2.5% agregando 4.0 ml de PBS pH 7.2 por cada --- 0.1 ml de paquete de glóbulos.

- Se agregó un volumen igual de ácido tánico ----- 1:20,000.

- Se incubó la mezcla en baño maría a 37°C durante 15 minutos.

- Se centrifugó la mezcla a 2,000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante, se resuspendió con PBS 7.2 u se volvió a centrifugar.

- Se decantó u se midió el paquete de glóbulos ro--

jos, ajustando a una suspensión de 2.5% con PBS ---
pH 6.4.

- Se guardaron en refrigeración a 4°C.

b.- Sensibilización de glóbulos rojos con antígeno.
bs glóbulos rojos tanados se sensibilizaron agre-
gando un volumen igual de la dilución óptima de an-
tígeno en PBS 6.4.

- Se incubó la mezcla en baño maría a 37°C, durante
15 minutos.

- Se retiraron las células del baño de agua y se --
centrifugó durante 5 minutos a 2,000 rpm.

- Se decantó el sobrenadante y se lavaron las célu-
las otras dos veces por centrifugación a 2,000 rpm
por 5 minutos con suero normal de conejo al 1%, di-
luido en PBS 7.2; se volvieron a lavar centrifugan-
do 10 minutos, para obtener el paquete de glóbulos
rojos.

- Se ajustó el paquete de células a una suspensión
de 1.5% en suero normal de conejo diluido en PBS-
7.2. Esta suspensión es la que se empleó en las --
pruebas.

c.- Determinación de la concentración óptima de antígeno.

- Se prepararon cuatro diluciones del antígeno en amortiguador NH 6.4: 1:20, 1:40, 1:80, y 1:160.

-Se sensibilizaron glóbulos rojos con cada dilución de antígeno, siguiendo los primeros cinco pasos-- del inciso anterior.

-Se probaron con un suero positivo y otro negativo cada una de las diluciones. La más baja dilución de antígeno que dió el título más elevado con el suero inmune y no reaccionó con el suero negativo se consideró el óptimo.

d.- Desarrollo de la prueba

-Se inactivaron los sueros problema a 56°C durante 30 minutos.

- A todas las excavaciones de fondo de "U" de la placa de microtitulación se les agregaron con una micropipeta, 0.05 ml de suero normal de conejo al 1% en PBS 7.2.

- Se cargó el microtitulador de 0.050 ml con suero problema y se colocó en la primera poza; se mezcló completamente y se transfirieron 0.050 ml a la siguiente poza, repitiendo este proceso hasta la úl-

tima poza de la hilera de donde se descargaron ----
0.050 ml.

- A cada dilución del suero se le agregaron con una microrineta, 0.025 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 1 5%.

- Se colocó la placa en un vibrador o rotor de 1-3 minutos.

- Se dejó reposar la placa a temperatura ambiente - durante 2 a 3 horas.

- Después de este tiempo se hizo lectura de los resultados.

8.4.5 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

la máxima dilución en la que se presentó aglutinación indicó el título de anticuerpos existentes en la muestra que se estaba estudiando.

8.5 PRECIPITACION Y PURIFICACION DE GAMMA GLOBULINAS [51]

8.5.1 FUNDAMENTO [52]

Las sales neutras producen efectos notorios en la solubilidad de las proteínas globulares.

A bajas concentraciones, las sales incrementan la solubilidad de muchas de las proteínas: a este -

fenómeno se le llama "solubilización en salado".

La capacidad de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas depende de su fuerza iónica, de la concentración y del número de cargas positivas y negativas.

Los efectos de este fenómeno son causados por cambios en la tendencia a ionizarse de los grupos -R disociables.

Cuando la fuerza iónica de la solución aumenta, la solubilidad de las proteínas disminuye: a este fenómeno se le conoce como "precipitación en salado".

Las bases fisicoquímicas de este fenómeno son complejas: un factor es la elevada concentración de sales, que puede alterar el agua de hidratación de las proteínas, reduciendo la solubilidad.

8.5.2 MATERIAL

Vasos de precipitados de 150 ml

Tubos de centrifuga de 50 ml

Pipetas de 1.0 ml

Probeta de 10.0 ml

Potenciómetro

Agitador magnético con magneto

Centrífuga con cabezal y canis para frascos de 250 ml
Material y equipo para diálisis

8.5.3 REACTIVOS

Suero de conejos inmunizados

Sol. saturada de sulfato de amonio (temp. ambiente)

Solución de hidróxido de sodio 2N

Solución salina isotónica

Solución salina isotónica amortiguada con boratos,
pH 8.4.

