

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

32
2ej

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**EVALUACION DE LA TECNICA DE
MICROHEMAGLUTINACION PASIVA
PARA EL DIAGNOSTICO DE
CISTICERCOSIS CEREBRAL
HUMANA**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

NORMA PATRICIA TAM SAENZ

ASESOR: DR. JULIO JAIME MENDIOLA GOMEZ

GUADALAJARA, JAL., 1986



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.

I N T R O D U C C I O N .

El interés en el área de la inmunología de infecciones por céstodos se ha intensificado con la emergencia de cisticercosis e hidatidosis como grandes problemas económicos y de salud pública en muchas partes del mundo (3), y la realización de medidas de educación pública y quimioterapéutica han tenido sucesos limitados en prevención y control. Por el contrario, la existencia de estas infecciones generalmente han permanecido sin afectación o como incremento aún en los países desarrollados donde la expansión de la teniasis ha ocurrido a través de la importación de animales infectados, inmigración y turismo, y a través del desarrollo de esquemas de conservación del agua, los cuales diseminan huevos infectivos (Notassian y col., 1977; Rickard y Adolp, 1977).

Bajo estas circunstancias no es sorprendente que se tenga la esperanza en las pruebas inmunológicas de infecciones por céstodos para procedimientos profilácticos y de diagnóstico que podrían contribuir a programas médicos de prevención más efectivos que se podrían desarrollar en huéspedes definitivos e intermediarios.

Debido a observaciones que se han realizado sobre trabajos publicados por instituciones de prestigio en nuestro país como son el Instituto Mexicano del Seguro Social, la Universidad Nacional Autónoma de México y otras, se pretende con éste trabajo de

investigación elaborar la técnica de "Micro Hemaglu
tinación Pasiva" para diagnosticar cisticercosis ce
rebral en el humano como prueba de laboratorio sen_
sible, confiable, reproducible y de fácil aplica_
ción en nuestro medio.

RESPUESTA INMUNE EN INDIVIDUOS CON CISTICERCOSIS
CEREBRAL

La cisticercosis es en nuestro medio, la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central en el hombre. Es causada por infección con la forma larvaria de *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*), y se manifiesta con los más variados síndromes neurológicos y psiquiátricos (4).

La cisticercosis tanto humana como porcina es cosmopolita. En México probablemente los primeros casos de pacientes con cisticercosis cerebral se publicaron en 1888 (13). Se ha estimado que la frecuencia de la cisticercosis del sistema nervioso central en nuestro país es del 0.8 a 4 por ciento aproximadamente; sin embargo, estas cifras han permanecido prácticamente sin variación en los últimos cuarenta años (8,9,10,11,12).

Se desconoce la frecuencia real de la cisticercosis del sistema nervioso central a causa de las dificultades para realizar el diagnóstico en los pacientes asintomáticos o con pocas manifestaciones clínicas, con lo que las cifras de la frecuencia de cisticercosis nos dan sólo una idea aproximada de la magnitud de éste problema.

Mazzoti (1944) encontró en 4000 muestras de ma

teria fecal, el 2% con huevos de Taenia sp. Nieto (1946) en 5000 líquidos cefalorraquídeos de pacientes siquiátricos detectó el 6% de casos positivos confirmados parasitológicamente; en éste mismo año Robles (26) informó que la cisticercosis junto con la tuberculosis ocupaban el primer lugar entre las causas que originan hipertensión intracraneal. Albores y Altamirano (1972), en 9412 autopsias realizadas en el Hospital General de la Ciudad de México, en un período de 18 años (1953-1970), la cisticercosis se encontró en el 1.3% (13 lugar) y aunque no corresponde a los datos encontrados por Briseño (3.5%) y Costero (3.3%), se observa que sigue siendo un problema muy importante, ya que la mortalidad se debe a localización cerebral o meníngea, y según Reyes Armijo y Beltrán Góñi esta parasitosis origina el 10% de los casos de hipertensión endocraneana. Por serología Gold-Smith y sol. (1971) encontraron el 3.8%. La frecuencia de la cisticercosis en cerdos varía mucho dependiendo del método de diagnóstico utilizado y de la región o sitio estudiado.

El *Cisticercus cellulosae* es una vesícula ovoide, de color blanquecino, mide de 3 a 10 mm de largo y está constituida por una membrana de grosor uniforme que se invagina y continúa con el cuello y escólex el cual presenta cuatro ventosas y un roseto con doble corona de ganchos. La vesícula está ocupada por un líquido rosado denominado fluido vesicular con abundantes proteínas, carbohidratos y lípidos.

La localización de la larva en el sistema ner_

vioso central es la más estudiada debido a las alteraciones tan severas que se presentan, así como por el examen minucioso que de él realizan los patólogos en las autopsias.

Los parásitos pueden encontrarse en el parénquima, en las circunvoluciones del cerebro o en la base del cráneo afectando nervios craneales por mecanismos compresivos, pero si la larva muere se presentan alteraciones inflamatorias y alérgicas con vasculitis y meningitis basal crónica que frecuentemente causa la muerte. También se pueden localizar en el sistema ventricular, donde interfieren el flujo normal del líquido cefalorraquídeo, produciendo hipertensión intracraneal y en ocasiones hidrocefalia. La hipertensión intracraneal es una manifestación muy común en la cisticercosis cerebral, produciéndose cefalea, edema de la pspila, alteraciones de la visión, vómito y sintomatología de pares craneales. Los cuadros convulsivos de tipo epileptiforme son frecuentes (26).

Se han hecho múltiples intentos para realizar el diagnóstico con certeza en la cisticercosis del sistema nervioso central, mediante estudios que ponen de manifiesto la presencia de anticuerpos contra cisticerco, como la "Fijación de Complemento" en el líquido cefalorraquídeo, las "Reacciones de Precipitación" y "Hemaglutinación" en suero y líquido cefalorraquídeo, la "Respuesta de Transformación Linfoblástica", la prueba de "Inmunolectroforesis" y la "Doble Inmunodifusión en Agar", y la prueba de "Inmunofluorescencia Indirecta" con suero; pero en

general se puede decir que con éstos métodos se ha obtenido una pobre discriminación entre pacientes con cisticercosis del sistema nervioso central y los pacientes sanos, observando resultados que van desde 30% de positividad hasta el 40 a 50% de falsos negativos, ya que los métodos de laboratorio tienen una pobre discriminación entre pacientes con teniasis intestinal y los pacientes con cisticercosis en diferentes tejidos.

