

11261
209
6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
FACULTAD DE MEDICINA

"HIMENOLEPIASIS EXPERIMENTAL Y HUMANA.
ASPECTOS INMUNOLOGICOS Y SEROLOGICOS."

TESIS QUE PRESENTA

ANA LORENA GODINEZ HANA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS. AREA PARASITOLOGIA

MEXICO, D.F. 1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	50
RESUMEN.....	62
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	65

INTRODUCCION

Hymenolepis nana es uno de los céstodos más pequeños y el que más comunmente parasita al hombre, con más frecuencia a niños; también es parásito de ratones (Chandler y Read, 1961). Su nombre deriva del griego Hymen que significa membrana y Lepis cápsula. Fué descubierto por Bilharz en 1851 en el intestino delgado de un jóven en El Cairo, Egipto. Grassi y Ronelli de 1887 a 1892 estudiaron su ciclo biológico y encontraron que no requiere huésped intermediario. Se le encuentra en casi todo el mundo, prevaleciendo en climas cálidos. En países americanos los índices de Hymenolepiasis son elevados, pues en promedio se le encuentra en el 25% de la población. En México, es la helmintiasis más común de las zonas templadas, se le encuentra hasta en un 27% de los niños, siendo rara en adultos (Tay y cols. 1985).

Su ciclo biológico es único, en el sentido de que el huésped intermediario es opcional; Hunninen (1935) lo juzgó como un avance evolutivo importante. El ciclo biológico directo es una modificación reciente del ancestral que ocurre en dos huéspedes, y que se observa en otras especies de Hymenolepis ya que el cisticercoide de H. nana puede desarrollarse normalmente en pulgas y escarabajos. La naturaleza facultativa de los cisticercoides de H. nana se puede explicar debido a que éstos logran desarrollarse a

mayores temperaturas a diferencia de lo observado en otras especies, como H. diminuta. La ingestión de huevos por vía oral es la ruta más frecuente de infección, aunque la ingestión de escarabajos o pulgas parasitadas es otro mecanismo para adquirir la parasitosis (Schmidt, 1977).

También se acepta la autoinfección endógena (Heyneman 1962a y b) siendo esta la causante de las parasitosis masivas observadas en niños y probablemente de las fallas terapéuticas que con mucha frecuencia se presentan en la práctica clínica (Alvarez-Chacón comunicación personal). Los fármacos antiparasitarios más comunmente empleados, entre ellos el Mebendazol, Albendazol y Tiabendazol, son incapaces en muchas ocasiones de destruir el cisticercoide, permitiendo la continuación del ciclo biológico del parásito (Novak y Evans, 1981; Evans y cols., 1980).

Hasta hace algunos años se hablaba de la existencia de una variedad fraterna, que exclusivamente parasitaba al hombre, sin embargo, se ha comprobado que tanto el hombre como los murinos pueden infectarse con la misma Hymenolepis nana, además de existir una elevada prevalencia de Himenolepiasis humana en comunidades donde la población de murinos es muy alta (Schmidt 1977).

El adulto de H. nana mide en promedio 4 cm de largo por 1 mm de ancho. Posee un escólex de 300 um, con rosetelo retráctil una sola corona de ganchos y 4 ventosas. Cada

gancho mide aproximadamente 16 μm . Los proglótidos son más anchos que largos, y a partir del cuello se encuentran en este orden los inmaduros, los maduros y los grávidos. Cada individuo adulto tiene alrededor de 200 proglótidos; los grávidos generalmente se desintegran y los huevos se mezclan con la materia fecal, por lo que es difícil encontrar proglótidos o helmintos adultos expulsados con las heces. Los poros genitales son unilaterales y cada proglótido maduro contiene 3 testículos y un ovario bilobulado. El huevo mide de 40 a 50 μm y su embrióforo es de 16 a 20 μm con protuberancias en ambos extremos desde donde se desarrollan filamentos polares largos y delicados que se encuentran entre la oncosfera y la cubierta externa (Schmidt, 1977).

Por microscopía electrónica se ha observado que en la oncosfera existe una cubierta externa que yace sobre una membrana basal, bajo la cual se encuentran los músculos. De estos se distinguen los somáticos y los que mueven a los ganchos. Estos últimos terminan en el tejido conectivo que rodea las bases de los ganchos. Posee glándulas de penetración, en cuyo interior se observan gránulos densos, los cuales están limitados por una membrana. Se ha sugerido que liberan sustancias citolíticas, con función lubricante para proteger a la oncosfera de los jugos digestivos y pancreáticos. Las glándulas de penetración son unicelulares

sin ducto y se cree que al liberar parte de su contenido, liberan citoplasma (Furukawa y cols., 1977).

El tamaño del adulto es inversamente proporcional al número de individuos. En infecciones masivas, los adultos son muy pequeños y viceversa. A esto se le conoce como "efecto de aglomeración" (Chandler y Read, 1961).

Cuando los huevos de H. nana son ingeridos por un huésped vertebrado, las oncosferas se liberan de su embrióforo en el lumen intestinal y penetran las vellosidades en aproximadamente 30 minutos, facilitado esto por sus ganchos y la secreción de la glándula de penetración (Miyazato y cols., 1977 a,b); se transforman en cisticercoides en un término de 96 a 140 horas; en cambio, en el huésped artrópodo se requieren de 12 a 14 días. A este lapso se le conoce como Fase Tisular. Los cisticercoides maduros escapan nuevamente a la luz intestinal y maduran hasta llegar a ser adultos. A este estadio se le conoce como Fase luminal. Inoue y cols. (1979) han mostrado que un pequeño número de oncosferas pueden migrar del tejido intestinal hasta los ganglios mesentéricos o hígado en donde se transforman en cisticercoides, pero no prosiguen su desarrollo y mueren en alrededor de 3 semanas. La larva cisticercoide se desarrolla también en el hemocole de varios insectos, entre ellos Tenebrio, Tribolium, Ctenocephalides y

Pulex (Faust y cols. 1981). En este caso, cuando los cisticercoides son ingeridos junto con sus huéspedes intermediarios por el huésped definitivo, crecen hasta llegar a adultos sin invadir los tejidos del mismo. La infección producida por la ingestión de huevos se conoce como ciclo directo y a la producida por la ingestión de cisticercoides como ciclo indirecto. DiConza (1969) y Weinmann, (1969) observaron que las oncosferas pueden transformarse en cisticercoides cuando los huevos liberados de sus bloques embrioforales se inyectan experimentalmente en sitios ectópicos de varios vertebrados. Estos viven pocas semanas y mueren después, mostrando su especificidad por el hábitat para su sobrevivencia.

Varios autores han observado que en ratones, la infección oral con huevos induce inmunidad, mientras que con una infección por la misma vía con cisticercoides no se induce (Hearin, 1941; Heyneman 1962 a y b; Weinman, 1964; Ito, 1978; Ito y cols., 1978; Furukawa y cols., 1979). Esta inmunidad es altamente efectiva contra la infección oral o por vía subcutánea con huevos (DiConza, 1970; Furukawa, 1971, Furukawa y cols. 1981). En ambos casos se interrumpe el desarrollo de oncosfera a cisticercoide. Cuando se produce una infección con cisticercoides, no se induce una protección contra el desafío con huevos o cisticercoides; sin embargo,

cuando ocurre autoinfección con la concomitante fase tisular de oncosferas recién liberadas de una segunda generación, la inmunidad es tan efectiva como la de una infección inicial con huevos (Heyneman, 1962 a). Parece ser evidente entonces, que se requiere un contacto de la larva y del tejido intestinal para lograr una inmunidad duradera (Furukawa 1983).

Experimentalmente, se ha observado que la adquisición de protección después de la infección con huevos es bastante rápida. Friedberg y cols., (1979) encontraron una cierta protección 12 horas después de la infección, siendo muy alta a las 48 horas. Sin embargo, las larvas cisticercoides derivadas de la infección inicial, pueden crecer hasta adultos y persistir por largo tiempo a pesar de que el huésped esté inmune a un desafío con huevos (Ito y Yamamoto, 1976, 1977; Ito, 1978; Ito y cols., 1978). Una característica interesante es de que se requiere un número pequeño de huevos para lograr este estado inmune ya que una sola larva, es capaz de inducir en los ratones inmunidad contra el desafío con huevos.

Por lo tanto, el mecanismo efector de la respuesta temprana que se adquiere después de unos días de la infección con huevos, puede ser funcional sin la participación de anticuerpos séricos en títulos altos. Por otro lado se ha

sugerido que la inmunidad celular podría ser también un mecanismo efector que operaría durante el periodo prepatente, sin excluir la participación de anticuerpos producidos localmente (Asano y cols., 1982; Ito y cols., 1986).

Por esto, se ha propuesto que la respuesta inmune actúa selectivamente sobre las diferentes fases de desarrollo de H. nana en base a diferencias en su inmunogenicidad. Así, la oncosfera es blanco de la respuesta temprana, el cisticercoide luminal o juvenil desenquistado es blanco de la respuesta tardía y el adulto luminal lo es de la respuesta de expulsión de adulto, (Ito, 1977, 1984; Ito y cols. 1978; Kano e Ito, 1983).

La autoinfección que ocurre en ciertas cepas de ratones a los que se les administra inicialmente cisticercoides, parece no ser el resultado de una pobre respuesta inmune en la fase luminal de H. nana sino a un retraso en la respuesta inmune dirigida contra la fase luminal (respuesta tardía), con el resultado de que una segunda generación de parásitos puede madurar normalmente (Ito, 1981).

No se ha llegado a un acuerdo respecto a si la inmunidad en la himenolepiasis es local, sistémica o de ambos tipos. Los resultados experimentales indican que la infección oral conlleva a respuestas sistémicas, es decir anticuerpos séricos en títulos elevados después de la infección oral

(Weinemann, 1966; Di Conza, 1969; Ito, 1975, 1977, 1984; Furukawa y cols., 1984). In vitro se ha observado que los anticuerpos se adhieren a la superficie de las oncosferas vivas, produciendo aglutinación de las mismas en ausencia de complemento; sin embargo, no hay evidencias de que el suero inmune ejerza efecto parasiticida in vitro. Sin embargo utilizando grandes volúmenes de suero puede transferirse inmunidad en contra de las oncosferas con buenos resultados (Asano y cols., 1982). Los anticuerpos han sido caracterizados como IgG1 e IgG2, con una pequeña proporción de IgE e IgM. Alcanzan su máximo título 3 ó 4 semanas después de una infección primaria y se incrementan rápidamente después de una infección secundaria.

Larsh (1942), observó que ratones de madres infectadas con H. nana estaban protegidos entre 37 y 41 días después de nacidos, sugiriendo el paso de anticuerpos protectores a través de la leche o in utero.

Otra evidencia de inmunidad sistémica ha sido presentada por Furukawa (1971, 1974); Furukawa y cols., (1979). Las células linfoides esplénicas se adhirieron a las oncosferas in vitro antes de la aparición de anticuerpos séricos, y cuando la inmunidad eliminaba larvas intestinales, también era efectiva para eliminar larvas subcutáneas.

Los intentos por lograr inmunidad protectora por

inmunización artificial no han sido del todo satisfactorios. Okamoto y cols. (1974, 1980) han logrado que ratones muy jóvenes se vuelvan inmunes al desafío oral con huevos después de la inoculación subcutánea de oncosferas vivas; por el contrario, en ratones adultos indujeron protección después de infección oral, pero no después de inoculación parenteral. Larsh (1944) y Coleman y cols. (1968) indujeron un alto grado de protección después de la inyección repetida de extractos obtenidos de adultos recién macerados, sin embargo, estos autores sugieren que se requieren inyecciones frecuentes con cantidades grandes de antígeno para lograr protección y que la inmunidad lograda no siempre da por resultado la eliminación completa de las larvas provenientes del desafío. Furukawa y cols., (1979) observaron que la inyección subcutánea de un gran número de oncosferas vivas, indujo protección suficiente para reducir el número de cisticercoides después del desafío con huevos. Sin embargo, esta inmunidad es mucho más lenta en desarrollarse y menos eficiente si se compara con la inducida después de una infección oral.

Varios estudios han producido evidencias de que la respuesta hacia H. nana es tino dependiente. En este sentido, Okamoto (1967) timectomizó ratones recién nacidos, los infectó y desafió, mostrando que más de la mitad no habían

demostrado inmunidad. Hashimoto (1972) comprobó que el suero antitimocito de ratón abolía completamente la respuesta inmune hacia H. nana. Friedberg y cols. (1967) irradiaron ratones y les transplantaron células esplénicas provenientes de donadores inmunes y no inmunes. El número de parásitos que se desarrolló fué menor en aquellos que recibieron células de ratones inmunizados.