8.5.4 METODO

- En un vaso de precipitados de 150 ml se colocaron
50 ml de suero de conejos inmunizados.

- Se introdujo el magneto dentro del vaso u este so
bre el agitador magnético; se ajustó la velocidad -
de agitación de manera de que no se formara espuma
u se adicionaron, gota a gota, 25 ml de la solución
saturada de sulfato de amonio.

- Una vez terminada la adición de la solución de --
sulfato de amonio, se ajustó el pH de la suspensión
a 7.8, mediante la adición de solución de hidróxido
de sodio 2 N.

- Se continuó con la agitación magnética durante --

2 a 3 horas.

- Se centrifugó la suspensión a temperatura ambiente, durante 30 minutos a 3,000 rpm.

- Se decantó y desechó el sobrenadante.

- Se disolvió en el volumen inicial (50 ml), en solución salina isotónica.

- La purificación de la gamma globulina se logró mediante dos o más precipitaciones. Para la segunda precipitación se repitieron los pasos anteriores, - en la última, sólo se repitió hasta la centrifugación (inclusive).

- Se disolvió el precipitado obtenido en la última precipitación en la mitad del volumen original ---- (25 ml), en amortiguador de boratos.

- Se dializó la solución así obtenida, contra el amortiguador de boratos: fue necesario cambiar la solución de diálisis por lo menos 2 veces al día; el equipo de diálisis se mantuvo a 4°C hasta que el dializado dio negativa la prueba de sulfatos.

- Prueba de sulfatos.-

Al adicionar una gota de una solución de cloruro de bario al 10% (o hidróxido) a una gota del diali. no se formó el precipitado blanco de sulfato de bario, lo que indicó la ausencia de sulfatos en

el dializado.

- Al terminar, el dializado se pasó a un tubo de -- centrifuga de 50 ml " se realizó la centrifugación a 4°C durante 30 minutos a 3,000 rpm.

- Para la conservación de la gamma globulina purificada (sobrenadante), fue necesario añadirle como -- preservador azida de sodio (1.0 mg/dl).

9.0 ACOPLAMIENTO DE LA GAMMA GLOBULINA A LAS PARTICULAS INERTES

9.1 PARTICULAS DE POLIACRILAMIDA

9.1.1 PREPARACION DE LAS MICROESFERAS DE POLIACRILAMIDA

Las microesferas de poliacrilamida, cuya preparación se describe a continuación, han sido diseñadas con el propósito de tener un microsoporte para cromatografía de afinidad, con características de intercambio sólo en la superficie del material, por ello es imposible el intercambio molecular dentro del material.

El procedimiento se efectuó en los pasos siguientes:

- a.- Formación de la mezcla de monómeros.
- b.- Emulsificación de la mezcla de monómeros.

c.- Disminución del tamaño del emulsoide por agitación.

d.- Polimerización del emulsoide por introducción de un indicador.

e.- Lavado.

a.- Se preparó la siguiente solución:

Acrylamida 3,000 mg

Bis acrilamida 150 mg

Amortiguador Tris:

HCl 0.1 M / pH 8.0 10 ml

Una vez que se disolvieron perfectamente estos reactivos, se adicionaron a la mezcla 50 mg de persulfato de amonio, se agitaron hasta completa disolución

b.- La mezcla de monómeros con el catalizador de persulfato de amonio se incorporó de inmediato a un vaso conteniendo 30 ml de aceite con las siguientes características: densidad = 0.850, viscosidad = 255/350 centistokes: fue necesario mantener una agitación continua.

c.- Este vaso de emulsificación se realizó en un agitador de alta velocidad, para obtener un producto de tamaño en micras.

La agitación se mantuvo en forma constante durante 5" y no fue necesaria la adición de detergentes o surfactantes al sistema, ya que el tamaño de las esferas fue menor de 50 micras.

d.- / Los 5' de agitación, se añadieron 50 microlitros de TEFED (sin diluir) y se continuó la agitación durante 30', después de los cuales se dejó reposar la emulsión durante dos horas.

e.- Una vez formadas la microesferas sólidas, se -- procedió a su lavado con los siguientes pasos:

- Se centrifugaron.
- Se eliminó la fase superior por succión.
- Se adicionó un volumen de hexano y se agitó.
- Se repitieron los dos primeros pasos.
- Se adicionó un volumen de hexano y un volumen de etanol: se agitó y centrifugó, repitiendo este -- paso tres veces.

- Se resuspendió el remanente de poliacrilamida -- en PBS 7,2 con Brij-35 al 1%. Esto requiere de agitación continua durante 16 horas a temperatura ambiente. Se realizaron dos cambios de 200 volúmenes.