Por muchos años se descartaba la idea de que las infecciones intestinales con cístodos adultos podrían provocar respuestas inmunológicas en el huésped definitivo (3). Actualmente, se ha aclarado que esto no es verdad. La evidencia de infecciones experimentales y naturales con vermes adultos típicos han demostrado que ocurren respuestas de anticuerpo específicas, y que contribuyen inmunológicamente mecanismos mediadores efectores en la interacción huésped parásito.

El contacto entre la superficie de la mucosa intestinal con el órgano de contacto del cístodo adulto debe ser muy cercano, no es necesario proponer que esto sea un prerrequisito para la estimulación de la respuesta de anticuerpos. Existe amplia evidencia de la formación de anticuerpos en la administración oral o intrainestinal de antígenos no invasivos derivados de cístodos. Numerosos estudios coinciden en que los anticuerpos contra cisticercosis son capaces de conferir inmunidad ya sea por transferencia artificial por medio de sueros de animales hiperinmunes (14).

La presencia de inmunoglobulinas en líquido cefalorraquídeo de los pacientes es resultado de la fase efectora de la respuesta inmune en el sistema nervioso central por estimulación de diversos antígenos, ya que se ha detectado una concentración de IgG en el líquido cefalorraquídeo en los pacientes sanos y con cisticercosis cerebral comprobada; sin embargo las concentraciones máximas se encuentran en los pacientes con cisticercosis comprobada, lo que indica una estimulación prolongada por antígenos de cisticerco, y el predominio de IgG sugiere que se trata de un proceso crónico (4).

Se han dirigido investigaciones para evaluar la clase de inmunoglobulina que produce la protección, demostrando que la IgG y la IgA son los anticuerpos involucrados en la resistencia contra diferentes especies de céstodos (15, 16). Actualmente no se ha demostrado que las inmunoglobulinas IgM contribuyan al estado de resistencia en el individuo.

La escasa concentración de inmunoglobulinas en líquido cefalorraquídeo es una limitación para identificar anticuerpos (17, 18), por lo que en éste estudio se logró tener una mayor concentración de anticuerpos contra cisticerco al concentrar las proteínas del líquido cefalorraquídeo para identificarlas por su capacidad para aglutinar los eritrocitos previamente sensibilizados con antígeno de cisticerco en la técnica de Microhemaglutinación Pasiva.

La producción de anticuerpos séricos por animales infectados implica la posibilidad del diagnóstico

tico de la enfermedad, no obstante, la ausencia de anticuerpos no excluye el diagnóstico de cisticercosis, puesto que la reacción humoral inmunitaria puede ser de magnitudes variables. Prácticamente todas las pruebas serológicas ordinarias para la investigación de anticuerpos contra cisticercosis tienen el problema de las reacciones cruzadas falsas negativas. En el hombre se ha demostrado por inmunoelectroforesis que 40% de los pacientes con cisticercosis confirmada carecen de anticuerpos precipitantes en el momento de la prueba (20).

La imposibilidad para identificar anticuerpos específicos del antígeno de cisticercosis, se puede explicar porque la concentración de anticuerpos contra cisticercosis sea muy pequeña, porque la sensibilidad de la técnica no alcance a detectarlos, porque halla un estado de tolerancia inmunológica al antígeno de cisticercosis o porque existen variaciones antigénicas (serotipos) de los cisticercos.

Actualmente se conoce que el cisticercosis desarrollado completamente es resistente al ataque inmunológico; sólo las larvas son susceptibles al mismo (19).

La manera en que el cisticercosis evade la acción de la reacción inmunitaria se ha explicado por variación antigénica del cisticercosis más rápida que la reacción inmunológica (21), anticuerpos bloqueados que compiten con anticuerpos citotóxicos (22, 23), o bien, que el parásito esté rodeado por una cubierta de componentes del huésped que lo hacen im

permeable a los anticuerpos y a las células inmuno_ competentes, por último que el parásito puede indu_ cir tolerancia inmunológica (24).

La investigación de la participación de la in_ munidad celular en la resistencia a la cisticerco_ sis se ha limitado en algunos intentos de transferir inmunidad por células. Sin embargo, hay clara evi_ dencia de hipersensibilidad retardada en cisticerog_ sis inducida en ratones por *Cysticercus fasciolaris*, pero no está clara su participación sobre la protec_ ción (25).

RESPUESTA INMUNE EN ANIMALES DE LABORATORIO

Recientemente se ha reportado sobre los primeros intentos para evaluar respuestas serológicas y de hipersensibilidad cutánea en experimentos con cerdos infectados. Se detectaron anticuerpos circulantes y ocurrieron reacciones inmediatas cutáneas, pero no se ha encontrado una correlación útil entre positividad y presencia o grado de infección. Pruebas de anafilaxia cutánea pasiva indicaron que los anticuerpos que producían una corta sensibilización de la piel diferentes de las reaginas, fueron responsables de las reacciones cutáneas que se observaron en su experimento. Las reaginas, por otra parte, se demostraron en el suero de borregos infectados con *Taenia multiceps* y otros tenídeos, por lo tanto, no hay evidencia de especificidad de especie que se requerirá; los procedimientos prácticos para diagnóstico se desarrollan en base a ésta técnica.

Los estudios realizados en cerdos mediante la técnica de precipitación determinaron la producción de anticuerpos diferentes de las reaginas (3).

Ricard y Bell (1968) fueron capaces de probar un alto grado de resistencia contra *Taenia ovis* en borregos por medio de implantación intraperitoneal de cámaras de difusión conteniendo oncosferas activadas y por vacunación con antígenos recolectados a los 14 días IN VITRO de cultivo de embriones

de *Taenia ovis*. Los antígenos de las oncosferas se empiezan a producir en etapas muy tempranas del desarrollo larvario lo cual induce la producción de anticuerpos protectores a niveles muy altos en el calostro de los animales en estudio.

Antígenos de tenias de diferentes especies pueden liberar potentes inmunógenos, los cuales pueden proveer un alto grado de protección a los productos IN UTERO y a neonatos.