Aún no existe acuerdo general sobre el mecanismo de expulsión de los helmintos intestinales (Barth y cols., 1966). Por ejemplo, Hopkins y cols., (1972) sostienen que H. diminuta se desestrobiliza y es arrojada del ratón por mecanismos inmunes. No hay información del sitio del daño inicial o de los cambios metabólicos que conllevan a la desestrobilización. Befus y Threadgold (1975), creen que la inmunidad del huésped actúa dañando el tegumento de los mismos que tiene funciones digestivas y de absorción, por lo tanto podría ser un sitio ideal para el ataque inmunológico (Befus y Threadgold, 1975). Estos mismos autores han observado áreas opacas de tamaño variable en H. diminuta, inicialmente en la región del cuello y luego aumentan en número hasta que ocurre la expulsión. Proponen que estos sitios sean blancos de procesos inmunes.

A pesar de que H. nana parasita con gran frecuencia al hombre, se ha prestado poca atención al estudio de la himenolepiasis humana, sobre todo en el aspecto inmunológico

(Faust, 1981; Chandler y Read, 1961; Tay y cols., 1985; Pérez, 1976; Domínguez, 1980).

En resumen, y por lo anteriormente citado, en la himenolepiasis experimental, es posible inducir un estado de inmunidad ya sea por infección con huevos o bien por la inoculación parenteral de homogenados del parásito adulto (Larsh, 1944; Coleman y cols., 1968). Por otro lado, las evidencias señalan que la respuesta inmune actúa selectivamente sobre las diferentes fases evolutivas de H. nana, probablemente debido a diferencias en su inmunogenicidad. Resulta evidente que en estos estudios se haya prestado escasa o nula atención a la identificación y localización topográfica de los antígenos del parásito responsables de inducir inmunidad, y llama la atención que no se hayan utilizado extractos solubles de H. nana para inducir protección. En este sentido, los experimentos de Molinari y cols. (1983b) aportan evidencias de que en el cerdo, es posible inducir una respuesta inmune que destruye in situ a la forma larvaria de Taenia solium previamente instalada en los tejidos del huésped, por la inyección parenteral de extractos solubles de cisticercos. Finalmente, no hay en la literatura reportes que indiquen la existencia de anticuerpos séricos o de otros mecanismos efectores de la respuesta inmune en el hombre que expliquen la relación huésped-parásito en éste.

En base a estos antecedentes, se plantearon las siguientes hipótesis: a) Si con extractos crudos o huevos de H. nana se logra inducir inmunidad contra este parásito debe inducirse inmunidad utilizando extractos solubles de diferentes regiones del parásito, incluyendo antígenos obtenidos de las oncosferas.

b) Del mismo modo, ⁹ hay evidencias de inmunidad contra la fase luminal de H. nana adulta (Ito, 1981) debe ser factible que la inoculación parenteral de antígenos solubles induzca una respuesta inmune que se manifieste con la expulsión de los helmintos adultos ya instalados en la luz intestinal de los ratones. Por último, c) Si existen efectores humorales de la respuesta inmune en el humano, debe utilizarse para su detección una técnica de alta sensibilidad fisicoquímica como la ELISA, en virtud de que la magnitud de la infección por H. nana es leve (Pérez, 1976; Domínguez, 1980).

Para ^{contrastar} contrarrestar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Inducir inmunidad en ratón contra la infección oral con huevos de H. nana utilizando antígenos de diferentes partes anatómicas del parásito adulto.

Inducir inmunidad en contra el parásito adulto en el ratón mediante el uso de estos antígenos para conseguir la expulsión de los helmintos.

Determinar la eficiencia de estos antígenos para detectar anticuerpos séricos en niños con himenolepiasis, mediante la estandarización y evaluación de una prueba serológica.

MATERIALES Y METODOS.

Animales.

Se utilizaron ratones machos cepa CD-1 de 5 semanas de edad. Para tener la certeza de que esta población no había estado en contacto con H. nana se siguió el procedimiento descrito por Ito (1975) con ligeras modificaciones: se solicitaron al bioterio hembras de 10 días de gestación a las que se les realizó exámen coproparasitoscópico según técnica de Faust (Salazar y De Haro, 1980) por 3 días consecutivos. Se utilizaron para el estudio, sólo las parasitológicamente negativas y además se les administró media tableta (250 mg) de Niclosamida* por vía oral mediante cánula durante 7 días consecutivos. Desde el momento de su recepción, se colocaron en jaulas lavadas meticulosamente y con aserrín esterilizado en autoclave. Las crías se mantuvieron bajo estas últimas condiciones con agua y Purina ad-libitum. A las 5 semanas se destetaron. Las madres se sacrificaron y el intestino delgado se examinó en todo su trayecto para verificar que no estuviera parasitado por H. nana. Las crías se reprodujeron entre sí y los machos de la primera generación se utilizaron para la experimentación. Periódicamente se sacrificó a un animal escogido al azar para verificar que no estuviera parasitado. Durante todo el tiempo que duró la experimentación se mantuvo esta población de ratones libres de H. nana.

*Overoid, Laboratorios Valdecasas.

Obtención de parásitos.

Los parásitos utilizados para la preparación de los extractos antigénicos solubles se obtuvieron de ratones infectados naturalmente, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se sacrificaron por decapitación y el tercio distal del intestino delgado se separó, se colocó en una caja de Petri con solución salina (NaCl 0.15M, pH 6.6) y se abrió en toda su longitud con tijeras. Para liberar los parásitos, el intestino se agitó suavemente y los gusanos se transfirieron a una caja de Petri con pinzas, cuidando de no lesionar el escólex. Se lavaron tres veces con solución salina 0.15 M estéril y se dejaron en incubación a temperatura ambiente, en solución salina adicionada con 1,000 UI/ml de Penicilina sódica y 1 mg/ml de Estreptomicina (Lakeside) durante 45 minutos. Después se lavaron nuevamente tres veces con solución salina 0.15 M.

Obtención de Antígenos.-

Antígenos Totales. (AT) Estos antígenos se prepararon a partir de los helmintos adultos completos, utilizando una modificación de los métodos descritos por Tato y cols. (1979) y Molinari y cols., (1983 a). Se molieron 25 gramos de parásitos en un mortero estéril conteniendo arena de vidrio y 4 ml del amortiguador de extracción (Fosfatos, Desoxicolato,

Sacarosa) (NaH_2PO_4 10 mM; sacarosa 250 mM; MgCl_2 12 mM; Desoxicolato de Sodio (DOC) 0.4% y KCl 0.1 M; pH 7.2 (FDS) durante 30 minutos hasta lograr la mayor desintegración posible. Se agregó FDS hasta completar un volumen de 20 ml y la suspensión se transfirió a un vial estéril donde se le añadió DNAsa 20 ug/ml (Merck) incubando a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. Pasado este tiempo, la suspensión se centrifugó a 12,000 x g en centrifuga Sorvall RC-2B, el sobrenadante se obtuvo por decantación y se esterilizó en filtros Millipore (Millipore, Corp. USA) de 0.22 μm de poro. El filtrado se dializó exhaustivamente contra FDS sin DOC ni Sacarosa en frío durante cinco días, haciendo dos cambios cada día, centrifugando después a 12,000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y se repartió en alícuotas, se liofilizó y almacenó a 4°C hasta su uso.

Antígenos Cefálicos (AC). Este material se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, pero en esta ocasión, a los helmintos se les eliminó previamente por disección microscópica, la porción del estróbilo que contiene los proglótidos grávidos y los proglótidos maduros.

Antígeno de Oncosferas y bloques embrionales OB y de Proglótidos grávidos (PG). De las porciones del estróbilo con los proglótidos grávidos, se obtuvieron los huevos de H. nana

para la preparación de este extracto. Los proglótidos grávidos se sometieron al lavado ya descrito y se trituraron en mortero con arena de vidrio y 20 ml de solución salina (0.15M) estéril durante 20 minutos. La suspensión se transfirió y se centrifugó a 2,500 rpm (950 xg) durante 20 minutos. El sobrenadante se recolectó y el sedimento se resuspendió en 20 ml. de Solución Salina Isotónica 0.15M. Este paso se repitió 2 veces. Los sobrenadantes se liofilizaron y se denominó Antígeno de Proglótidos grávidos (PG). El sedimento se resuspendió en 20 ml de FDS y se sonicó con un sonicador MSE, subiendo progresivamente el amperaje hasta lograr 2 Amp. Se mantuvo así durante 2 minutos por uno de descanso. Esta operación se repitió siete veces hasta lograr la liberación de la mayoría de las oncosferas (Rajaskeriah y cols. 1980b), verificando microscópicamente después de cada ciclo de sonicación. El material se colocó en baño maría a 37°C y se añadió DNasa (20 ug/ml) incubando durante 20 minutos con agitación constante. El resto del procedimiento fue igual al descrito anteriormente.

Estimación de Proteínas

El contenido de proteínas totales de los extractos antigénicos se determinó siguiendo el método de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Inmunizaciones

Para el primer experimento, se inmunizaron lotes de 6 ratones con 30 o 60 ug de proteína de los antígenos cefálicos, totales, de OB y PG disueltos en 0.1 ml de solución salina (0.15M) estéril y mezclados con 0.1 ml de hidróxido de aluminio como adyuvante por vía subcutánea. Se administró un refuerzo 7 días después de la primera inmunización. Los ratones control se inocularon únicamente con solución salina isotónica y adyuvante. Transcurridas tres semanas de la segunda inoculación se administraron aproximadamente 2,000 huevos a cada ratón por vía oral utilizando una jeringa con aguja sin punta directamente en la faringe siguiendo la metodología de Furukawa y cols., (1984). Los huevos fueron liberados previamente de sus bloques embrioforales mediante agitación mecánica con perlas de vidrio de acuerdo a la técnica de Berntzen y Vogue (1965), con objeto de aumentar su infectividad. Se sacrificaron 21 días después de la infección abriendo la totalidad del intestino delgado para la búsqueda de adultos.

Para el segundo experimento se infectaron 30 ratones con aproximadamente 2,000 huevos de H. nana previamente liberados de sus bloques embrioforales como se ha descrito. 21 días después de la infección, se realizó examen coproparasitológico (CPS) por el método de Faust, colectando una muestra de cada ratón por separado. Verificada la

parasitación, se agruparon en número de seis y se inocularon con 40 ug de antígenos cefálicos, totales, de PG y OB respectivamente por vía subcutánea. El antígeno se disolvió en 0.1 ml de Solución Salina 0.15M estéril mezclado con 0.1 ml de hidróxido de aluminio como adyuvante. El grupo control recibió solución salina 0.15M y adyuvante. Una dosis de refuerzo se administró 7 días después. Transcurridos 15 días de ésta segunda inoculación, se sacrificaron por desnucación, se abrió la totalidad del intestino delgado, se examinó a simple vista y mediante el microscopio de disección para búsqueda de adultos, los cuales fueron contados para fines estadísticos.

Anticuerpos anti H. nana en sueros de niños parasitados.

Se utilizaron muestras de suero obtenidas por punción venosa de niños infectados con H. nana, diagnosticados por examen coproparasitológico. En total se estudiaron 52 niños que acudieron a la consulta externa del Hospital Infantil del Hospital General de México y cuyas edades fluctuaron entre 2 y 14 años de edad, incluyendo muestras de ambos sexos. Se añadió Azida de sodio 30 mM como conservador, y se conservaron en congelación a -20°C. En cada placa de ELISA utilizada para el estudio, se incluyó como control negativo la misma muestra de suero proveniente de un niño al que no se le demostró en los últimos tres años infección por H. nana.

Una muestra adicional de 15 sueros de niños con CPS negativos para H. nana se utilizó para determinar la especificidad del ensayo, así como para determinar el criterio de positividad de la prueba. Finalmente, para estimar la reactividad cruzada en la prueba de ELISA se utilizaron 12 sueros de individuos con serología positiva a la forma larvaria de Taenia solium y 17 sueros de pacientes con teniasis causada tanto por T. solium como por T. saginata.

Reacción antígeno-anticuerpo. Prueba de ELISA.