- Se lavó el material repetidas veces con PBS. En caso de sospecha de algún remanente de Brij, se -- realizaron lavados repetidos con PBS-albúmina bovi-

na (1%) u finalmente se lavaba con PBS.

9.1.2 ACOPLAMIENTO DE LA GAMMA GLOBULINA (53; y 54)

- Se centrifugó a 3,000 rpm la suspensión de partículas obtenidas en el paso anterior.
- A 0.4 ml de paquete de partículas se le agregaron 12 mg de gamma globulinas en 10 ml de PBS 7.2 .
- Se agitó suavemente; se adicionó, gota a gota, -- 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5%.
- La suspensión de partículas control se trató de la misma manera, pero sin añadir la gamma globulina.
- Se agitó durante 90 minutos.
- Se lavó varias veces con PBS 7.2 .
- Una vez terminados los lavados (generalmente 8) -- se midió el paquete que se obtuvo u se resuspendió en PBS 7.2 en la cantidad necesaria para obtener -- una suspensión al 1%.

9.2 PARTICULAS DE LATEX

9.2.1 ACOPLAMIENTO DE LA GAMMA GLOBULINA

- Se utilizaron partículas de látex poliestireno de 0.85 a 1.5 micras de diámetro (POLYSTYROL- IFFEY K. - Nr. 230; Behring Institute).
- A partir de esta suspensión patrón, se preparó --

una dilución 1:10 con solución salina amortiguada - con fosfatos pH 7.2, la cual representó la suspensión de trabajo.

- A 4.0 ml de la suspensión de trabajo se le añadieron 12 mg de gamma globulinas en 10 ml de PBS 7.2, agitando suavemente y se adicionó, gota a gota, --- 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5%.

- El control se trató de la misma manera pero sin añadir la gamma globulina.

- Se agitó durante 90 minutos a una temperatura de 4° C.

- Los excedentes de glutaraldehído se eliminan por diálisis contra PBS 7.2, a 4° C, durante 24 horas.

- Se envasó, se etiquetó y se conservó a 4° C hasta su uso.

10.0 PRUEBAS DE AGLUTINACION CON PARTICULAS INERTES

10.1 POLIACRILAMIDA

10.1.1 MATERIAL

Placas excavadas de vidrio, transparentes

Microscopio esteroscópico

Hitadores de madera

Capilares

Suspensión de partículas adsorbidas

Suspensión de partículas control

Cuarto a temperatura de 4°C

Muestras de líquido cefalorraquídeo

10.1.2 METODO

- Se colocó en cada excavación de la placa, una gota de la muestra de líquido cefalorraquídeo.
- Se añadieron 2 gotas de la suspensión de partículas.
- Se agitó suavemente la placa.
- Con ayuda del microscopio estereoscópico se leuó la reacción, en un tiempo máximo de 3 minutos.
- La reacción siempre se realizó a 4°C.

10.1.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- a) suspensión homogéneanegativo
- b) grumos pequeñosdébil positivo
- c) grumos grandespositivo

10.2 LATEX

10.2.1 MATERIAL

Placas excavadas de fondo obscuro

Agitadores de madera

capilares

Suspensión de partículas adsorbidas

Suspensión de partículas control

Muestras de líquido cefalorraquídeo

10.2.2 METODO

- Se colocó en cada excavación de la placa una gota de la muestra de líquido cefalorraquídeo.
- Se añadió una gota de la suspensión de partículas.
- Se mezcló perfectamente con ayuda de los aplicadores de madera.
- Se agitó suavemente la placa.
- Se leyeron los resultados después de un minuto de agitación.

10.2.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- a) suspensión homogéneanegativo
- b) grumos pequeñosdébil positivo
- c) grumos grandespositivo

10.3 CONTROLES

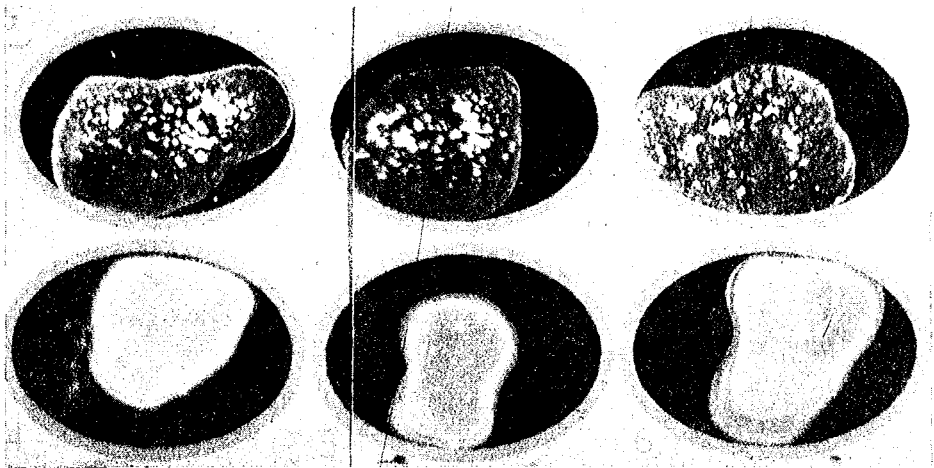
a) Control negativo.- las partículas fueron adsorbidas con gamma globulina normal de conejo. El oh