Está claro que ni la infección prolongada ni transitoria con organismos viables son necesarios para estimular la protección de larga duración. Los inmunógenos efectivos se pueden colectar de cultivos IN VITRO en medios simples, así los detalles físico-químicos o su naturaleza pueden experimentarse. Las indicaciones de la presencia de reacciones cruzadas y antígenos específicos de especie sugieren que éstas mezclas deben ser investigadas profundamente.

El mecanismo de resistencia en animales vacunados permanece aún desconocido. No está claro si el uso de adyuvante de Freud's es un prerrequisito para la inmunización efectiva.

Finalmente, uno de los descubrimientos más consistentes por resurgir de éstos experimentos es que ningún mecanismo inmunológico, ya sea natural o artificialmente inducidos, parecen ser capaces de provocar la destrucción del parásito que ya está establecido en el tejido. Experimentalmente se ha demostrado que los anticuerpos protectores en ratas in__

fectadas con *Taenia taeniaeformis* están exclusivamente asociados con inmunoglobulinas del tipo IgG_{2a} durante las primeras cuatro semanas de infección. Después de las cuatro semanas si otras clases de inmunoglobulinas están involucradas no es seguro. Parece ser que la inducción de una respuesta inmune protectora es más potente utilizando el antígeno junto con el adyuvante de Freud's.

La protección está determinada por la presencia de IgA secretora e IgG_1 en el calostro para ratones. En roedores experimentalmente se ha demostrado producción de IgE a partir de las dos a tres primeras semanas fetales y alcanzando un máximo en la sexta semana para disminuir posteriormente hasta niveles no detectables. Otros mecanismos protectores son mediados por la activación del sistema del complemento a través de la IgG_{2a} .

PRUEBAS DE LABORATORIO PARA IDENTIFICACION DE ANTI_
CUERPOS CONTRA CISTICERCO

- CONTRAINMUNOELECTROFORESIS
- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA
- FIJACION DE COMPLEMENTO
- HEMAGLUTINACION PASIVA
- ELISA
- RIA

a)CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Beltrán y Gómez Prieto (5) reportaron el uso de contrainmunelectroforesis en cisticercosis humana y experimental empleando cuatro antígenos, en contraron excelente correlación entre las condiciones clínicas del tejido en el huésped y el número de bandas de precipitación formadas. Se encontraron reacciones cruzadas con el suero de pacientes con *Echinococcus* sp., *Taenia saginata* y *Coenurus* sp. La prueba de DOBLE DIFUSION EN GEL se ha encontrado insensible con suero humano y animal.

b)INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

La prueba tiene aplicación clínica como ayuda para el diagnóstico de pacientes con cisticercosis. Estudios realizados en grupos de pacientes con cisticercosis comprobada, ningún caso resultó negativo, utilizando muestras de suero sanguíneo. Esta prue_

ba no delimita el sitio en que se circunscribe dicha parasitación, sino que permite descubrir su existencia (6).

En ésta prueba se usan como antígeno, cortes histológicos de cisticerco extraídos de la carne de cerdo, de un grosor de cinco micras, hechos en cristato.

Los intentos para demostrar anticuerpos contra antígeno de cisticerco en líquido cefalorraquídeo no han tenido mucho éxito debido a la poca concentración de anticuerpos contra el cisticerco en el líquido cefalorraquídeo.

c) FIJACION DE COMPLEMENTO.

La serología de cisticercosis es de interés para medicina y veterinaria. Los resultados que se han obtenido con la técnica de Fijación de Complemento han resultado inconsistentes. Así mismo, es difícil establecer comparaciones debido a las variaciones de los métodos y los reactivos usados en las diferentes técnicas, algunas evidencias indican que la prueba carece de sensibilidad y especificidad (7).

La prueba de Fijación de Complemento para enfermedades paritarias es la más antigua, la más ampliamente usada, y el más variado de todos los métodos serológicos, aunque sin algunas modificaciones, no es enteramente satisfactoria con antígenos paritarios. Las pruebas de tipo cuantitativo y la prueba modificada de Kolmer se han estandarizado con éxito; los resultados de diferentes laboratorios por lo general no son comparables. Todas las pruebas

emplean el 50% de hemólisis como punto final y requiere de una estandarización adecuada de los reactivos y técnicas. La aparición de resultados diferentes son causados generalmente por variaciones en técnicas, así como la diferencia de antígenos, una prueba simple de Fijación de Complemento es altamente aceptable.

d) HEMAGLUTINACION PASIVA.

Prueba en la cuál se utilizan eritrocitos de carnero (SRBC) tanzados e glóbulos rojos de humano como el acarreador inerte de varios antígenos parasitarios se han diseñado en la técnica de Boyden. Esta prueba se recomienda para toxoplasmosis, malaria, enfermedades hidatídicas, cisticercosis y VLN. La técnica es relativamente simple de realizar, y la prueba es muy sensible. El procedimiento se puede variar y sigue dando una reacción antígeno-anticuerpo aceptable.

Se han dirigido investigaciones para evaluar la clase de inmunoglobulina que produce la protección, demostrando que la IgG y la IgA (A) son los anticuerpos involucrados en la resistencia contra *Cisticercus posiformis* y *Cisticercus fasciolaris* en animales de laboratorio.

e) E.L.I.S.A. Y R.I.A.

La técnica de E.L.I.S.A. es sencilla, económica, reproducible y no expone al personal a material radiactivo como sucede con la técnica de R.I.A.

Esta prueba tiene una sensibilidad de 89.5% en el suero y una especificidad de 100%. Similarmente, la sensibilidad y especificidad en líquido cefalorraquídeo en ambos casos es de 94.7%. De manera que la sensibilidad de la prueba con muestras de líquido cefalorraquídeo es ligeramente mayor que la prueba con suero, y la especificidad ligeramente menor (7).

Actualmente, E.L.I.S.A. es la técnica más sensible que nos permite el grado deseado de confiabilidad en el diagnóstico de cisticercosis cerebral. estudios preliminares indican que con el antisuero específico apropiado, E.L.I.S.A. se puede usar para medir anticuerpos clase-específico, así como anticuerpos subclase-específico a los antígenos de cisticerco. Algunos investigadores han demostrado que los anticuerpos IgG es la clase de anticuerpo dominante en pacientes con cisticercosis. Clases de anticuerpos IgM, IgE e IgA se han detectado en menor grado. Se sugiere que anticuerpos IgD e IgG son cuantificables en muchos pacientes con técnicas de R.I.A. o E.L.I.S.A.