La prueba de ELISA se realizó en placas de microtitulación de 96 pozas (Immulon, Cooke Microtiter, Alexandria, VA, USA), de fondo plano. Todos los antígenos se ajustaron a una concentración de 5 ug/ml de proteínas totales, diluyéndolos con amortiguador de carbonatos (NaHCO₃ 45 mM; Na₂CO₃ 18 mM, pH 9.6 BC). Esta concentración, al igual que la dilución óptima del conjugado fué determinada en forma de tablero de ajedrez (Voller y cols., 1979) utilizando para ello una mezcla de sueros con anticuerpos determinados previamente en doble difusión en agar de acuerdo a la técnica de Ouchterlony y Nilsson, (1979) y una mezcla de sueros negativos. La prueba de ELISA se realizó siguiendo los procedimientos reportados por Voller y cols. (1979) con ligeras modificaciones. A cada poza se le añadieron 200 ul de la solución de antígeno (1 ug/poza) y se incubó a 4°C durante

toda la noche, seguido de 200 ul de albúmina sérica bovina al 1% en BC, incubando a 37°C durante 2 horas. Las muestras de suero se diluyeron 1:200 en PBS-T (Na_2HPO_4 6 mM; NaH_2PO_4 4 mM; NaCl 130 mM; 500 ul/l de Tween-20, pH 7.2). El conjugado se diluyó 1:300 en PBS-T. Como sustrato, se utilizó ortofenilendiamina (Sigma Chemicals Co. St. Louis, Mo. USA) disuelto a una concentración de 0.4 mg/ml en amortiguador de citratos-fosfato (Acido citrico 24 mM; Na_2HPO_4 51 mM, pH 5.0 PCB) adicionado de H_2O_2 (75 ul/20 ml de PCB). Después de incubar en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 minutos, la reacción se detuvo con 25 ul de H_2SO_4 2.5 M. Cada muestra se diluyó 1:16 con H_2SO_4 2.5 M y se leyó en fotocolorímetro Bausch & Lomb a 492 nm. En cada placa se incluyeron controles de conjugado, antígeno, sustrato y muestras por duplicado de suero negativo y suero positivo. Los resultados se expresaron como cocientes de Densidad Óptica (CDO) obtenido con la ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{CDO} = \frac{\text{DOP}}{\text{DON}}$$

Donde DOP es la densidad óptica a 492 nm del problema y DON es la media más dos desviaciones estándar de las densidades ópticas obtenidas con el suero normal utilizando como control

siguiendo la técnica de Gómez-Priego (Com. personal). Los CDO se agruparon por rangos de 0.2 unidades.

Suero antigama globulina humana.

La fracción gama globulina humana se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio al 50% en PBS de una mezcla de 25 sueros humanos normales. El precipitado se centrifugó a 12,500 x g a 4°C durante 15 minutos y la operación se repitió dos veces. El precipitado final se redisolvió en solución salina y se dializó exhaustivamente contra solución salina fría 0.15M. La concentración de proteínas se ajustó a 10 mg/ml y se mezcló v/v con Adyuvante Completo de Freund, con lo que se inoculó una cabra por vía intramuscular a los días 0, 7 y 42, 1 ml en cada ocasión. Siete días después de la última inoculación, se sangró y el suero se probó en inmunolectroforesis (Scheideger, 1958) contra suero humano normal, identificándose tres arcos de precipitación correspondiendo por su movilidad electroforética a la IgG, IgM e IgA. La fracción gama globulina de este antisuero se separó por precipitación con sulfato de amonio al 33% de saturación.

Preparación del conjugado con peroxidasa (CPO).

La fracción gama globulina del suero de cabra antigama globulina humana, se conjugó con peroxidasa de rábano fuerte tipo VI (Sigma), siguiendo el procedimiento de dos pasos de

Avrameas y Ternynck (1972). La actividad específica del conjugado, se determinó siguiendo los procedimientos descritos por Catty y cols. (1983).

Determinación del Criterio de Positividad en la prueba de ELISA.

La suma de la media mas dos desviaciones estándar de los CDO del grupo control observada con cada uno de los antígenos fué la medida utilizada como criterio de positividad.

Estudios coproparasitológicos (CPS).

A todos los niños incluidos en este estudio, se les practicaron 3 exámenes CPS según el método de Faust (Salazar y De Haro, 1980) para determinar la presencia de huevos de H. nana u otros parásitos. Adicionalmente se realizó CPS según técnica de Kato (Martín y Beaver, 1968) para cuantificar la magnitud de la parasitosis. Todos estos niños recibieron tratamiento específico con Albendazol (Zentel) 400 mg/día/3 días y 21 días después, se realizó estudio CPS de control para verificar el buen éxito terapéutico.

Estudios clínicos.

En 50 de los 52 niños estudiados, se realizó una historia clínica dirigida a detectar signos y síntomas generalmente asociados con himenolepiasis.

Análisis estadístico.

En una primera aproximación para determinar la significancia de las diferencias de las medias de los CDO obtenidas con cada grupo de sueros, se recurrió al método gráfico de Dice y Leraas (1936); Schuck, (1952). Para determinar la magnitud de la significancia de las diferencias obtenidas tanto en los experimentos de inmunización como en los de serología se utilizó la prueba de t de Student (Downie y Heath, 1971). La evaluación serológica se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Morrow (1981), y Méndez y cols. (1984), determinando los parámetros serológicos como sigue: (Cuadro 1)

Sensibilidad: Proporción de verdaderos positivos (número de seropositivos que tienen la parasitosis), obtenida dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de casos que tienen la parasitosis.

Especificidad: Es la proporción de verdaderos negativos (número de seronegativos que no tienen la parasitosis), obtenida al dividir el número de casos verdaderos negativos entre el total de casos que no tienen la parasitosis.

Valor de predicción para un resultado positivo: Es la probabilidad de que un resultado positivo en la prueba de ELISA indique una verdadera infección. Este valor se estimó

dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de casos seropositivos.

Valor de predicción para un resultado negativo: Es la probabilidad de que un resultado negativo en la prueba de ELISA indique verdaderamente ausencia de la parasitosis. Este resultado se estimó dividiendo el número de verdaderos negativos entre el número total de casos seronegativos.

Reactividad Cruzada: Es la proporción de sueros de individuos infectados con uno o varios parásitos diferentes a H. nana que fueron positivos a la prueba.

CUADRO 1

ELISA

		+	-	Totales
H I M E N O L E P I A S I S	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
T O T A L E S		a+c	b+d	a+b+c+d

Sensibilidad = $\frac{a}{a+b} \times 100$ a = Verdaderos positivos

Especificidad = $\frac{d}{c+d} \times 100$ b = Falsos negativos

Valor de predicción positivo = $\frac{a}{a+c} \times 100$ c = Falsos positivos

Valor de predicción negativo = $\frac{d}{b+d} \times 100$ d = Verdaderos negativos

Falsas negativas = $\frac{b}{a+b} \times 100$ a+b= Infectados

Falsas positivas = $\frac{c}{c+d} \times 100$ c+d= No infectados

a+c= Seropositivos

b+d= Seronegativos

RESULTADOS

En un primer experimento, se inmunizaron ratones con antígenos obtenidos de la porción cefálica de especímenes de Hymenolepis nana. Para probar la inmunidad se infectaron los ratones con 2000 huevos de H. nana, por vía oral y se sacrificaron 21 días después. Se observó una protección importante en los animales inmunizados, con una diferencia estadísticamente significativa respecto de los ratones controles ($P < 0.05$). En estos últimos se encontró un 83.3% (5 de 6 ratones) de parasitación con adultos de H. nana, con un rango de 1-9 helmintos. En cambio, solamente en dos ratones del grupo inmunizado con 30 y 60 ug, se encontraron adultos de H. nana en rangos de 1-3 y 1-2 respectivamente. Los resultados se resumen en el cuadro 2.

CUADRO 2

Numero de Hymenolepis nana (adultos) encontrados en el intestino de ratones inunizados con antígenos cefálicos de H. nana y de ratones controles infectados con 2000 huevos de H. nana por vía oral.

No. de ratón	Inmunizados		Controles
	Antígenos Cefálicos** 30 ug	60 ug	Sol. Salina y Adyuvante
<hr/>			
No. de <u>Hymenolepis nana</u> (adultos)			
1	0	0	9
2	0	0	5
3	0	1	7
4	0	2	6
5	1	0	1
6	3	0	0
<hr/>			
Total	4	3	28
X	0.6	0.5	4.6
XP%	33.3	33.33	83.3
PC	0.05	0.05	--

*Porcentaje de ratones parasitados con H. nana adultos

**Cada animal recibió dos dosis con una semana de intervalo.

En un segundo experimento, los resultados mostraron que los extractos antigénicos más eficientes para inducir inmunidad fueron los antígenos totales (AT) y un extracto obtenido a partir de proglótidos grávidos (PG). En el grupo de ratones inoculados con la dosis de 60 ug de antígenos totales, desafiados posteriormente con 2000 huevos de H. nana, y sacrificados 21 días después del desafío, se encontraron 3 ratones parasitados con un sólo espécimen de H. nana cada uno (50% de parasitación en este grupo), y en el grupo inmunizado con antígenos de proglótidos grávidos, se encontró solo un ratón (16.16%) que tenía 4 especímenes de H. nana. Comparativamente, los antígenos de oncosferas-bloques fueron menos eficientes para inducir inmunidad contra la infección de huevos de H. nana ya que se encontró un 83.3% de parasitación en el grupo inmunizado con 60 ug y el 100% en el grupo inmunizado con 30 ug; a pesar de que la media de H. nana adultos encontrados en estos grupos fue bajo ($X = 2.17$ y 2.83 respectivamente). En contraste, en el grupo control se encontró una parasitación muy alta, en un rango que fué de 7 a 40 adultos de H. nana. Los resultados están tabulados en el cuadro 3 y figura 1.

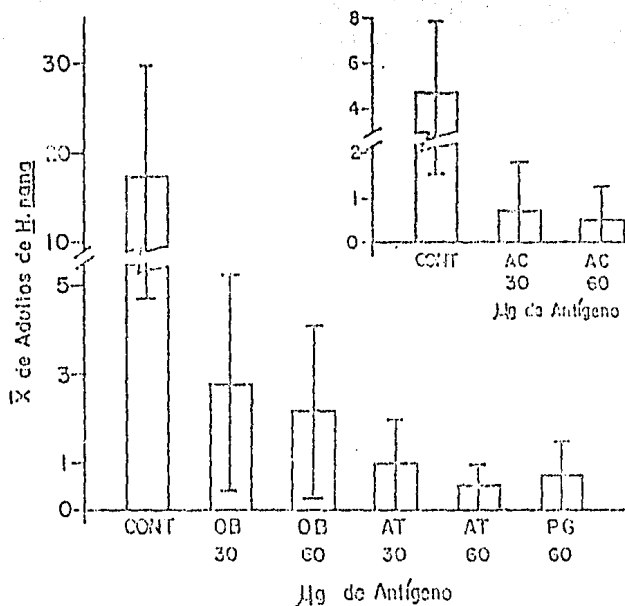


Figura 1.-Media de *Hymenolepis nana* adultos encontrados en el intestino de ratones inmunizados con diferentes antígenos del parásito, 21 días después de la infección con 2000 huevos de *H. nana*. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

AC= Antígenos acfáticos.

AT= Antígenos totales.

OB= Antígenos de oncosferas y bloques.

PG= Antígenos de proglótidos grávidos.

CUADRO 3

Número de Hygenolepis nana (adultos) encontrados en el intestino de ratones inunizados con diversos extractos antigénicos de H. nana y de ratones controles infectados con 2000 huevos de H. nana por vía oral.

No. de ratón	Inunizados					Controles
	OB 30†	OB 60	AT30††	AT60	FG60†††	Sol. Salina y Adyuvante
			ug/ml*			
						No. de <u>H. nana</u> (adultos)
1	3	1	0	0	0	10
2	2	2	0	0	0	30
3	1	3	3	1	0	10
4	1	1	1	1	4	40
5	8	0	1	1	0	8
6	2	6	1	0	0	7
Total	17	13	6	3	4	105
X	2.83	2.17	1.00	0.50	0.67	17.50
XP††	100	83.3	66.7	50.0	16.17	100.0
P<	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	----

*Cada animal recibió dos dosis con una semana de intervalo

†Antígeno de Oncosferas y bloques

††Antígenos totales

†††Antígenos de proglótidos grávidos

++Porcentaje de ratones parasitados.

En función de que todos los extractos antigénicos de H. nana indujeron en el ratón una protección importante tanto desde el punto de vista causal como del estadístico ($P < 0.05$) contra la infección con huevos de H. nana, se decidió analizar el efecto de esta inmunogenicidad en ratones infectados previamente en forma experimental con este parásito. Transcurridos 21 días después de la infección con 1988 huevos de H. nana y habiendo comprobado mediante examen coproparasitológico la presencia del parásito en el 100% de los ratones, los animales se inocularon con 60 μ g de los extractos antigénicos. A los 21 días de la segunda inoculación, se sacrificaron para realizar la búsqueda de H. nana adultos en el intestino delgado.