jetivo de este control fue la eliminación de resultados falsos positivos por la presencia de reacciones inespecíficas entre las gamma globulinas normales -- del conejo u componentes del líquido cefalorraquídeo humano.

b) Control negativo.- las partículas fueron tratadas de igual manera como lo describen las técnicas anteriores, con la variante de que no se les adicionaron las gamma globulinas. El propósito de esto fue el eliminar la posibilidad de reportar resultados -- falsos positivos por autoaglutinación.

c) Control positivo.- Partículas adsorbidas con gamma globulina obtenida de suero hiperinmune de conejo, haciéndolas reaccionar frente a los antígenos que dieron origen a los anticuerpos al ser inoculados en los conejos.

REACCION DE AGLUTINACION CON LATEX



FOTOGRAFIA 3

- Partículas adsorbidas con inmunoglobulinas anti-antígeno somático completo. Reacción 1= positiva, reacción 4= negativa.
- Partículas adsorbidas con inmunoglobulinas anti-antígeno fluido vesicular. Reacción 2= positiva, reacción 5= negativa.
- Partículas adsorbidas con inmunoglobulinas anti-antígeno excreciones y secreciones. Reacción 3 = no positiva, reacción 6= negativa

ABREVIATURAS

Part. = Partícula.

P.a.a. = Poliacrilamida.

anti-ASC = anti-antígeno somático completo

anti-ATD = anti-antígeno líquido vesicular

anti-AES = anti-antígeno excreciones u secreciones

Ig. = Inmunoglobulina.

H.A.I. = hemaglutinación indirecta.

I.F.I. = inmunofluorescencia indirecta.

pos. = reacción positiva.

neg. = reacción negativa.

R E S U L T A D O S

CONTROLES

Los controles negativos, en los cuales se utilizaron partículas inertes adsorbidas con gamma globulina normal de conejo y partículas inertes sin gamma globulina, respectivamente, siempre nos dieron resultados negativos con los líquidos cefalorraquídeos e incluso al hacerlos reaccionar con los antígenos empleados.

En cambio, las partículas adsorbidas con gamma globulina anti-Cysticercus cellulosae, obtenida de suero de conejo hiperinmunizado, utilizadas como controles positivos siempre se comportaron positivamente al reaccionar con los antígenos empleados.

Respecto a la utilización de partículas inertes adsorbidas con gamma globulina hiperinmune con los líquidos cefalorraquídeos problema, los resultados fueron los esperados en nuestra hipótesis, es decir, muy sugerentes de que en los líquidos cefalorraquídeos de los enfermos cisticercosos existe una gran cantidad de antígenos solubles capaces de ser detectados fácilmente.

Las partículas inertes de látex u poliacrilamida, --

adsorbidas con gamma globulina de conejos hiperinmunizados con tres antígenos de Cysticercus cellulosae, mostraron una sensibilidad muy similar entre sí, como puede observarse en el Cuadro 3.

Los resultados se desglosan a continuación:

COMPARACION DE AMBOS TIPOS DE PARTICULAS INERTES

En el Grupo I, compuesto de seis líquidos cefalorraquídeos provenientes de pacientes con cisticercosis comprobada del sistema nervioso central, tuvimos reacción fuertemente positiva con los dos tipos de partículas y las tres inmunoglobulinas utilizadas.

En el Grupo II, formado por líquidos cefalorraquídeos de dos pacientes con síndrome cerebeloso, los resultados fueron idénticos con ambas partículas: lo mismo sucedió en el Grupo III, compuesto por diecinueve individuos con diversos problemas neurológicos, en los cuales la cisticercosis fue descartada como etiología mediante diversos estudios de gabinete.