Finalmente, la técnica de E.L.I.S.A. tiene sensibilidad y especificidad similar que R.I.A., siendo ésta primera más sencilla y más económica.

Otras pruebas que están siendo estandarizadas y que al parecer tienen gran futuro son la aglutinación con partículas de látex que detecta anticuerpos en líquido cefalorraquídeo (26).

MATERIAL Y METODOS

DESARROLLO DE LA TECNICA DE MICRO HEMAGLUTINACION PASIVA

En la Micro Hemaglutinación Pasiva, los glóbulos rojos de carnero o humano tipo "O" se utilizan como soporte debido a que son fáciles de obtener y de conservar bajo ciertas condiciones durante 15 a 30 días en el laboratorio, además de fijar espontáneamente a su superficie casi todos los polisacáridos y ciertas proteínas antigénicas, cualidad que se incrementa cuando son tratados con ácido tánico, produciendo aglutinación cuando se ponen en contacto con inmunoglobulinas específicas.

Para conocer la cantidad de inmunoglobulinas presentes, se efectúan diluciones seriadas del suero con cantidades constantes de una suspensión de glóbulos rojos sensibilizados con antígeno específico; la dilución más alta de suero que determine una clara aglutinación, se considera como punto final de la reactividad y representa el título de la dilución.

I. EQUIPO Y REACTIVOS.

1. Centrifuga clínica.
2. Baño María a 56°C y a 37°C.
3. Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml graduados.

4. Pipetas serológicas de 0.2 y de 1 ml graduadas en centésimas, de 5 a 10 ml graduadas en décimas.
5. Vaso de precipitado de 50, 100 y 200 ml.
6. Matraces de 50 y 125 ml.
7. Equipo para MICROTITULACION:
 - a. Pipetas de 0.050 ml y 0.025 ml.
 - b. Dilutores de 0.050 ml.
 - c. Placas con pozas en U.
8. Pipetas Pasteur.
9. Tubos de celulosa para diálisis (M.W. CUTOFF 12,000 a 14,000; DRY CYLIND. DIA.: 15.9 mm; DRY THICKNESS: 0.0008").

B. REACTIVOS.

1. Citrato de sodio al 3.8% ($\text{NaO}_2\text{CCH}_2\text{C}(\text{CO}_2\text{Na})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$ 3.8%).
2. Buffer salino de fosfatos (PBS).
3. Acido tánico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$).
4. Antígeno de cisticerco.
5. Suero normal de conejo inactivado a 56°C durante 30 min.
6. Suero control negativo.
7. Suero control positivo de título conocido.
8. Eritrocitos de carnero.
9. Solución salina fisiológica 0.14 M (NaCl 0.14 M).
10. Solución acuosa de formaldehído al 40% (HCHO 40%).
11. Agua desionizada.

II. PREPARACION DE REACTIVOS.

- A. SOLUCION ELSEVER'S (1).

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$) - - - - - 2.05 gr
 Citrate de sodio 0.80 gr
 Cloruro de sodio (NaCl) - - - - - 0.42 gr
 H₂O desahionizada - - - - - 100 ml
 pH - - - - - 6.1 (se
 ajusta pH con ácido cítrico al 10%).

-Autoclavar a 10 Psi/ min.

-Almacenar a 4°C la mezcla de sangre y Alsever's, no usarse hasta tres días después de la colección.

B. BUFFER SALINO DE FOSFATOS (PBS) (2).

1. Solución Steck.

a. Fosfato disódico monohidratado (0.15 M Na_2HPO_4).

Na_2HPO_4 - - - - - 21.3 gr
 H₂O desahionizada - - - - - 1,000.0 ml
 -Disolver la substancia en matrás volu-
 métrica con poca agua y aforar hasta
 1,000.0 ml de solución.

b. Fosfato de potasio dihidrogenado (0.15 M KH_2PO_4).

KH_2PO_4 - - - - - 20.4 gr
 H₂O desahionizada - - - - - 1,000.0 ml
 -Disolver la substancia en frasco volu-
 métrica con poca agua y aforar hasta
 1,000.0 ml de solución.

c. Cloruro de sodio (0.15 M NaCl).

NaCl - - - - - 8.80 gr
 H₂O desahionizada - - - - - 1,000.0 ml
 -Disolver la substancia en matrás volu-
 métrica y aforar hasta 1,000.0 ml de
 solución.

2. Buffer de Fosfatos Salino (PBS) pH 6.4.

Na_2HPO_4	0.15 N	- - - - -	32.3 ml
KH_2PO_4	0.15 N	- - - - -	67.7 ml
NaCl	0.15 N	- - - - -	100.0 ml

-Mezclar completamente.

3. Buffer de Fosfatos Salino (PBS) pH 7.2.

KH_2PO_4	0.15 N	- - - - -	24.0 ml
Na_2HPO_4	0.15 N	- - - - -	76.0 ml
NaCl	0.15 N	- - - - -	100.0 ml

-Mezclar completamente.

C. DILUCION DE ACIDO TANICO.

1. Solución stock 1:1,000.

Acido tánico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$)	- - - -	10.0 gr
Buffer salino de fosfatos pH 7.2		10.0 ml

-Disolver completamente.

2. Solución de ácido tánico 1:40,000.

La solución stock 1:1,000 diluirla 1:40 para obtener la dilución 1:40,000 usada en la prueba.

D. ANTIGENO. Para la realización de éste trabajo se utilizó antígeno somático completo de cisticerco.

MUESTRAS DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO. Realizemos la determinación de anticuerpos contra antígeno de cisticerco en L.C.R. concentrado en dos grupos de pacientes con diversos problemas neurológicos no sospechosos de cisticercosis cerebral y en pacientes con diagnóstico presuntivo de cisticercosis cerebral.

Se estudiaron 50 pacientes de consulta externa y hospitalizados en el departamento de Neurología del Hospital Dr. Angel Leño y del Hospital General, los que se clasificaron en 2 grupos con el siguiente criterio:

GRUPO I: Se formó por 25 pacientes, con edades que varían entre recién nacidos y 77 años, con diversos problemas neurológicos (CUADRO I) no relacionados con cisticercosis del S.N.C.