Los resultados mostraron que el extracto antigénico más eficiente en inducir inmunidad contra el parásito adulto fue el de antígenos totales (AT). Solamente en un ratón inmunizado de este grupo (16.16% de parasitación) se encontraron 2 adultos de H. nana, en este caso, el margen de incertidumbre fue mucho menor que en los experimentos anteriores ($P < 0.005$). Los antígenos de proglótidos grávidos fueron menos eficientes, pues se encontraron 2 ratones parasitados (33.3%), uno con 6 especímenes y el otro con uno de H. nana; aquí también, el valor de P fue menor de 0.005.

En contraste, todos los ratones controles resultaron parasitados. El rango de adultos de H. nana encontrados en

este grupo fué de 7 a 25 helmintos de H. nana, por ratón. Finalmente, los antígenos OB no tuvieron ninguna influencia sobre la inducción de inmunidad contra los adultos de H. nana. Los resultados pueden observarse en el cuadro 4.

CUADRO 4

Número de Hyemonilepis nana (adultos) en ratones infectados con 1988 huevos de H. nana, 100% positivos a coproparasitoscópico e inmunizados con diversos extractos antigénicos de H. nana y en ratones controles infectados.

Ratón No.	Inmunizados*			Controles
	OB†	PG‡‡	AT‡‡‡	Sol. Salina y Adyuvante
	60 ug			
	No. de <u>H. nana</u> adultos			
1	20	0	0	15
2	15	0	0	25
3	25	6	2	7
4	10	1	0	18
5	10	0	0	15
6	2	0	0	18
Total	82	7	2	98
X	13.6	1.2	0.33	16.33
%P++	100	33.3	16.7	100
PC	0.10	0.005	0.005	---

*Cada ratón recibió dos dosis con una semana de intervalo

†Oncosferas y bloques

‡‡Proglótidos grávidos

‡‡‡Antígenos totales

++Porcentaje de ratones parasitados.

Se repitió el experimento anterior, con el objeto de comprobar los resultados, observándose nuevamente que los antígenos más eficientes para inducir inmunidad en contra del parásito adulto fueron los antígenos totales, ya que en el grupo inmunizado con estos, solamente un ratón (16%) resultó parasitado con un solo helminto. Con los antígenos cefálicos, la protección obtenida fue ligeramente menor pues se encontró un ratón con 2 especímenes de H. pana y otro con uno (33.3% de parasitación), no obstante, el valor de P fue menor a 0.005. Finalmente, los antígenos de OB fue mucho menos eficiente para inducir inmunidad ya que 4 ratones resultaron parasitados (66%) con una media de 0.83 gusanos; no obstante, la diferencia estadística fue altamente significativa.

Los resultados se encuentran resumidos en el cuadro No. 5.

CUADRO 5

Número de *Hyalomelipis nana* (adultos) en ratones infectados con 2,000 huevos de *H. nana* y 100% positivos a coproparasitoscópico, inunizados con diversos extractos antigénicos de *H. nana* y en ratones infectados controles.

Ratón No.	Infectados e inunizados + antígenos 60 ug.			Infectados Sol. salina y adyuvante.
	OB†	AC‡‡	AT‡‡‡	
No. de <i>H. nana</i> (adultos)				
1	1	2	0	3
2	0	0	0	3
3	1	0	1	5
4	2	1	0	4
5	1	0	0	3
6	0	0	0	4
Total	5	4	1	22
X	0.83	0.5	0.16	3.66
Xp‡‡‡	66	33.3	16	100
P<	0.005	0.005	0.005	---

+Cada ratón recibió dos dosis con una semana de intervalo
 †Antígeno de *Oncosferas* y bloques
 ‡‡Antígenos cefálicos
 ‡‡‡Antígenos totales
 ††Porcentaje de ratones parasitados.

Si bien en el ratón es posible comprobar un estado de inmunidad contra las reinfecciones por Hymenolepis nana, se ignora si esto pudiera ocurrir en el huésped humano, especialmente en el grupo de escolares y preescolares, que son los principalmente afectados por esta parasitosis. Un análisis preliminar, consistió en estudiar si hay anticuerpos contra antígenos de H. nana en el suero de niños infectados, con el objeto de buscar alguna relación entre el título de anticuerpos, su especificidad y el estado de inmunidad o de susceptibilidad.

No existieron diferencias con respecto al sexo de los niños parasitados, ya que el 54% correspondió al masculino y un 46% al femenino. El grupo de edad más afectado fue el de los escolares (6 a 12 años), al que correspondió una frecuencia del 58%, seguida por el de preescolares (2 a 6 años) con un 30% y un 12% en mayores de 12 años. No se estudió ningún caso en lactantes.

A los 52 niños en los que inicialmente se detectó la infección por H. nana mediante un examen coproparasitológico (CPS) cualitativo siguiendo la técnica de Faust y a los cuales se les administró tratamiento con Albendazol, se les solicitaron 3 muestras adicionales de materia fecal con el objeto de realizar un CPS cuantitativo siguiendo la técnica de Kato. El 26% de los casos no aportó muestras para este examen, por lo que los resultados mostrados en el Cuadro 6,

CUADRO 6

NUMERO DE HUEVOS DE Hymenolepis nana POR GRAMO DE HECES EN 37
 NIÑOS ESTUDIADOS MEDIANTE EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO DE KATO.

RANGO DE HUEVOS POR GR/ HECES	NUMERO DE CASOS	%
20 - 160	19	51.35
200 - 400	7	18.91
500 - 800	3	8.11
1400 -1860	3	8.11
2400 -4000	3	8.11
4500 -7000	2	5.41
TOTAL	37	100.00

solo se refieren a 37 niños en los que se pudo realizar el CPS cuantitativo. Se puede observar que la magnitud de la parasitosis fue baja (menos de 1 000 huevos por gramo de heces, hgh) en el 78.38% de los casos, mientras que el 18.92% de los niños infectados, presentaron huevos de H. nana en cantidades entre 1000 y 5000 hgh y solamente un caso (2.7%) registró 7,000 hgh (Cuadro 6). No se observó ninguna correlación entre el cuadro clínico y la magnitud de la infección.

El 78% de los casos presentaron en el CPS cualitativo, quistes de protozoarios y/o huevos de otros helmintos intestinales. La frecuencia de asociación observada de H. nana con aquellos, se encuentra resumida en el cuadro 7. El parásito mas frecuentemente asociado fue Giardia lamblia (46.0%), sin embargo el 20% también se asoció con Entamoeba histolytica y en porcentajes menores con Ascaris lumbricoides y Trichuris trichiura. Es interesante señalar que solo en el 22% de los casos, la infección por H. nana se presentó sin asociación con otros protozoarios o helmintos (cuadro 7).

Los sueros de los 52 niños estudiados, fueron analizados en la prueba de ELISA contra los 3 antígenos AT, AC y DB. Las condiciones óptimas de la prueba se encuentran resumidas en el cuadro 8. Los datos estadísticos fundamentales (media, desviación y dos veces el error estándar, así como los valores máximos y mínimos) de los grupos experimental y control negativo, registrados para cada uno de los antígenos

CUADRO 7

PROTOZOARIOS Y HELMINTOS INTESTINALES ENCONTRADOS* EN ASOCIACION
CON Hymenolepis nana EN 50 NIÑOS INFECTADOS POR ESTE CESTODO.

<u>Hymenolepis nana</u> asociado con:	No. de casos	%
<u>Giardia lamblia</u>	23	46.00
<u>Endolimax nana</u>	15	30.00
<u>Entamoeba coli</u>	13	26.00
<u>Entamoeba histolytica</u>	10	20.00
<u>Ascaris lumbricoides</u>	6	12.00
<u>Enteromonas hominis</u>	3	6.00
<u>Iodamoeba butschlii</u>	2	4.00
<u>Trichuris trichiura</u>	1	2.00
<u>Chilomastix mesnili</u>	1	2.00
Ninguno	11	22.00

*En exámenes coproparasitológicos cualitativos (Faust).

CUADRO B

CONDICIONES OPTIMAS PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA CON DIVERSOS ANTIGENOS DE Hymenolepis nana.

Parámetros técnicos	S E C U E N C I A D E L A T E C N I C A							
	ANTIGENO		BLOQUEO	ANTICUERPO	CONJUGADO	SUBSTRATO	INTERRUPTOR	
Compuesto	AC	AT	OB	ASB	---	Cabra anti globulina humana-peroxidasa	Ortifenilendiamina	Acido Sulfúrico
Concentración	5	5	5†	1 %	1 : 200	1 : 300	0.4 ug/ml	2.5M
Antiguadero	Carbonato-Bicarbonatos 60mM, pH 9.8		Carbonato-Bicarbonatos 60 mM, pH 9.8	Salino de Fosfatos 150mM, pH 7.2 Tween-20 0.05%	Salino de Fosfatos, 150mM, pH 7.2 Tween-20, 0.05%	Citrato-Fosfato 76mM pH 5.0	---	---
Tiempo de incubación	Toda la noche(18 hs)		2 hs	30 min	30 min	20 min	---	---
Temperatura de incubación	4°C		37°C	37°C	37°C	Ambiente (18-24°C)	Ambiente (18-24°C)	---

AC = Antigenos Cefálicos

AT = Antigenos Totales

OB = Antigenos de Oocistosferas y Bloques

ASB= Albúmina sérica bovina

†† = ug/ml.

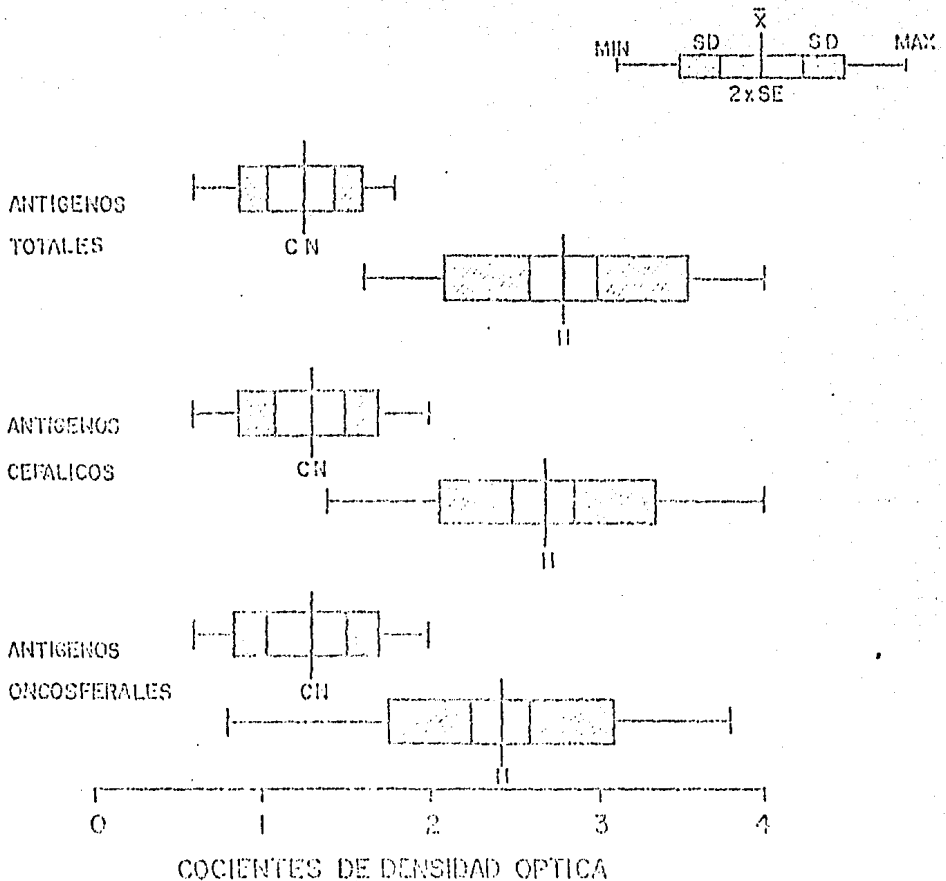


Figura 2.-Comparación de los datos estadísticos fundamentales (ver ángulo superior derecho), de los Cocientes de Densidad Óptica obtenidos con 52 sueros de niños hiperlipidémicos analizados en la prueba de ELISA con tres extractos antigénicos de *Haemophilus solum*.
 CN: Control negativo.
 H: Hiperlipidémicos.

en la prueba, se presenta en la forma gráfica de los cuadros de Dice y Leraas (1936) en la figura 2.