En el Grupo IV, compuesto por cien pacientes sospechosos de padecer cisticercosis del sistema nervioso central hubo, sin embargo, una pequeña diferencia (noliacrilamida 52% u látex 43%) no significativa desde el punto -

CUADRO 3

	partícula	pos.	neg.	total
gpo.	látex	6	0	6
<u>I</u>	p.a.a	6	0	6
gpo.	látex	1	1	2
<u>II</u>	p.a.a	1	1	2
gpo.	látex	1	18	19
<u>III</u>	p.a.a	1	18	19
gpo.	látex	57	43	100
<u>IV</u>	p.a.a	69	31	100

de vista estadístico (alfa obtenida menor al alfa establecida de 0.05) a favor de la poliacrilamida.

En cuanto a los anticuerros resultantes de la aplicación de los tres antígenos inoculados a conejos, los resultados obtenidos de los antígenos denominados fluido vesicular u excreciones u secreciones, produjeron aparentemente niveles idénticos de inmunoglobulinas en el conejo, como puede observarse en el cuadro 4, lo que sugiere fuertemente que se trata del mismo antígeno (fluido vesicular), liberado en condiciones de "subrimiento" por el cisticerco, u que está apoyado por las pruebas de inmunodifusión, en la que ambos antígenos dan bandas de identidad al reaccionar con un suero hiperinmune específico.

Al analizar el cuadro 4, vemos que los líquidos cefalorraquídeos obtenidos de pacientes sospechosos de cisticercosis reaccionaron prevalentemente con las partículas de poliacrilamida, especialmente con aquellas recubiertas con los anticuerros anti-fluido vesicular u anti-excreciones u secreciones, sin embargo, esta variación fue mínima u por lo tanto no significativa.

En este grupo por lo visto, cuando menos el 47% de los líquidos cefalorraquídeos provinieron de enfermos cisticercosos activos. Sin embargo, existe la posibilidad de que este lote proviniese de un número mayor de

enfermo, pero debido a la desnaturalización antigénica por la congelación y descongelación de los líquidos, así como por la contaminación bacteriana o de hongos, sufrida durante este proceso, ya que hablan sido utilizados -- brevemente por otros investigadores, algunos se hubiesen negativizado. Tampoco podemos descartar la influencia -- del tratamiento, ya que en algunos de los enfermos haio terapia, la reacción se hizo más débil llegando a negativizarse en uno de ellos.

COMPARACION CON HAI Y IFI

Cuando hicimos reaccionar a estas partículas recu-
biertas, contra seis líquidos cefalorraquídeos provinien-
tes de pacientes con diagnóstico de cisticercosis confir-
mada, los resultados fueron idénticos para los dos tipos
de partículas y los tres tipos de inmunoglobulinas, lo --
que sugiere la bondad de esta técnica (Cuadro 5), que --
dió una positividad de 6/6 (100%), especialmente cuando la
comparamos con hemaaglutinación e inmunofluorescencia in-
directas, que sólo dieron una positividad de 1/6 (16.66%),
Cuadro 6: en ambos casos el líquido cefalorraquídeo posi-
tivo fue diferente. llama la atención la gran carencia de
sensibilidad y especificidad de estas técnicas: sin embar-
ao, la casística es muy pequeña para llegar a conclusio-

CUADRO 6

	<i>Látex</i>	<i>P.a.a.</i>	<i>H.A.I.</i>	<i>I.F.I.</i>
<i>pos.</i>	6	6	1	1
<i>neg.</i>	0	0	0	0
<i>Total</i>	6	6	6	6

nes definitivas.

Examinando el Grupo II, formado por dos muestras de líquidos cefaloraquídeos provenientes de pacientes en los cuales se diagnosticó síndrome cerebeloso, encontramos resultados análogos en ambas partículas empleadas, adsorbidas con las inmunoglobulinas anti-Mis-ticercus cellulosae (Cuadro 7).

Realizando la comparación entre las técnicas de aglutinación con partículas inertes u de hemaglutinación indirecta, encontramos resultados semejantes, lo que confirmó nuestra sospecha de cisticercosis cerebral en uno de los casos, sospecha basada en la información que nos proporcionó la historia clínica del enfermo*. Por otro lado, la inmunofluorescencia indirecta nos indicó como --negativas ambas muestras. (Cuadro 8).

En los resultados obtenidos con diecinueve líquidos cefaloraquídeos provenientes de pacientes neurológicos, --no cisticercosos, (Cuadro 9) no existió variación al---emplear, ya sea, partículas de látex o de poliacrilonida recubiertas con los diferentes tipos de anticuerpos----- (1 / 19).

*Las historias clínicas nos fueron proporcionadas por el Dr. Rosma Martínez del cabellón de Neurología del Hospital General de la ciudad de México.