GRUPO II: Se constituyó por 25 pacientes con edades que varían de 11 meses a 80 años de edad con diagnóstico presuntivo de cisticercosis cerebral (CUADRO II).

a) Concentración del líquido cefalorraquídeo.- Se obtuvo L.C.R. por punción lumbar en cada uno de los pacientes por medio de personal especializado en ambas instituciones.

Las muestras de 2 a 5 ml de L.C.R. se concentraron en sacarosa utilizando tubos de celulosa para diálisis hasta obtener una décima parte de su volumen original. Inmediatamente después se procedió al estudio de las muestras por medio de la técnica de microhemaglutinación pasiva, descrita posteriormente.

III. TANIZADO DE GLOBULOS ROJOS (2).

1. Los glóbulos rojos suspendidos en solución Alsever's lavarlos 3 veces con buffer salino pH 7.2, centrifugando a 2,000 rpm durante 5 min cada vez.

2. Medir el paquete y ajustar a una suspensión de 2.5% agregando 4.0 ml de buffer PBS pH 7.2 por cada 0.1 ml de paquete de glóbulos rojos.
3. Agregar un volúmen igual de ácido tánico 1:40,000.
4. Incubar la mezcla en baño María a 37°C durante 15 min.
5. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante, resuspender con PBS pH 7.2 y volver a centrifugar 5 min.
6. Decantar y medir el paquete de glóbulos rojos. Ajustar a una suspensión de 2.5 con buffer salino de fosfatos pH 6.4. Se guarda en refrigeración.

IV. SENSIBILIZACION DE GLOBULOS ROJOS CON ANTIGENO.

1. Los glóbulos rojos tanados se sensibilizan agregando un volúmen igual de dilución óptima de antígeno en PBS pH 6.4 por ejemplo: Agregar 2 ml de la dilución de antígeno a 2 ml de la suspensión de células 2.5%.
2. Incubar la mezcla en baño María y centrifugar después durante 5 min a 2,000 rpm, (Baño María a 37°C/15 min).
3. Decantar el sobrenadante y lavar las células otras dos veces por centrifugación a 2,000 rpm por 5 min con suero normal de conejo al 1% diluido en PBS pH 7.2; volver a lavar centrifugando 10 min para obtener un paquete de glóbulos rojos.
4. Ajustar el paquete de células a una suspensión de 1.5% en suero normal de conejo diluido en PBS pH 7.2 ej.: Cada 0.1 ml de paquete de células se multiplica por un factor que es 66 y se tendrá que agregar 6.6 de suero normal de conejo al 1% obteniéndose una suspensión de células al 1.5% que son las _____

que se utilizan en la prueba.

6. Tomar una alícuota de glóbulos rojos tani_ zados en solución 1:40,000 sin sensibilizar. Estos eritrocitos se utilizan como control de células en el ensayo y para adsorber el antisuero de prueba.
7. A la suspensión de glóbulos rojos sensibili_ zados con antígeno y a la suspensión de eri_ trocitos tanzados sin sensibilizar, adicio_ nar formalina al 40% en una proporción de 1:10 mientras se agitan. La formalina pue_ de adicionarse gota a gota durante 20-30 minutos (1).
8. Dejar toda la noche a 4°C y adicionar nue_ vamente la misma cantidad de formalina que la vez primera a ambas suspensiones.
9. Dejar las células en reposo 24 Hrs y decan_ tar el sobrenadante.
10. Adicionar un volúmen grande de buffer salino de fosfato pH 7.2 y resuspender las células por agitación vigorosa.
11. Dejar que las células se asienten 24 Hrs y re_ petir el lavado con PBS pH 7.2.
12. Ajustar ambas suspensiones de células al 1.5% v/v y adicionar 0.2% de formalina de concen_ tración final como preservativo.

-Las células pueden almacenarse a 4°C por más de 2 años.

V. DETERMINACION DE CONCENTRACION OPTIMA DE ANTIGENO.

1. Preparar 4 diluciones de antígeno en buffer pH 6.4, ejemplo: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160.

2. Sensibilizar glóbulos rojos con cada dilución de antígeno siguiendo los pasos 1 al 5 del inciso IV.
3. Checar con suero positivo y otro negativo cada una de las diluciones. La más baja dilución de antígeno que de el título más elevado con el suero inmune y no reaccione con el suero negativo se considerará el óptimo.

VI. DESARROLLO DE LA PRUEBA.

1. Concentrar los líquidos cefalorraquídeos en sacarosa.
2. A todas las excavaciones con fondo en "U" de la placa de microtitulación agregar con una micropipeta 0.050 ml de suero normal de conejo al 1% diluido en buffer salino pH 7.2.
3. Cargar un microtitulador de 0.050 ml con líquido cefalorraquídeo problema y colocarlo en la primera poza, mezclar completamente y transferir 0.050 ml a la poza siguiente repitiendo esta proceso hasta la última poza de la hilera de donde se descartan 0.050 ml.
4. A cada dilución del líquido cefalorraquídeo agregar con una micropipeta 0.025 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 1.5%.
5. Con un microagitador, agitar todas las pozas.
6. Dejar reposar la placa a temperatura ambiente y en cámara húmeda durante 2 a 3 horas; hacer la lectura.

VII. CONTROLES REQUERIDOS.

- A. Control del Diluyente.

1. Depositar 0.05 ml de suero normal de conejo al 1% en una hilera de pozas y agregar 0.025 ml de la suspensión de células sensibilizadas al 1.5%. Esta reacción deberá ser negativa.

B. Control del L.C.R.

1. Preparar una suspensión al 1.5% de glóbulos rojos tanizados pero no sensibilizados con suero normal de conejo al 1.5% en buffer salino pH 7.2.
2. Preparar una placa (por duplicado) con diluciones seriadas del L.C.R. problema en por lo menos 6 pozas para cada líquido cefalorraquídeo.
3. A cada poza agregar 0.025 ml de células no sensibilizadas. Deberá obtenerse una reacción negativa con cada L.C.R. Si el L.C.R. es positivo, deberá ser adsorbido con glóbulos rojos y volverlo a probar.