Como se puede apreciar, en el grupo de los aparentemente sanos, la media de los CDO no fue superior a 1.30 con ninguno de los antígenos utilizados, mientras que con los sueros de los niños infectados, tanto la media como la desviación estandar fueron aproximadamente el doble de lo observado con el grupo control negativo.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y experimental con cada uno de los antígenos, dado que la zona que corresponde a 2 veces el error estándar no se entrecruza. Por el contrario, cuando estas zonas se entrecruzan, como se observa en los grupos control y experimental contra cualquiera de los tres antígenos no hay significancia entre las diferencias.

La respuesta serológica en CDO muestra una amplia dispersión en ambos grupos de sueros, siendo el coeficiente de variación, mayor del 27% en todos los casos y siempre fueron superiores las medias del experimental que las de los sueros control (Fig 3). Por ejemplo, la media de los CDO de los sujetos del grupo control, analizados con los antígenos cefálicos, fue de 1.25, mientras que la de los himenolepiásicos subió hasta 2.74 (Figura 3). De acuerdo con el criterio de positividad establecido (ver material y métodos), las muestras con CDO igual o superior a 2.00

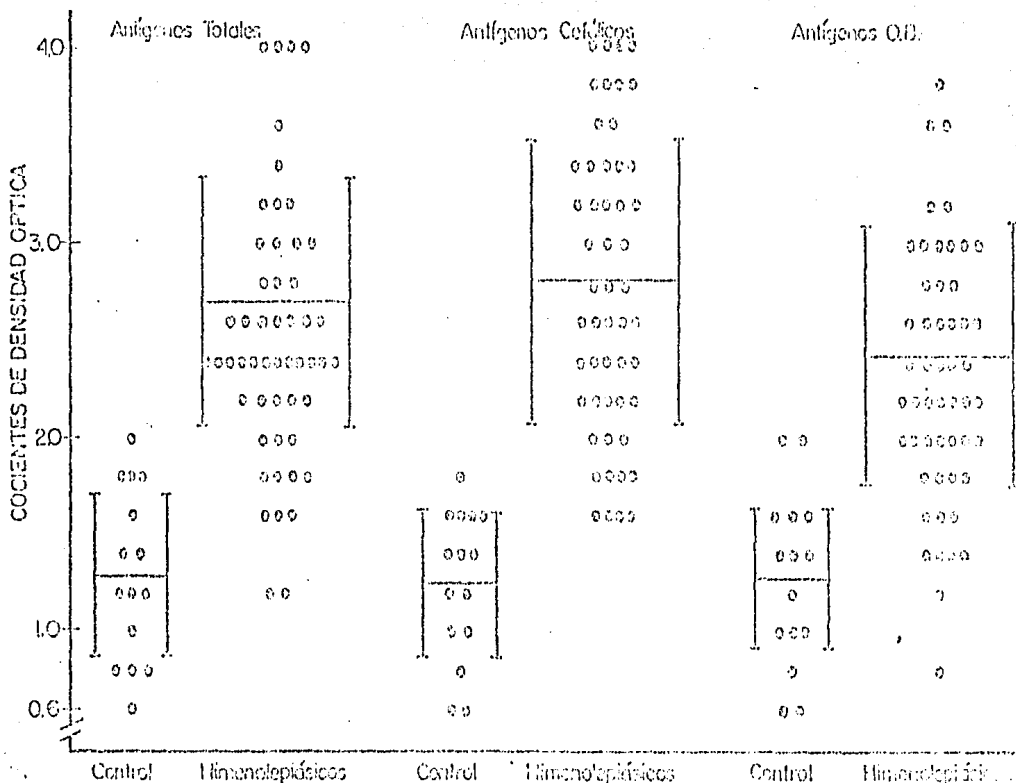


Figura 3.-Distribución de los coeficientes de densidad optica obtenidos con 52 sueros de niños himerolepiásicos y 15 muestras de suero de individuos normales. Las barras verticales señalan la desviación estándar y las horizontales, la media de cada grupo. El umbral de positividad para cada antígeno fue aproximadamente igual a 2.00.

fueron consideradas como positivas. Así, la positividad serológica en niños fué diferente para cada antígeno (75% para OB; 82.7% para AT y 84.62% para AC) y notablemente menor con los controles aparentemente sanos (ninguno con los antígenos cefálicos) uno (6.67%) con los antígenos totales y dos (13.33%) con el extracto de oncosferas y bloques embrioforales (Cuadro 9). Ahora bien, si se considera que un individuo tiene anticuerpos contra H. nana, sin importar hacia cual de los extractos utilizados reaccionó, entonces 50 de los 52 casos estudiados con himenolepiasis y 3 de los 15 aparentemente sanos respondieron contra ellos (Cuadro 9). Las reacciones cruzadas, determinadas en forma separada con 17 sueros de individuos con teniasis (por Taenia solium o T. saginata); cisticercosis (n=12) o con otras parasitosis (n=24) se presenta también en el cuadro 9. Una gran proporción de individuos infectados con alguna de las dos cestodiasis más importantes en México (Teniasis y Cisticercosis), tienen anticuerpos séricos que identifican determinantes antigenicos presentes en los antígenos de H. nana utilizados. De esta manera, de los individuos cisticercosos, el 75% reaccionó contra los antígenos cefálicos y de OB, mientras que el 66.67% fueron positivos con los antígenos AT (Cuadro 9). Por último, de los individuos infectados con otras parasitosis, 47.83% fueron positivos hacia los antígenos cefálicos, mientras que se

observaron proporciones menores de seropositividad a los otros dos antígenos.

La valoración serológica de la prueba de ELISA para detectar anticuerpos séricos contra antígenos de H. nana, se presenta en el Cuadro 10. La sensibilidad, reactividad cruzada y el valor de predicción para un resultado negativo, son más altos cuando se considera la respuesta a cualquier antígeno que los calculados para los antígenos individuales. Lo contrario se puede observar con la especificidad y el valor de predicción para un resultado positivo.

Para la valoración de estos parámetros serológicos (excepto el de reactividad cruzada y sensibilidad), se utilizaron como un solo grupo, los sueros de los individuos aparentemente sanos y los infectados con otras parasitosis, ya que ambos grupos tienen en común, el no estar infectados con H. nana. Por otro lado, la reactividad cruzada se determinó en los 52 sueros de teniásicos, cisticercosos, y los infectados con otras parasitosis.

La sensibilidad serológica general de la prueba de ELISA en la himenolepiasis, es del 96.15%; sin embargo, si se considera ese parámetro en función de cada uno de los antígenos utilizados, entonces la sensibilidad de la prueba varía del 75% al 86.5% (Cuadro 10). Por otro lado, la especificidad del ensayo, fue del 40.3%.

De todos los niños que recibieron tratamiento con

Albendazol, solo 37 regresaron para determinar el éxito o fracaso terapéutico. Así, después de realizar el examen CPS de control fue posible integrar dos subgrupos de pacientes: los que no presentaron huevos de H. nana en heces (subgrupo A, n=12) y los que aún los presentaron (subgrupo B, n=15).

CUADRO 9

POSITIVIDAD SEROLOGICA EN LA PRUEBA DE ELISA CON TRES EXTRACTOS ANTIGENICOS
DE Hygenolepis nana.

Número de positivos a:				
Suero de individuos	OB	AT	AC	Cualquierat
Himenolepiásicos (n=52)	39 (75.00)†	43 (82.69)	45 (86.54)	50 (96.15)
Aparentemente sanos (n=15)	2 (13.33)	1 (6.67)	0 (--)	3 (20.0)
Teniásicos (n=17)	14 (82.35)	12 (70.59)	12 (70.59)	15 (88.22)
Cisticercosos (n=12)	9 (75.00)	8 (66.67)	9 (75.00)	11 (91.67)
Otras parasitosis (n=24)	1 (4.17)	3 (13.04)	11 (47.83)	11 (47.83)

†Por ciento.

OB = Antígenos de oncosferas y bloques

AT = Antígenos totales

AC = Antígenos cefálicos.

‡Positivos a uno, dos o los tres antígenos, es decir presencia de anticuerpos contra H. nana.

CUADRO 10

VALORACION SEROLOGICA EN LA PRUEBA DE ELISA PARA ESTIMAR ANTICUERPOS
SERICOS CONTRA ANTIGENOS SOMATICOS DE Hymenolepis nana

PARAMETRO	ANTIGENOS			
	OB	AT	AC	CUALQUIERA
Sensibilidad	75.0	82.69	86.54	96.15
Reactividad cruzada	45.15	44.23	61.53	71.15
Especificidad	61.19	64.18	52.24	40.30
Valor de predic- ción positivo	60.0	64.18	52.24	40.30
Valor de predic- ción negativo	75.93	82.69	83.34	93.10

OB = Antígenos de oncosferas y bloques

AT = Antígenos totales

AC = Antígenos cefálicos.

‡Positivos a uno, dos o los tres antígenos, es decir presencia de anticuerpos
contra H. nana

Para determinar si la falla o éxito terapéutico pudiera estar asociado con la respuesta serológica en la muestra de suero tomada antes de iniciar el tratamiento, se graficaron los CDO obtenidos con cada antígeno en los dos subgrupos, uniendo con una línea los CDO de cada individuo (Figuras 4 y 5).

En general, se puede apreciar que en ambos grupos hay una tendencia a que la respuesta serológica sea mayor hacia el antígeno de AC que hacia el antígeno AT y ésta mayor o igual que la observada hacia el de OB.

Sin embargo, existe una amplia dispersión en los CDO en el subgrupo B (coeficiente de variación = 30.84, 31.59 y 32.23 para los antígenos AC, AT y OB respectivamente) (Figura 5). Aunque en menor escala, esto mismo se puede observar en el subgrupo A especialmente contra los antígenos AC y AT (23.11 y 26.25 respectivamente). Sin embargo, esto no ocurrió contra el antígeno de OB, en donde la dispersión y por lo tanto, el coeficiente de variación, fue más bajo (14.82) (Figura 4). Por otro lado, no se observaron diferencias entre la media aritmética de los CDO obtenidos con los tres antígenos en los dos subgrupos analizados.

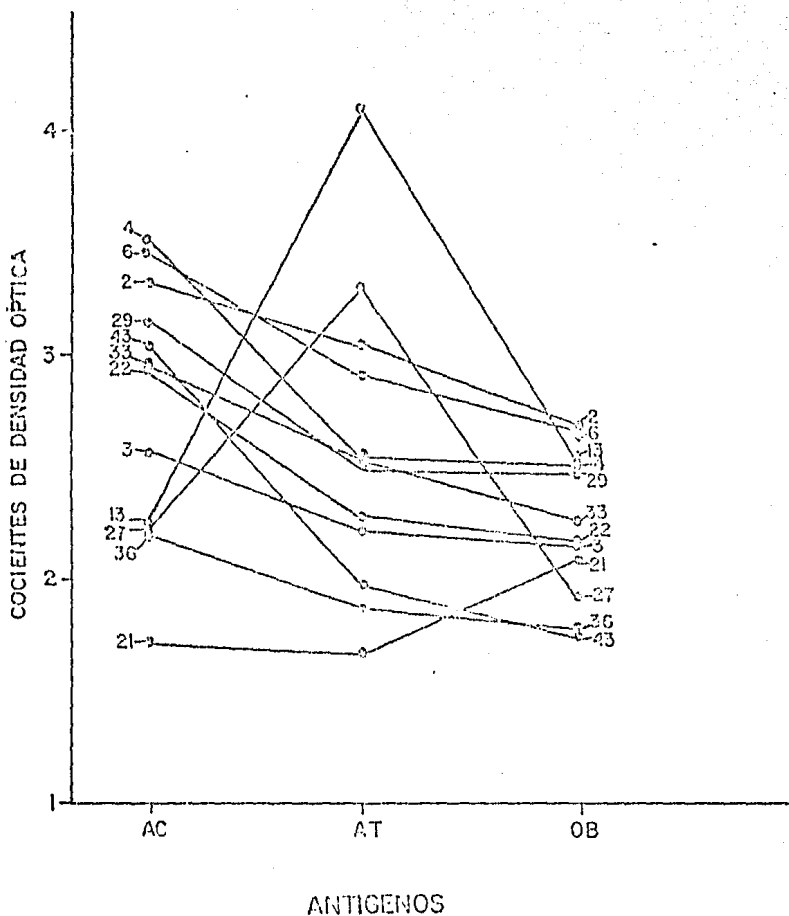


Figura 4.-Distribución de los Coeficientes de Densidad Óptica obtenidos contra tres antígenos de *Hymenolepis nana* (Antígenos cefálicos = AC; Antígenos Totales = AT y Antígenos de oncosferas y bloques = OB) en el subgrupo A de niños en los que el examen OPS de control realizado tres semanas después del tratamiento fue negativo. El coeficiente de variación para cada antígeno fue: AC= 23.11%; AT= 24.25% y OB= 14.92%.