CUADRO 8

	<i>Látex</i>	<i>P.a.a.</i>	<i>H.A.I.</i>	<i>I.F.I.</i>
<i>pos.</i>	1	1	1	0
<i>neg.</i>	1	1	1	0
<i>Total</i>	2	2	2	2

CUADRO 10

	<i>Látex</i>	<i>P.a.a.</i>	<i>H.A.I.</i>	<i>I.F.I.</i>
<i>pos.</i>	1	1	2	1
<i>neg.</i>	18	18	17	18
<i>Total</i>	19	19	19	19

En cuanto a las reacciones inespecíficas, en este grupo de líquidos cefalorraquídeos encontramos un 5.2% (1/19) de falsas positivas, tanto con nuestra técnica como con la de inmunofluorescencia indirecta: en cambio, la hemaglutinación indirecta presentó 11.7% (2/19) de resultados falsos positivos. Cuadro 10.

Al comparar estadísticamente los resultados obtenidos en nuestra técnica con los de hemaglutinación indirecta, observamos una mayor reactividad, con diferencia significativa (alfa obtenida, mayor que el alfa establecida de 0.05), a favor de la aglutinación con partículas inertes.

Cuadro 11.

Para conocer la diferencia real de reactividad entre las técnicas de aglutinación con partículas inertes, inmunofluorescencia u hemaglutinación indirectas, se tomaron 19 muestras al azar del Grupo de 100, u se enviaron al Instituto de Salubridad u Enfermedades Tropicales, donde se estudiaron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, al mismo tiempo que nosotros realizábamos las demás pruebas.

Los resultados presentados en el Cuadro 12, mostraron que la técnica de aglutinación con partículas inertes fue mucho más sensible que las otras técnicas, especialmente --

cuando se realizó con partículas de látex.

La reactividad de nuestra técnica fue de 77.7% en este lote estudiado, contra 27.7% y 38.8% obtenidos con la de inmunofluorescencia y la de hemaglutinación indirectas, respectivamente.

CUADRO 11

	<i>H.A.I.</i>	<i>Látex</i>	<i>P.a.a.</i>
<i>pos.</i>	31	57	69
<i>neg.</i>	69	43	31
<i>Total</i>	100	100	100



CUADRO 12

	<i>Látex</i>	<i>D.a.a.</i>	<i>H.A.I.</i>	<i>J.F.I.</i>
(%) <i>pos.</i>	77.7	44.4	27.7	38.8
(%) <i>neg.</i>	22.3	55.6	72.3	61.2
<i>Total</i>	100	100	100	100

CONCLUSIONES

- La prueba de aglutinación con partículas inertes para la detección de antígenos solubles de Ostercercus cellulosa en líquido cefalorraquídeo carece de resultados falsos positivos por autoaglutinación de las partículas en el medio de reacción, así como de reacciones inespecíficas entre gamma globulinas normales de conejo y componentes, naturales o no, del líquido cefalorraquídeo humano.

- El empleo de ambas partículas presenta una reactividad semejante, sin diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.

- Existe diferencia de reactividad con los tres tipos de inmunoglobulinas empleados, siendo menor en la anti-antígeno somático completo y mayor e idéntica en los anticuerpos anti-fluido vesicular y anti-excreciones u secreciones.

- Debido a la semejanza en reactividad entre las partículas adsorbidas con anticuerpos anti-fluido vesicular u anti-excreciones y secreciones y a su presencia en los resultados obtenidos con las técnicas de precipitación en gel (inmunodifusión radial), suponemos que los antígenos del flul-

do vesicular u anti-escreciones u secreciones u apoyandonos en los resultados obtenidos con las técnicas de precipitación en gel (inmunodifusión radial), suponemos que los antígenos del fluido vesicular u de excreciones u secreciones de Gyaticercus cellulosa presentan componentes antígenicos muy similares u aparentemente idénticos.

-La bondad de nuestra técnica se demuestra en la ausencia de resultados falsos negativos.

La detección de antígenos solubles hace posible evidenciar casos de cisticercosis del sistema nervioso central no revelados por técnicas de gabinete u/o la serología tradicional.

-En cuanto a resultados falsos positivos en la aglutinación con partículas inertes, estos fueron menores que los encontrados con la hemaglutinación indirecta e idénticos a los de inmunofluorescencia indirecta, en nuestro trabajo.

Estadísticamente se concluye que la técnica desarrollada ofrece una reactividad mucho mayor que las técnicas

de inmunofluorescencia u hemaqlutinação indirectas, - especialmente si se realiza con partículas de látex.

-En cuanto a las desventajas de esta técnica, hacemos notar que la reacción con partículas de poliacrilamida es necesario llevarla a cabo a 4°C u utilizar microscopio estereoscópico para su lectura, lo que dificulta su empleo; con respecto a las reacciones con partículas de látex, no encontramos desventajas.