HEMAGLUTINACION
TITULACION DEL ANTIGENO

DILUCION DEL
ANTIGENO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 C

1:20

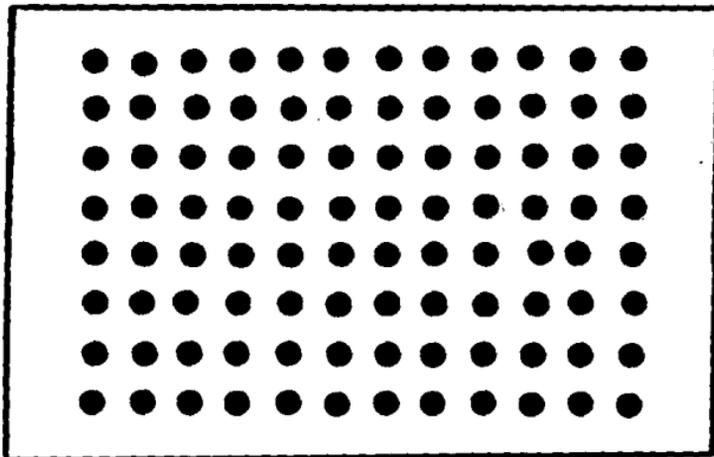
1:40

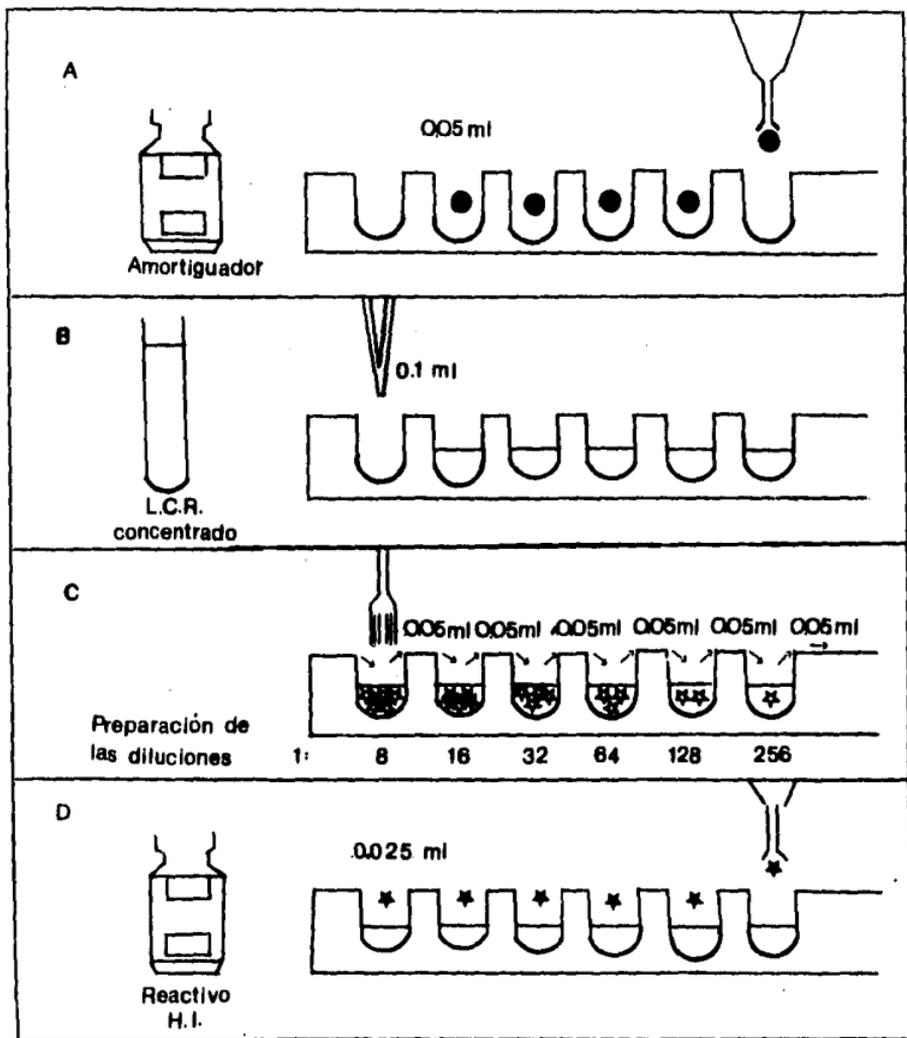
1:80

1:160

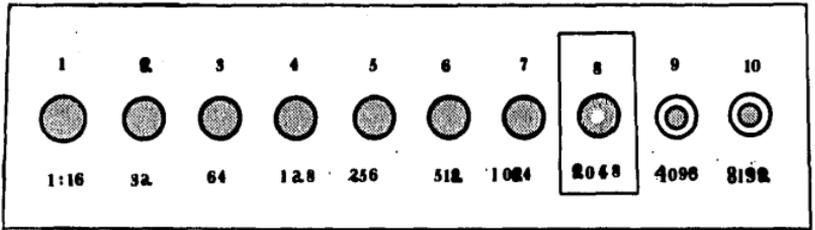
1:320

1:640





HEMAGLUTINACION INDIRECTA POR MICROTECNICA



INTERPRETACION DE LA HEMAGLUTINACION INDIRECTA

GRUPO I

PACIENTES SIN CISTICERCOSIS DE 6 DIAS A 77 AÑOS DE
EDAD

PACIENTE No.	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO FINAL
1	39 años	M	ATROFIA CEREBRAL
2	9 días	M	ATROFIA CEREBRAL
3	77 años	F	AVC TROMBOTICO
4	9 días	F	ATROFIA CEREBRAL
5	20 años	M	MALFORMACION A-V CEREBELOSA
6	47 años	F	AVC TROMBOTICO
7	29 días	F	ARNOLD CHIARI
8	41 años	M	HEMATOMA SUBDURAL
9	8 años	F	ATROFIA CEREBRAL
10	53 años	M	POLIRADICULONCURITIS
11	63 años	F	FISTULA CAROTIDOCavernosa
12	19 años	M	ENCEFALITIS VIRAL
13	6 días	F	APENDICITIS
14	1 mes	F	ATROFIA CEREBRAL
15	63 años	M	AVC TROMBOTICO
16	5 meses	M	ENCEFALODISPLASIA
17	23 años	F	GRANULOMA PÍMICO
18	10 días	F	ATROFIA CEREBRAL
19	4 meses	M	EPILEPSIA IDIOPATICA
20	13 años	M	GLIOMA PONTIS
21	44 años	M	HIDROCEFALIA
22	24 años	M	EPILEPSIA IDIOPATICA
23	9 años	M	DEGENERACION DEL S.N.C.
24	66 años	F	FISTULA NASAL DE L.C.R.
25	7 meses	M	ATROFIA CEREBRAL