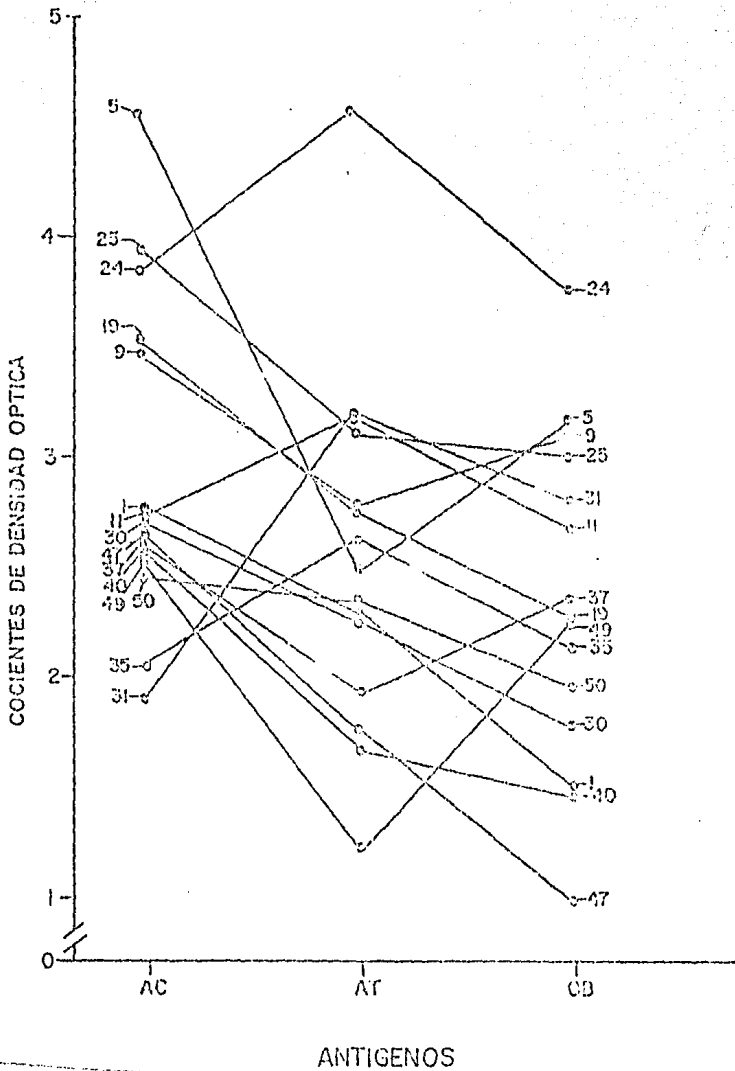


Figura 5.- Distribución de los cocientes de densidad óptica obtenidos contra tres antígenos de Hydrocephalus puma (Antígenos cefálicos = AC; Antígenos Totales = AT y Antígenos de Oncosferas y bloques) en el subgrupo B de 10 niños en los que se observaron huevos de H. puma en los exámenes EPS de control. El coeficiente de variación para cada antígeno fue AC= 30.84%; AT= 31.66% y CB= 32.33%

DISCUSION

a) Himenolepiasis experimental.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que todas las fracciones antigénicas obtenidas de adultos de Hymenolepis nana indujeron en el ratón, un alto grado de inmunidad contra la infección oral con huevos de H. nana. La inmunidad se estimó en base al número promedio de helmintos adultos encontrados en el intestino de ratones de los diferentes grupos inmunizados y sacrificados 21 días después de la infección oral. De los extractos antigénicos utilizados, los más eficientes en inducir inmunidad fueron los antígenos totales (AT), los de proglótidos grávidos (PG) y los de la porción cefálica (AC) con una media de 0.5, 0.6 y 0.5 helmintos por ratón respectivamente. En contraste, en el grupo de ratones inmunizados con antígenos de oncosferas y bloques (OB), la media fue de 2.1.

En virtud de que H. nana llega a su madurez en el término de 15 a 20 días (Chandler y Read, 1961) y que de acuerdo al diseño experimental, se sacrificaron los ratones 21 días después de la infección con huevos de H. nana, existe un buen margen de seguridad para afirmar que solamente se completó un ciclo directo de H. nana, es decir, desde el momento de la infección con huevos hasta el completo desarrollo a adultos. La protección observada en el grupo

de ratones inmunizados con los antígenos OB en el que se obtuvo una media de 2.1 adultos por ratón, pudiera explicarse en base a la estimulación de los mecanismos inmunológicos de la respuesta inmune que Ito y cols., (1986) han denominado respuesta temprana, dirigida contra alguna de las fases tisulares del ciclo que van de oncosfera a cisticercoide. Esta idea podría ser apoyada por los resultados de Furukawa y cols., (1979) quienes lograron, mediante la inyección subcutánea de huevos viables de H. nana, inducir inmunidad suficiente para causar una reducción parcial del número de cisticercoides encontrados en las vellosidades intestinales después del desafío con huevos, mientras que si los huevos eran tratados con formol o congelados, la protección era nula, es decir, no era estimulada por antígenos desnaturalizados.

Antes de realizar este trabajo, la inmunidad inducida por antígenos oncosferales solubles sólo había sido estudiada en otras especies de céstodos. Así, la inyección parenteral de oncosferas viables o de antígenos solubles obtenidos de oncosferas de Taenia solium y T. saginata, indujo una muy alta protección en el ratón contra la infección endovenosa con oncosferas viables (Aguilar, 1986). Rajasekariah y cols., (1980 a y b) lograron obtener con oncosferas sonicadas, protección contra I. taeniformis. Rajasekariah y cols. (1982) describieron que el sobrenadante de oncosferas sometidas a

tratamiento con desoxicolato de sodio antes y después de la sonicación, estimuló una importante inmunidad en ratones contra I. taeniformis. Rickard y Adolph, (1977) con el producto de incubación (excreciones y secreciones) de oncosferas de I. ovis emulsificados con adyuvante completo de Freund indujeron en borrego un alto grado de inmunidad contra la infección con huevos de I. ovis.

De acuerdo al diseño experimental establecido para este trabajo, no se estudiaron las posibles alteraciones o cambios histopatológicos que eventualmente pudieran ocurrir en esta relación huésped- parásito, ya que primero se deseaba saber si se podía inducir inmunidad en el ratón con antígenos solubles y después, tratar de establecer los posibles mecanismos involucrados en el fenómeno. Sin embargo, es probable que estos mecanismos se encuentren estrechamente relacionados con lo observado por otros autores. Ito y Yamamoto, (1976); Miyazato y cols, (1977b) e Inoue, (1984), suponen que la inmunidad dirigida contra la oncosfera de H. nana después de una infección in vivo, opera en las vellosidades intestinales impidiendo la diferenciación de oncosfera a cisticercoide, ya que en los ratones previamente infectados, es a este nivel donde se encuentra una reacción inflamatoria intensa, la cual produce una solución de continuidad en la punta de la vellosidad y que culmina con la expulsión de las oncosferas. Por otro lado, Furukawa y cols,

(1981) en estudios histopatológicos mostraron que aparentemente la respuesta inmune del huésped produce daño al epitelio de la oncosfera y concluyen que este daño, al alterar importantes funciones metabólicas de las cuales es responsable esta estructura, podría ser suficiente para causarles la muerte.

No obstante lo anterior, es evidente la carencia de estudios inmunoquímicos que identifiquen cuál o cuáles de los diferentes antígenos oncosferales son los responsables de la inducción de inmunidad, lo que obliga a realizar varios experimentos de purificación de estos antígenos, pues la presencia de componentes de los bloques embrionarios pudo haber diluido la concentración real de los antígenos.

Ito y cols. (1978,1986) sugirieron que, en virtud de que los adultos de H. nana sobreviven en un ratón que es inmune a huevos y/o cisticercoides, es probable que exista un cambio en inmunogenicidad en cada uno de los estadios y por lo tanto, en la respuesta inmune dirigida contra cada uno de los diferentes estadios evolutivos del parásito. De esta manera, la oncosfera debe ser blanco de la respuesta temprana, el cisticercoide luminal blanco de la respuesta tardía y el adulto luminal sería el blanco de la respuesta de expulsión. Por ello, pudiera suponerse que los antígenos OB estimularon la respuesta temprana y los antígenos del adulto (AT,AC,PG) estimularon mecanismos inmunológicos en contra del adulto

luminal de H. nana. Apoyan este concepto los resultados de Coleman y cols., (1968) quienes lograron disminuir el número de adultos de H. nana encontrados en el intestino de ratones inmunizados con homogenados del parásito antes de la infección, aunque a diferencia de los experimentos aquí presentados, este autor utilizó un total de 20 mg de antígeno repartido en 5 inoculaciones mientras que en nuestros experimentos se utilizaron 120 ug en 2 inmunizaciones. Molinari y cols., (1983) y Tato, (1984) indujeron inmunidad en cerdos contra la infección de huevos de Taenia solium, por inmunizaciones repetidas con proteínas obtenidas de la forma larvaria de este céstodo. Noda (citado por Heyneman, 1962 b), también indujo inhibición del desarrollo de adultos de H. nana por inmunización parenteral con antígenos del helmineto adulto y señala que hubo muy poco efecto en el paso de reorganización de oncosfera a cisticercoide.

La inoculación de antígenos somáticos solubles obtenidos de diferentes regiones de H. nana en ratones previamente infectados, provocó la expulsión de estos gusanos del intestino. Este efecto se determinó tanto por el número de ratones que no presentaron estos céstodos en la necropsia, como por el número de helmintos en los ratones que resultaron positivos. De estos resultados, llama la atención que los antígenos somáticos AT, AC y PG pero no los de OB, indujeron la expulsión de los helmintos a niveles significativamente

altos comparados con el control de cada experimento ($p < 0.005$).

El hecho de que se haya logrado la expulsión de los helmintos adultos con los antígenos somáticos excepto los de OB, debe explicarse en base a la existencia de antígenos estadio-específicos, que estimularon inmunidad en contra de la fase adulta. Aunque no existen reportes en la literatura acerca de la expulsión experimental de H. nana los resultados de Molinari y cols. (1983b) presentan una interesante analogía, al lograr mediante el uso parenteral de antígenos de cisticerco de T. solium destruir cisticercos maduros ya establecidos en cerdos, lo que podría apoyar el concepto de antígenos estadio-específicos.

La inmunidad intestinal responsable de la expulsión pudiera explicarse, como lo sugiere Larsh, (1975) en una serie de eventos de tipo inflamatorio que ocurren a nivel local, los cuales de alguna manera deben crear un habitat adverso para el parásito y así provocan su muerte; Befus y Threadgold (1975) observaron daños tegumentarios en H. diminuta que culminaron con la desestrobilización y expulsión del helminto. Además, como lo sugieren Ito y cols., (1978) e Isaak y cols., (1977) la respuesta inmune a las infecciones con este céstodo es tipo dependiente, lo que debiera explicar que estos efectos sean producidos por células linfoides más que por anticuerpos.

A pesar de que en este trabajo no se realizaron

experimentos con el cisticercoide de H. nana, los resultados presentados aquí con los antígenos del adulto y de oncosferas serán complementados en una futura investigación con purificación de los mismos y con estudios histopatológicos.

b) Himenolepiasis humana.

En esta segunda fase del estudio se trató de detectar la presencia de anticuerpos séricos contra antígenos de H. nana en niños infectados con este parásito. En el análisis de los datos clínicos o epidemiológicos de estos niños, la información obtenida no mostró diferencias con lo reportado por otros autores (Pérez, 1976; Domínguez, 1980).

De los 52 niños estudiados, el 78.37% mostraron infecciones muy ligeras por H. nana, (menos de 1000 huevos por gramo de heces). Esto sugiere que la magnitud del estímulo antigénico, pudiera ser reducido y reflejarse en una escasa concentración de anticuerpos séricos. El hecho de que ninguno de los sueros formara bandas de precipitación en placas de doble inmunodifusión contra los antígenos del parásito apoyó esta suposición (datos no mostrados). Por ello, se decidió utilizar la prueba de ELISA, que detecta hasta 1 ng de anticuerpos/ml. (Voller y cols. 1979).

Los cuadros de Dice y Leraas (1936) permitieron apreciar fácilmente la existencia de diferencias estadísticamente significativas, ya que las áreas obtenidas con la media más o

menos dos veces el error estandard de las poblaciones experimentales y control negativo, no se entrecruzaron. Esto se confirmó mediante un análisis de varianza que mostró en general una $P < 1 \times 10^{-6}$ para los tres antígenos.