Debido a la sensibilidad, especificidad, facilidad de preparación u desarrollo de la técnica de aglutinación con partículas de látex, así como a su bajo costo, proponemos su uso en la clínica de rutina, consultorio médico u áreas rurales u suburbanas para el diagnóstico de esta temible parasitosis.

-Basándonos en los diversos estudios realizados --- comprobamos la existencia de antígenos solubles de Cysticercus cellulosae, liberados al medio en concentraciones suficientes para ser detectados con nuestra técnica.

B I L B I O G R A F I A

- 1.- Escobar, I. 1952. Diagnostico De la Cisticercosis ---
Cerebral. Arch. MEX. Neurol. Psiq., 1: (149):167.
- 2.- Belding, D.L. 1965. Textbook of Parasitology. Third
Edition. Appleton-Century-Cuts. Inc. U.S.A.: 609-618 u
1180-1203.
- 3.- Maldonado, J.F. 1965. Helminthiasis del Hombre en A-
mérica. Ed. Cent. Med. Barc.: 435-437.
- 4.- Flisser, S. A. 1978. Inmunología de la Cisticercosis
Humana. (Tesis). Instituto de Investigaciones Biomédicas
I.N.A.M.
- 5.- Padilla De Alba, J. 1977. Oftalmología fundamental.
primera edición. Ed. Fco. Méndez Cervantes. México: 433.
- 6.- Robles, C. 1974. Consideraciones acerca de cien casos
de tumor cerebral operados. Prensa Médica Mexicana. 6: 67-68.
- 7.- Puig-Solanes, M. u Vergara, E.L. 1946. Nota acerca del

cisticercos libre en el vitreo. Arch. Soc. evit. Neg. Méx., : 232.

8.- Nieto, D. 1948. Diagnóstico de la cisticercosis del sistema nervioso. Prev. Med. Méx., 13: 226-230.

9.- Nieto, D. 1956. Cisticercosis of the nervous system. Diagnosis by means in the spinal fluid complement fixation test. Neurology, 6 : 725-728.

10.- Zenteno, A.G. 1965. Aspectos neuroquirúrgicos de dos mil enfermos. Rev. Med. Hosp. Gral. Méx., 13: 226

11.- Zenteno, A. Martínez, B. y Biagi, F. 1961. Observaciones sobre la cisticercosis humana. Rev. Fac. Med. Méx., 3: 617-633.

12.- Zenteno, A.G. 1968. Sintomatología de la cisticercosis humana. Rev. Fac. Med. Méx., 11: 41-44.

13.- Paviela, M. y cols. 1972. Cisticercosis cerebral. Estudio de sesenta y ocho casos de autopsia. Patología. 10: 27-40.

- 14.- Padilla De L., J. 1975. Tratamiento de la cisticercosis subretiniana por fotocoagulación con lámpara de xenón. An.Soc.Méx.Oft., séptima época, 49:120-121.
- 15.- Sánchez, B.L.1967. Tratamiento quirúrgico de la cisticercosis ocular. Arch. Asoc. evit. Ceg.Méx.: 9 : 183-185.
- 16.- López-Hernández, A. y Edillo-G., J. 1976. Cisticercosis intracraneana en los niños. Análisis de cuarenta u ocho casos. Rev.Med.Pediat., 45: 277-285.
- 17.- Cuevas, C.D. 1971. Cisticercosis ocular. Arch. Asoc. p. evit. Ceg. Méx 13: 492
- 18.- Orain, V. u Faust. E. 1978. Parasitología Clínica. Ed. Salvat. México, D.F. : 502-509.
- 19.- Estadísticas Vitales de los Estados Unidos Mexicanos. 1973. SSA.
- 20.- Tan, J. u Velasco, C.O. 1971. Parasitología para estudiantes de Medicina. primera edición. Ed. Tanve.H.M. L.M. México, D.F. : 475-479.

- 21.- Noble, E. y Noble, G. 1976. Parasitology. cuarta edición. Lea & Febiger. U.S.A.: 623-627.
- 22.- Soberón, G. y Peláez, D. 1959. Parasitología Médica u Patología Tropical. Ed. Francisco Méndez G. : 263-265.
- 23.- Cheng, F.C. 1973. General Parasitology. Ed. Academic Press. U.S. A. and London.: 517.
- 24.- Martínez Báez M. 1975. Mecanismos de infección en diversas parasitosis. Rev. Salud. Pub., 3 : 325-330.
- 25.- Beltrán, H.F. 1971. Mecanismos de inmunidad en -- cisticercosis. Publicazione dell' instituto Italo-latino Americano, : 517-521.
- 26.- Peláez, G. y cols. 1970. Texto de Parasitología. segunda edición. Prev. Med. Méx. México, D.F. : 835-837.
- 27.- González Barranco, D. 1978. Indirect Immunofluorescence reaction in cisticercosis. Arch. Inv. Med. Méx., 9(1):51-58.
- 28.- Soullé, C. 1971. La cisticercose bovine experimental: aspects parasitologique, immunologique et hematologique.