GRUPO II

PACIENTES CON DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE CISTICERCO-
SIS CEREBRAL DE 11 MESES A 80 AÑOS DE EDAD

PACIENTE No.	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO FINAL
1	56 años	H	CISTICERCOSIS CEREBRAL
2	25 años	H	CISTICERCOSIS CEREBRAL
3	32 años	H	POLIPOACUSIA NEUROSENSORIAL
4	32 años	H	MEMINGITIS BACTERIANA
5	61 años	F	RUPTURA DE ANEURISMA
6	38 años	F	EDEMA SUBCORTICAL Y *C.C.
7	38 años	H	MEMINGITIS BACTERIANA
8	43 años	H	MEMINGITIS BACTERIANA
9	24 años	F	CEFALEA
10	62 años	H	CISTICERCOSIS CEREBRAL
11	70 años	F	DIPLOPIA
12	11 meses	H	RETRASO PSICOMOTOR
13	23 años	H	CRISIS GENERALIZADA
14	3 años	F	SINDROME DE GUILLAIN-BARRE
15	80 años	H	DEMENCIA SENIL Y *C.C.
16	24 años	F	SINDROME CEREBELOSO
17	16 años	H	CISTICERCOSIS CEREBRAL
18	60 años	F	SIRINGOMIELIA
19	36 años	F	SINDROME DE GUILLAIN-BARRE
20	72 años	F	SIND. DEMENCIAL Y GONARTROSIS
21	21 años	H	CRISIS CONVULSIVA
22	19 años	H	CISTICERCOSIS CEREBRAL
23	47 años	H	MEMINGITIS BACTERIANA
24	22 años	F	CISTICERCOSIS CEREBRAL
25	25 años	H	CEFALEA POSTCRITICA

*C.C.- Cisticercosis cerebral

CUADRO III

TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENO DE CISTICERCO
 POR MICROHEMAGLUTINACION INDIRECTA EN L.C.R. CONSER-
 TRADO

PACIENTE No.	GRUPO DE PACIENTES	
	I	II
1	-	-
2	-	1:128
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	1:2
7	-	1:2
8	-	-
9	-	-
10	-	1:2
11	-	1:2
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	1:2
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	1:16
25	-	-

Positivo(+)= 1:2

Negativo (-)= No detectado

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. Para evaluar la confiabilidad de la técnica de Microhemaglutinación Pasiva para el diagnóstico de cisticercosis del sistema nervioso central; sensibilidad, especificidad y valores predecibles positivos, se calcularon con los resultados obtenidos de las 25 muestras de L.C.R. concentrado del grupo de pacientes clasificados con diagnóstico presuntivo de cisticercosis cerebral (Grupo II). Los pacientes clasificados sin cisticercosis cerebral (Grupo I) se utilizaron únicamente como control.

Para el propósito de éstos cálculos, la prevalencia de cisticercosis cerebral en pacientes Mexicanos se ha calculado que es de 0.8 a 4% (8, 9, 10, 11, 12), de manera que utilizando un valor promedio se ha obtenido un porcentaje de 2.4% de prevalencia.

Sensibilidad, especificidad y valores predecibles positivos se calcularon de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de Sensibilidad} = \frac{(\text{Valores Verdaderos Positivos})}{(\text{Val. Verdaderos (+)}) + (\text{Falsos -})} \times 100$$

$$\% \text{ de Sensibilidad} = \frac{5}{5 + 3} \times 100$$

$$\% \text{ de Sensibilidad} = 62.50\%$$

$$\% \text{ de Especificidad} = \frac{(\text{Valores Verdaderos Negativos})}{(\text{Val. Verdaderos (-)}) + (\text{Falsos +})} \times 100$$

$$\% \text{ de Especificidad} = \frac{15}{15 + 2} \times 100$$

$$\% \text{ de Especificidad} = 88.23\%$$

Valores Positivos Predecibles = (Sensibilidad x Prevalencia) / (Sensibilidad x Prevalencia) + (1- Especificidad) (1- Prevalencia) x 100.

$$\text{Valores (+) Predecibles} = \frac{(62.50)(2.40)}{(62.50)(2.40) + (1-88.23)(1-2.4)} \times 100$$

$$\text{Valores (+) Predecibles} = 55.10\%$$

RESULTADOS

La prueba de Microhemaglutinación Pasiva tiene una especificidad de 88.23% y una sensibilidad de 62.50% de acuerdo con nuestros resultados, sin embargo, los datos de 2 pacientes con reacción positiva a cisticercosis y que dieron un título de 1:2 se tomaron como valores falsos positivos para los cálculos estadísticos debido a que no se comprobó por medio de exámenes de gabinete, biopsia, cirugía o autopsia, la existencia de cisticercosis cerebral como se hizo con el resto de la población. De manera que existe la probabilidad de que sean títulos verdaderos de cisticercosis y, de ser así, la sensibilidad de ésta técnica equivaldría a 70%.

Algunos investigadores han reportado resultados falsos positivos y falsos negativos que oscilan entre 20 a 40% (35); sin embargo nosotros obtuvimos valores falsos negativos ligeramente menores. De 25 muestras, 7 fueron positivas y 18 negativas. Los porcentajes de falsos positivos y falsos negativos son los siguientes:

1. Falsos positivos = 28.57%.
2. Falsos negativos = 16.66%.

Estas diferencias se podrían atribuir al tipo de antígeno de cisticerco que se utilizó, a las diferencias en la técnica empleada, al tamaño de la población en estudio o al grado de concentración de las muestras de líquido cefalorraquídeo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La presentación clínica de cisticercosis cere

bral es muy variable y el diagnóstico de neurocisticercosis ocasionalmente es difícil. En áreas endémicas se sospecha principalmente de ésta enfermedad, en pacientes con hallazgos sugerentes de tumor cerebral.