En base a los resultados presentados, es evidente que los niños infectados con H. nana producen anticuerpos contra este parásito, y que su concentración es apenas 2.43 a 2.94 veces más que la observada por los normales. Se evidenció también que la magnitud de la respuesta humoral no fué igual para cada antígeno utilizado, y que existió una amplia dispersión de la respuesta tanto en la población experimental como con el control negativo, indicando la existencia de una porción de individuos que no responden y de otros que lo hicieron pero en diferentes grados, lo que señala entonces una heterogeneidad de la respuesta inmune en esta parasitosis.

Ante la ausencia de información relacionada con la respuesta humoral en la himenolepiasis humana, no es posible relacionarla mas que con lo reportado para otras enfermedades parasitarias, en las cuales se sabe de la existencia de anticuerpos séricos y que la respuesta es heterogénea y diferente en relación a los antígenos utilizados (Parkhouse y cols., 1987; Gómez-Priego, 1985). No obstante, en el modelo murino se ha reportado la presencia de anticuerpos séricos contra antígenos de H. nana identificando también algunas de las

funciones de estos anticuerpos. Como Di Conza, (1969) e Ito, (1975) que realizaron estudios de transferencia pasiva de la inmunidad contra H. nana con suero de ratones previamente infectados. Ito, (1975) quien reportó que en ratones previamente infectados con huevos de H. nana era posible detectar anticuerpos séricos de 7 a 14 días después de la infección y que estos anticuerpos eran capaces de aglutinar oncosferas in vitro. Al parecer, para que en el ratón se lleve a cabo el proceso de inmunidad llamado respuesta temprana, es decir aquella que impide la reorganización morfológica y funcional de oncosfera a cisticercoide, la participación de altos títulos de anticuerpos no es requisito indispensable (Ito y cols., 1986). Por otro lado, Rickard y cols., (citado por Ito y cols., 1986) quienes mostraron que en ratones infectados con huevos de H. nana existían anticuerpos contra huevos y adultos, aunque los últimos solo se detectaron en el suero de los ratones en los cuales se encontraron adultos en su intestino.

Por otro lado, si se considera al subgrupo de niños que presentaron huevos de H. nana en el CPS de control y en los cuales se supone que aparentemente existió falla terapéutica con Albendazol, es posible que se completara al menos un ciclo biológico adicional del parásito y por lo tanto un posible segundo estímulo antigénico causado por las oncosferas, lo que pudiera explicar el mayor coeficiente de variación observado con

el uso de los antígenos OB comparativamente con el observado en el otro subgrupo.

No obstante la presencia de anticuerpos en los niños, no es evidencia suficiente que indique un papel protector o modulador de estos anticuerpos para el curso que pueda seguir la infección, ya que las diferencias observadas entre las medias en los dos subgrupos, no son estadísticamente significativas hacia ninguno de los tres antígenos.

Es necesario realizar estudios de caracterización inmunoquímica de los antígenos somáticos de H. nana, para determinar cuales de las entidades moleculares presentes en los extractos son los responsables de la respuesta humoral en los niños, como de protección en los ratones; así como la localización topográfica de estos antígenos en las diferentes estructuras anatómicas del parásito y hacia cual de estos componentes se observa mayor afinidad de los anticuerpos detectados.

Desde el punto de vista diagnóstico, la detección de anticuerpos contra H. nana resulta poco práctica, comparado con la facilidad y eficiencia de los métodos copro-parasitoscópicos actualmente utilizados (Salazar y De Haro, 1980); sin embargo, desde el punto de vista inmunológico y considerando el ciclo de vida del parásito, la información obtenida pudiera estar relacionada con el tiempo que los

antígenos de H. nana estimulan el sistema inmune del huésped. El tiempo que transcurre entre la penetración de la oncosfera a las vellosidades intestinales y su desarrollo a cisticercoides es de 2 a 4 días (Chandler y Read, 1961), en tanto que el tiempo en que el adulto permanece adherido a la mucosa intestinal a través del aparato rostral y el escólex, es de hasta 90 días en el ratón (Kano e Ito, 1983).

Llama la atención que la mayor proporción de reacciones cruzadas se obtuvo con sueros de individuos teniásicos y cisticercosos, con medias y rangos similares a los del grupo de himenolepiásicos. Esta observación, al mismo tiempo que pudiese sugerir la existencia de antígenicos comunes entre H. nana, Taenia saginata y T. solium, podría aportar nuevas evidencias para apoyar el concepto de que la detección de anticuerpos séricos en la cisticercosis, en la hidatidosis y ahora en la himenolepiasis, únicamente indicaría contacto del huésped con los antígenos provenientes de cestodos, es decir, únicamente identificaría cestodiasis.

Estos comentarios, junto con los bajos valores de predicción para un resultado positivo y los mostrados para la especificidad, podrían sugerir que los anticuerpos detectados con la prueba de ELISA podrían no ser específicos para H. nana, por lo que me propongo en una futura investigación purificar dichos antígenos con el fin de encontrar alguno que no posea estas posibles reacciones cruzadas.

RESUMEN

En el modelo murino, se estudió el posible efecto inmunizante de antígenos solubles de Hymenolepis nana, administrados parenteralmente antes o después de la infección experimental con huevos de este parásito. Se estudiaron ratones de la cepa CD-1 libres de la infección natural con H. nana. Los antígenos utilizados fueron extractos solubles de la región cefálica (AC); de los proglótidos grávidos (PG); del helmineto total (AT) y de las oncosferas y bloques embrioforales (OB). Asimismo, se buscaron anticuerpos contra los antígenos AT, AC y OB en la prueba de ELISA utilizando sueros de 52 niños infectados con H. nana antes de recibir tratamiento con Albendazol. Los resultados señalan que es posible inducir un alto grado de inmunidad a la infección por huevos de H. nana con 30-60 ug de antígenos PG, AC, y AT, aunque en menor proporción con los de OB. Por otro lado, con la inoculación parenteral de éstos antígenos en ratones previamente infectados, también se logró inducir la expulsión de los adultos localizados en la luz intestinal, siendo nuevamente los antígenos de OB los menos eficientes en lograrlo. Los sueros de los 52 niños himenolepiásicos mostraron anticuerpos contra los tres antígenos utilizados, aunque la respuesta fué heterogénea para los tres antígenos. Por último, no se observó ninguna influencia de la presencia de anticuerpos para el éxito terapéutico con el Albendazol,

excepto por una respuesta más homogénea hacia los antígenos OB (coeficiente de variación= 14.82%) en los niños que no presentaron huevos de H. nana en el examen CPS de control, y una tendencia general a que la respuesta serológica fuera mayor hacia los antígenos cefálicos. Finalmente, se observó una alta proporción de reacciones cruzadas en sueros de individuos con otras cestodiasis (Teniasis o cisticercosis). Estos resultados señalan que los antígenos solubles de H. nana son capaces de inducir una respuesta inmune que impide la instalación del parásito y que es capaz de eliminar al adulto luminal ya establecido. Asimismo, se demuestra por primera vez, la existencia de anticuerpos séricos en niños infectados con esta parasitosis.

CONCLUSIONES

- 1) Puede inducirse un alto grado de inmunidad en el ratón ($p < 0.05 - 0.005$) mediante el uso parenteral de antígenos somáticos de Hymenolepis nana, tanto si se inmuniza primero y se infecta después, como si se infecta primero hasta el desarrollo de helmintos maduros (21 días) y después se inmuniza.
- 2) Existen anticuerpos séricos en la himenolepiasis humana que pueden ser detectados por la prueba de ELISA.
- 3) Estos anticuerpos por si solos parecen no influir en el éxito terapéutico de la enfermedad y su detección solo señala la presencia de alguna cestodiasis en general.

- Aguilar, M.T. (1986) Inmunidad inducida en el ratón con antígenos oncosferales de Taenia solium y T. saginata. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Asano, K., Nakamura, F., and Okamoto, K. (1982) Passive protection of nude mice with lymphocytes from mice infected with Hymenolepis nana eggs. Japanese Journal of Parasitology, **31**, 391-400.
- Avrameas, S., and Ternick, T. (1972) Peroxidase labeled antibody and FAB conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry, **8**, 1175-1179.
- Barth, E.E., Jarret, W.F. and Urquhart, G.M. (1966) Studies on the mechanism of self cure reaction in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis. Immunology, **10**, 459-464.
- Befus, A. D. and L. T. Threadgold (1975) Possible immunological damage to the tegument of H. diminuta in mice and rats. Parasitology, **71**, 525-534.
- Berntzen A.K. and Vogue, M. (1965) In vitro hatching of oncospheres of four Hymenolepid cestodes. Journal of Parasitology, **51**, 235-242.
- Catty, D., Raykundalia, C., and Houba, V. (1983) Bench manual of techniques for the preparation of immunological and immunodiagnostic reagents. Part II: Preparation of enzyme conjugates of antibodies for human immunoglobulins IgG, IgA and IgM and their quality control. Performance of indirect ELISA tests. General considerations for a standard protocol. WHO Mimeo Doc. IMMIPIRI, **83**, 1, pp. 35.
- Chandler, A.C. and Read, C.P. (1961) "Introduction to Parasitology" John Wiley and Sons, Inc. New York, pp. 367.
- Coleman, R.M., Carty, W.D. and Graziadei, W.D. (1968) Immunogenicity and phylogenetic relationship of tapeworm antigens produced by Hymenolepis nana and H. diminuta. Immunology, **15**, 297-304.
- Dice, L., and Leraas, H. (1936) A graphic method for comparing several sets of measurements. Contribution to Laboratory Vertebrate Genetics, **3** (1), 1-3.
- Di Conza, J. (1969) Protective Action of Passively transferred immune serum and Immunoglobulin fractions against tissue invasive stages of the Dwarf Tapeworm Hymenolepis nana. Experimental Parasitology, **43**, 169-179.
- Di Conza, J. (1970) Hymenolepis nana: Mouse subcutaneous tissue response to larval stages. Experimental Parasitology, **28**, 482-492.

- Dominguez, S.J. (1980) Tesis de especialidad: Sintomatología en niños con himenolepiasis pura. INP DIF México, D.F.
- Downie, V.M. and Heath, R.W. (1971) "Basic Statistical Methods". Harper & Row, New York. pp, 196-197.
- Evans, W.S., Hardy, M. and Novak, M. (1980) A comparison of the effect of Albendazole, Cambendazole and Thiabendazole on the larval development of three hymenolepid Cestodes. Journal of Parasitology, 66 (6), 935-940.
- Faust, E.C., Russell, P.F. and Jung, R.C. (1981) "Craig y Faust, Parasitología Clínica", pp. 822, Salvat Editores, México.
- Friedberg, W., Neas, B.R., Faulkner, D.N., and Friedberg, M.H. (1967) Immunity to Hymenolepis nana: Transfer by spleen cells. Journal of Parasitology, 53, 895-896.
- Friedberg, W., Neas, B.R., Faulkner, D.N., and Congdon, C.G. (1979). Intestinal tissue phase in actively immunized mice. Journal of Parasitology, 65(1), 61-64.
- Furukawa, T. (1971) Development of Hymenolepis nana cysticercoids in the subcutaneous tissue of mice and inhibition of larval development in immune mice. Japanese Journal of Parasitology, 20, 331-340.
- Furukawa, T. (1974) Adherence reactions with mouse lymphoid cells against the oncosphere larvae of Hymenolepis nana. Japanese Journal of Parasitology, 28, 236-249.
- Furukawa, T., Miyazato, T., Okamoto, K., and Nakai, Y. (1977) The fine structure of the Hatched oncospheres of Hymenolepis nana. Japanese Journal of Parasitology. 26 (2), 49-62.
- Furukawa, T., Miyazato, T., and Inoue, T. (1979) Comparison of protective immunity against Hymenolepis nana infection in mice immunized by oral egg infection, oral cysticercoid infection and subcutaneous egg infection. Acta Medica Kinki University, 4, 49-56.
- Furukawa, T., Niwa, A., and Miyazato, T. (1981) Ultrastructural Aspects of Immune damage to Hymenolepis nana oncospheres in mice. International Journal for Parasitology, 11 (4), 287-300.
- Furukawa, T. (1983) Protective immunity to Hymenolepis nana infection in mice. Acta Medica Kinki University, 8 (2), 165-180.