Revue. Med. Vet., 122: 1247-1357.

29.- Flisser, A. 1978. Antígenos u anticuerpos que participan en la respuesta inmune del hombre a la cisticercosis. Reporte presentado en el III Congreso Nacional de Parasitología. Monterrey, N.L. México.

30.- Flisser, A. 1978. Inmunidad a la cisticercosis. Reporte presentado en el III Congreso Nacional de Parasitología. Monterrey, N.L. México.

31.- Bardina, P. 1979. Eosinofilia de los cestodos. Inmunolog Clin., 3: 79-85.

32.- Molina Pasquel J. 1966. Intervenciones quirúrgicas del sistema nervioso central. Rev. Salud. Pub. 3 : 271-274.

33.- Proctor, E.M. 1966. The serological diagnosis of cisticercosis. Ann Trop. Med. and Parasitol., 60: 146-151.

34.- Weinberg, citado por Huhn, A. 1956. Die Zisticercose des Gehirns und Rückenmarkes, Fortsch. Neurol. Psychiat. 24: 7-27.

35.- Biagi, F. 1961. Estudio de tres reacciones serológicas

cas en el diagnóstico de la cisticercosis. Rev. Med. Hosp. Gral. , 25: 501-508.

36.- Lennette, E.H. y cols. 1974. Manual of clinical -- Microbiology. 2nd. ed., U.S.A. : 645-663.

37.- Rudzewski, A.K. 1975. Comparison of serological test for human cysticercosis by antibody, and agar gel precipitation test. J. Parasitol. , 61: 154-155.

38.- Biagi, F. y Tay, J. 1958. A precipitation reaction for the diagnosis of cysticercosis. Am.J.Trop. Med. Hyg. , 7: 63-65.

39.- Petithory, L. 1971. Le diagnostic par immunoelectophorese et Ouchterlony de la cisticercose. Encephale , 60 : 24-35.

40.- Gutiérrez, O.M. y cols. 1978. Métodos inmunoserológicos para el diagnóstico de los parasitos. Fac. de Medicina. U.N.A.M. México, D.F.

41.- Arambulo, P. 1978. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) . Acta. Trop. , 35: 63-67.

- 42.- Cabrera, T.N. 1977. Prueba de floculación con bentonita para el diagnóstico de Trichinella spiralis. (Tesis). Fac. de Ciencias. U.N.A.M. México, D.F.
- 43.- Morris, A. 1971. Charcoal particle agglutination -- test for detection of antibody to Cryptococcus neoformans. Amer. J. Clin. Path. , 56: 354-359.
- 44.- Norman, B. Morris, R. et al. 1966. Detection of Cryptococcus neoformans antigen in body fluid by latex particle agglutination. Amer. J. Clin. Path., 50: 250-261.
- 45.- Aienza, F. 1969. Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la cisticercosis ovina. I; Prueba de bentonita. Rev. Iber. Parasitol., 29: 36-43.
- 46.- Gómez, G. 1969. Empleo de partículas inertes para el diagnóstico de la cisticercosis ovina. II Prueba de látex. Rev. Iber. Parasitol., 29: ,(2/3): 191-193.
- 47.- Quintero, M.G.E. 1974. Estudio de la aglutinación del látex como ayuda en el diagnóstico de cisticercosis. (Tesis) E.N.C.B. I.P.N. México, D.F.

48.- Beltrán, F. y cols. 1974. Preparación de antígenos, mediante el método de la Sacarosa-Acetona.

49.- Lowry, O.H. y cols. 1951. Protein measurement --- with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 195.

50.- Morrison, R. 1976. Química Orgánica. Tercera edición. Fondo Educativo Interamericano. : 1026.

51.- Acosta, S.M. 1979. Manual de practicas de laboratorio de Inmunología. Fac. de Química. U.N.A.M. México, D.F.

52.- Dekhninger, A.L. 1977. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. España. : 765-768.

53.- Arameas, S. y cols. 1969. The cross-linking of -- proteins with Glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. Immunochemistry , 6: 53-66.

54.- Arameas, S. y cols. 1969. Glutaraldehyde Oxanuric Chloride and tetrazotized o- Vanisidine as Test. Immunochemistry , 6 : 67-69.