Se ha expresado la preocupación de algunos investigadores de reacciones cruzadas de cisticercosis con otras infecciones parasitarias como equinococosis cerebral e hidatidosis. Afortunadamente son enfermedades poco frecuentes en nuestro medio; más sin embargo, en localidades donde se sospecha de alguna de éstas enfermedades, el diagnóstico inmunológico de cisticercosis deberá hacerse con cautela. El uso de ANTIGENO SOMÁTICO COMPLETO de cisticercos se ha reportado que es útil, debido a que disminuyen las reacciones cruzadas en el diagnóstico serológico en pacientes con equinococosis (36).

Basándonos en los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que la técnica de Microhemaglutinación Pasiva continúa siendo una herramienta importante para el diagnóstico de neurocisticercosis, principalmente por la superioridad ante otras técnicas de laboratorio como Inmunolectroforesis y Fijación de Complemento, no sólo por tener mayor sensibilidad y especificidad, sino por ser una prueba sencilla de elaborar y debido a su bajo costo. Así mismo, deberá darse prioridad a ésta técnica en regiones donde no se pueda disponer de métodos más sensibles ya que por lo general son más costosos y en ocasiones suelen presentarse inconvenientes en la obtención de equipo y reactivos de importación.

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

1. Hudson, L. y Hay, F. C.: Practical Immunology. 2nd. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1980.
2. Boyden, S. U. 1951. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med. 93:107-120.
3. Williams, J. F.: Recent advances in the immunology of cestode infections. J. Parasitol. 65:3-1979.
4. Martínez, C.; Ruiz; Mateos; López, R.: Utilidad de la técnica de hemaglutinación con L.C.H. concentrado para el diagnóstico de cisticercosis cerebral. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 11:347, 1980.
5. Rose, R. M.; Friedman, H.: Manual of clinical immunology. 1th. Ed. A. S. M. Washington, D. C.
6. González, B.; Sandoval, I.; Trujillo, V.: Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 9:51, 1978.
7. Mohammad; Douglas, C.; Heiner; Miller; Goldberg; Kagan; Enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. J. of Clin. Microb. 20:4, 1984, p. 775-779.
8. Lombardo, L.; Mateos, J. H.: Cerebral cysticercosis in México. Neurology. 11:824, 1961.

9. Briceño, C. E.; Biagi, F.; Martínez, B.: Cisticercosis. Observaciones sobre 97 casos de autopsia. Prensa Méd. Méx. 26:193, 1961.
10. Rabiela, M. F.; Lombardo, R. L.; Flores, B. F.: Cisticercosis cerebral. Estudio de 68 casos de autopsia. Patología 10:27, 1972.
11. Martínez, R. M.; Beltrán, F.; Martínez, R. G.; Olive, Ch. L.: Conceptos actuales sobre la cisticercosis cerebral. Rev. Inst. Neurol. Méx. 1:44, 1969.
12. Mazzotti, L.: Datos sobre la cisticercosis en México. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 5:283, 1944.
13. Cartus Celli, A.: La cisticercosis. Bol. Méd. IMSS 17:149, 1975.
14. Albores, S. J.; Altamirano, D. M.: Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. Gac. Méd. Méx. 102:193, 1971.
15. Musoke, A. J. y col.: The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. IV. Immunology 29:846, 1975.
16. Leid, R. W.; Williams, J. P.: The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. I. Immunology 27:195; 1974.
17. Nieto, D.: Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by mean of the spinal fluid complement fixation test. Neurology 6:725, 1956.
18. Biagi, F.; Navarrete, F.; Piña, A. y Col.: Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. Rev. Méd. Hosp. Gral. 25:501, 1961.

19. Musoke, A. J.; Williams, S. F.: Immunoglobulins associated with passive-transfer of resistance to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology* 28:97, 1975.
20. Flisser, A.; Tarrab, M.; Williams, K.; Larralde, C.: Inmunolectroforesis y sobre inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. 6:1, 1975.
21. Ciba Foundation Symposium 25: Parasites en the immunized host. *Assoc. Scient. Publ.* 1974.
22. Ogilvie, V. M.; Willson, R. J. M.: Evasión of the immunoresponse by parasites. *Br. Med. Bull.* 32:177, 1972.
23. Varela Díaz, V. M.; Golfer, E. A. y col.: Immunological response of the mammalian host against tapeworm infections. XII. *Exp. Parasitol.* 32: 96, 1972.
24. Urquhart, F. M.: Immunological unresponsiveness in parasitic infections. *J. Parasitol.* 56:547, 1970.
25. Bhengell, S.K.; Gemmel, M. A.; Macnamara, F. N.: Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. VII. *Exp. Parasitol.* 24:291, 1969.
26. Tay; Lara; Velasco; Gutiérrez. *Parasitología Médica*. Edit. Francisco Méndez Cervantes, p. 216-226.
27. Lawrence J. Blecka: Intestinal Immunoglobulin Production in Parasitized Patients. *J. Parasitol.*, 64(2), 1978, pp. 362-363.

28. Hustead, S. T.; Williams, F. J.: Permeability studies on taeniid metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *T. cassiceps*, and *Echinococcus granulosus*. *J. of Parasitol.* 63:2, 1977, p. 314-321.
29. Verheyen, A.; Vanparijs, O.; Borgers, M.; Thepent, D.: Scanning electron microscopic observations of *Cysticercus fasciolaris* after treatment of mice with mebendazole. *J. Parasitol.*, 64(3), 1978, pp. 411-425.
30. Carol M. Belton: Freeze-Fracture study of the tegument of larval taenia crassiceps. *J. Parasitol.*, 63:2, 1977, p. 306-313.
31. Vege-Brown: Fine structure of a racemose cysticercus from human brain. *J. Parasitol.*, 65(2), 1979, pp. 262-266.
32. Hammerberg; Dangler; Williams: Taenia taeniaeformis: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. *J. Parasitol.*, 66(4), 1980, pp. 569-576.
33. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
34. Flisser, A., Woodhouse, E. and Larralde, C.: Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39:27, 1980.

35. Mahajan, R. C.; Chopva, J. S.; Chitkara, N. L.:
Comparative evaluation of indirect hemagglutination and complement fixation.
36. Arambulo, P. V. III; Walls, S.; Kagan, I. G.:
Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate E.L.I.S.A. Acta Trop. 35:63-67,1978.