- Dominguez, S.J. (1980) Tesis de especialidad: Sintomatología en niños con himenolepiasis pura. INP DIF México, D.F.
- Downie, V.M. and Heath, R.W. (1971) "Basic Statistical Methods". Harper & Row, New York. pp, 196-197.
- Evans, W.S., Hardy, M. and Novak, M. (1980) A comparison of the effect of Albendazole, Cambendazole and Thiabendazole on the larval development of three hymenolepid Cestodes. Journal of Parasitology, **66** (6), 935-940.
- Faust, E.C., Russell, P.F. and Jung,, R.C. (1981) "Craig y Faust, Parasitología Clínica", pp. 822, Salvat Editores, México.
- Friedberg, W., Neas, B.R., Faulkner, D.N., and Friedberg, M.H. (1967) Immunity to Hymenolepis nana: Transfer by spleen cells. Journal of Parasitology, **53**, 895-896.
- Friedberg, W., Neas, B.R., Faulkner, D.N., and Congdon, C.G. (1979). Intestinal tissue phase in actively immunized mice. Journal of Parasitology, **65**(1), 61-64.
- Furukawa, T. (1971) Development of Hymenolepis nana cysticercoids in the subcutaneous tissue of mice and inhibition of larval development in immune mice. Japanese Journal of Parasitology, **20**, 331-340.
- Furukawa, T. (1974) Adherence reactions with mouse lymphoid cells against the oncosphere larvae of Hymenolepis nana. Japanese Journal of Parasitology, **28**, 236-249.
- Furukawa, T., Miyazato, T., Okamoto, K., and Nakai, Y. (1977) The fine structure of the Hatched oncospheres of Hymenolepis nana. Japanese Journal of Parasitology. **26** (2), 49-62.
- Furukawa, T., Miyazato, T., and Inoue, T. (1979) Comparison of protective immunity against Hymenolepis nana infection in mice immunized by oral egg infection, oral cysticercoid infection and subcutaneous egg infection. Acta Medica Kinki University, **4**, 49-56.
- Furukawa, T., Niwa, A., and Miyazato, T. (1981) Ultrastructural Aspects of Immune damage to Hymenolepis nana oncospheres in mice. International Journal for Parasitology, **11** (4), 287-300.
- Furukawa, T. (1983) Protective immunity to Hymenolepis nana infection in mice. Acta Medica Kinki University, **8** (2), 165-180.

- Furukawa, T., Shinkai, S., Shimamura, M., Miyazato, T., Baltz, M.L. and Pepys, M.B. (1984) Circulating Immunoglobulins and Complement in mice with Hymenolepis nana infection. *International Journal for Parasitology*, **14** (3), 293-299.
- Gómez-Priego, A. (1985). Serodiagnóstico de la oncocercosis con especial referencia a México. pp. 228-270. En: Quiroz-Romero, H. y García-Yañez, Y. (Eds.) *Parasitología. Volumen conmemorativo del 25 aniversario de la Sociedad Mexicana de Parasitología*, A.C. Vol 1. Aries al Instante S.A. México, D.F.
- Hashimoto, A. (1972) Anti-lymphocyte serum effects on Hymenolepis nana infection in mice. *Medical Journal Showa University*, **32**, 292-296.
- Hearin, J.T. (1941) Studies on the acquired immunity to the dwarf tapeworm Hymenolepis nana var. *fraterna* in the mouse host. *American Journal of Hygiene*, **33**, 71-87.
- Heyneman, D. (1962a) Studies on helminth immunity: 1.- Comparison between luminal and tissue phases of infection in the white mouse by Hymenolepis nana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **11**, 46-63.
- Heyneman, D. (1962b) Studies on helminth immunity: IV.- Rapid onset of resistance by the white mice with eggs of Hymenolepis nana. *Journal of Immunology*, **88**, 217-220.
- Hunninen, A.V. (1935). A method of demonstrating cysticercoids of Hymenolepis fraterna (H. nana var. *fraterna*, Stiles). in the intestinal villi of mice. *Journal of Parasitology*, **21**, 124-125.
- Hopkins, C.A., Subramaian, G. and Stallard, H. (1972) The development of H. diminuta in primary and secondary infections in mice. *Parasitology*, **64**, 401-12.
- Inoue, T., Furukawa, T. and Miyazato, T. (1979) Growth of Hymenolepis nana cysticercoids in the mesenteric lymph nodes and livers of mice. *Japanese Journal of Parasitology*, **28**, 309-316.
- Inoue, T., (1984) Histopathological studies of mice actively and passively immunized with Hymenolepis nana. *Acta Medica Kinki University*. **9** (2), 191-209.
- Isaak, D., Jacobson, R. and Reed, D. (1977) The course of Hymenolepis nana infections in Thymus-Deficient mice. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. **55**, 504-513.

- Ito, A. (1975) In vitro oncospherical agglutination given by immune sera from mice infected and rabbits injected with eggs of Hymenolepis nana. Parasitology, 71, 465-473.
- Ito, A. and Yamamoto, M. (1976) The mode of active protection against Hymenolepis nana reinfection in mice inoculated with different doses of shell-free eggs. Japanese Journal of Parasitology, 25, 247-253.
- Ito, A. (1977) The mode of passive protection against Hymenolepis nana induced by serum transfer. International Journal of Parasitology, 7, 67-71.
- Ito, A. and Yamamoto, M. (1977) Maturation of initially infected Hymenolepis nana under rapid protective immunity against reinfection with eggs. Japanese Journal of Parasitology, 26 (5), 301-306.
- Ito, A. (1978) Immunity against mouse-derived cysticercoids induced by initial inoculation with eggs. Experimental Parasitology, 46, 12-19.
- Ito, A., Yamamoto, M., and Okamoto, K. (1978) Primary infection with mouse derived cysticercoids of Hymenolepis nana prepared from baby or adult mice and secondary infection with eggs or cysticercoids. International Journal for Parasitology, 8, 149-153.
- Ito, A. (1981) Hymenolepis nana: Immunogenicity of a Lumen Phase of the direct Cycle and Failure of Autoinfection in Balb/c mice. Experimental Parasitology, 54, 113-120.
- Ito, A. (1984) IgG and IgE antibodies to Hymenolepis nana detected in infected mouse sera by Gel Diffusion and Passive Cutaneous Anaphylaxis Tests. Journal of Parasitology, 70 (1), 171-172.
- Ito, A., Kano, S., Hioki, A., Kasuya, S. and Ohtomo, H. (1986) Correlation between antibody response and patent infection with Hymenolepis nana in mice. International Journal for Parasitology, 16 (3), 197-203.
- Kano, S. and Ito, A. (1983) Influence of the host immune responses on the modes of primary infection and autoinfection with Hymenolepis nana in mice. Japanese Journal of Parasitology, 32 (3), 183-193.
- Larsh, J.E. Jr. (1942) Transmission from mother to offspring of immunity against the mouse cestode Hymenolepis nana var. fraterna. American Journal of Hygiene, 36, 187-194.
- Larsh, J.E. (1944) Studies on the artificial immunization of mice against infection with the Dwarf Tapeworm Hymenolepis nana var. fraterna. American Journal of Hygiene, 39, 129-134.

- Larsh, J.E. (1975) Allergic inflammation as an hypothesis for the expulsion of worms from tissues. A review. *Experimental Parasitology*, **37**, 251-266.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin serial reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Martin, L. K., and Beaver, . (1968). Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminthic infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **17**(5), 382-391.
- Méndez-Ramírez, I., Namihira, G.D., Moreno, A.L. y Sosa de M. C. (1984) El Protocolo de Investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Ed. Trillas. México. pp. 210.
- Miyazato, T., Furukawa, T., Inoue, M., Niwa, A. and Inoue, T. (1977a) Fine structure and the mode of secretory function of the penetration glands of Hymenolepis nana oncospheres. *Medical Journal Kinki University*, **2**, 177-180.
- Miyazato, T., Furukawa, T., Inoue, M., Niwa, A., Inoue, T., and Shimoda, K. (1977b) Electron microscopic observations of the penetration of oncospheres of Hymenolepis nana into the intestine of the mouse. *Acta Medica Kinki University*, **2**, 1-18.
- Molinari, J.L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, S., Tato, P., and Retana, A. (1983a) Taenia solium: Immunity in Hogs to the *Cysticercus*. *Experimental Parasitology*, **56**, 327-338.
- Molinari, J.L., Meza, R. and Tato, P. (1983b) Taenia solium. Cell reactions to the larvae (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Experimental Parasitology*, **56**, 327-338.
- Morrow, R.H. 1981. Diagnostic measures in tropical diseases. Epidemiological perspectives. pp. 37-43. In: Morrow R.H. (Ed) Report on an Informal Consultation on further Development of diagnosis methods for tropical diseases. UNDP/world Bank/WHO Special programme for Research and training in tropical diseases.
- Novak, M. and Evans, W.S. (1981) Mebendazole and the development of Hymenolepis nana in mice. *International Journal for Parasitology*, **11** (4), 277-280.
- Okamoto, K. (1969) Effect of cortisone on acquired resistance to Hymenolepis nana in mice. *Japanese Journal of Parasitology*, **18**, 591-594.

- Okamoto, K., Furukawa, T., Hashimoto, A., and Koibuchi, E. (1974) Host response to Hymenolepis nana infection in infant mice. Japanese Journal of Parasitology, **23**, 25-30.
- Okamoto, K., Suzuki, Y. and Hagiwara, T. (1980) Protective immunity in mice subcutaneously inoculated at an early age with Hymenolepis nana eggs. Japanese Journal of Parasitology, **29**, 137-141.
- Duchterlony, O. and Nilsson, L.A. (1979) Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (Ed.) "Handbook of Experimental Immunology" Vol 1. Immunochemistry. Blackwell Scientific Publications. 19.1-19.44.
- Parkhouse, R.M.E., Cabrera, Z., Harnett, Z. (1987) Onchocerca antigens in protection, diagnosis and Pathology. In press.
- Pérez, M.F. (1976) Tesis de especialidad: Himenolepiasis en Pediatría. INP DIF México, D.F.
- Rajasekariah, G.T., Rickard, M.D. and Mitchell, G.F. (1980 a) Taenia taeniformis in mice. Protective immunization with oncospheres and their products. International Journal for Parasitology, **10**, 115-160.
- Rajasekariah, G.R., Rickard, M.D., and Mitchell, G.F. (1980b) Immunization of mice against infection with Taenia taeniformis using various antigens prepared from eggs, oncospheres, developing larvae and strobilocerci. International Journal for Parasitology, **10**, 315-324.
- Rajasekariah, G.R., Rickard, M.D., Mitchell, G.F., and Anders, R.F. (1982) Immunization of mice against Taenia taeniformis using solubilized oncospherical antigens. International Journal of Parasitology, **12**, 111-116.
- Rickard, M. D., and Adolph, A.J. (1977) Vaccination of lambs against infection with Taenia ovis using antigens collected during short term in vitro incubation of activated T. ovis oncospheres. Parasitology, **75**, 183-188.
- Salazar, P.M. y De Haro, I., (1980) "Manual de Técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis", pp. 93-96. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México, D.F.
- Scheidegger, J.J. (1958) Une micro-methode de l'immuno-electrophorese. International Archives of Allergy, **7**, 103.
- Schmidt, G.D. y Roberts, L.S. (1977) "Fundamentos de Parasitología". pp. 405-408. Editorial Continental, México, D.F.

- Schuck, B. (1952) "Studies on the Trypanosomes of some California Mammals" University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Tato, P., Flisser, A., Gavilanes, M. and Molinari, J.L. (1979) Immunogenic complexes obtained from Salmonella typhimurium and Salmonella typhi Ty2 by the bacterial acetone powder method. *Annales de Microbiologie (Institute Pasteur)*, 130A, 47-60.
- Tato, P. (1986) Cisticercosis: Inmunidad en Cordos. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tay, J., Lara, R., Velasco, O., Gutiérrez, M. (1985). "Parasitología Médica". pp. 209-212, Ed. Francisco Méndez Cervantes. México, D.F.
- Threadgold, L.T. and Befus, A.D. (1977) Hymenolepis diminuta: Ultrastructural localization of Immunoglobulin binding sites on the Tegument. *Experimental Parasitology*, 43, 169-179.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1979) "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)". A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories Inc. Alexandria, Virginia, USA, pp. 125.
- Weinmann, C. (1964) Host resistance to Hymenolepis nana. II: Specificity of Resistance to reinfection in the Direct-Cycle. *Experimental Parasitology*, 15, 514-526.
- Weinmann, C.J. (1966) Immunity mechanisms in cestode infections. In: "Biology of Parasites". Goulsby, E.J. Ed. New York Academic Press. pp. 301-320.
- Weinmann, C.J. (1969) Larval development of Hymenolepis nana (cestoda) in different classes of vertebrates. *Journal of Parasitology*, 55, 1141-1142.