



121
2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DESARROLLO Y EVALUACION DE LA PRUEBA DE
TIA-ELISA PARA EL ESTUDIO SEROLOGICO
DE LA CISTICERCOSIS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
RAFAEL MONDRAGON GONZALEZ



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES	
CICLO DE VIDA.....	5
MECANISMOS DE INFRCCION.....	7
MORFOLOGIA DEL CISTICERCO DE <i>Taenia solium</i>	8
RELACION HUESPED-PARASITO.....	10
ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS.....	12
MANIFESTACIONES CLINICAS.....	15
DIAGNOSTICO.....	17
OBJETIVOS.....	34
HIPOTESIS.....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
MATERIAL Y METODOS	
I. ANTIGENOS	
a) PROCEDENCIA.....	37
b) OBTENCION DEL FLUIDO VESICULAR.....	38
c) DETERMINACION DE PROTEINAS.....	40
d) DETERMINACION DE HEXOSAS.....	41

II. SUEROS

a) ORIGEN DE LOS SUEROS.....	43
b) INMUNIZACION ARTIFICIAL DE RATONES.....	44
c) OBTENCION DE LOS SUEROS	
- DE LA INFECCION NATURAL.....	45
- DE LA INMUNIZACION ARTIFICIAL.....	46
- CONEJO Y CABRA.....	48

III. CONJUGADOS

a) OBTENCION DE LA FRACCION GAMAGLOBULINA.....	48
b) CONJUGACION CON PEROXIDASA.....	50

IV. INMUNOENSAYO CON ANTICUERPOS LIGADOS A ENZIMAS (ELISA)

a) METODO INDIRECTO.....	52
b) METODO DIRECTO.....	54
c) DETERMINACION DE LOS COCIENTES DE DENSIDAD OPTICA.....	55
d) DETERMINACION DEL CRITERIO DE POSITIVIDAD EN ELISA.....	55
e) CODIFICACION DE TITULOS.....	55

V. INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA-ELISA (TIA-ELISA)

a) ESQUELETO TECNICO DEL PROCEDIMIENTO.....	58
b) ESTANDARIZACION DEL ENSAYO.....	57
c) REGISTRO DE RESULTADOS.....	60

VI. EVALUACION SEROLOGICA

a) SENSIBILIDAD.....	61
----------------------	----

b) ESPECIFICIDAD.....	62
c) VALOR PREDICTIVO.....	62
d) EFICIENCIA.....	63
e) REACTIVIDAD CRUZADA.....	63
VII. ANALISIS ESTADISTICO.....	64
RESULTADOS	
1) RESULTADOS PRELIMINARES.....	65
2) ESTANDARIZACION DEL ENSAYO.....	66
3) FACTIBILIDAD DE TIA-ELISA CON ANTIGENOS SIMPLES O PURIFICADOS.....	73
4) FACTIBILIDAD DE TIA-ELISA EN LA CISTICERCOSIS.....	77
DISCUSION.....	87
CONCLUSION.....	105
REFERENCIAS.....	106

INTRODUCCION

En nuestro país, la cisticercosis es una parasitosis cuya frecuencia ha variado desde el 1 % en estudios seroepidemiológicos, hasta más del 10 % en pacientes con problemas neurológicos hospitalizados (Flisser et al., 1980). Por presentar un amplio espectro en su sintomatología, el diagnóstico clínico es difícil y más difícil aún la confirmación parasitológica. Aunque la Tomografía Axial Computarizada es considerada como el procedimiento de elección para detectar al parásito, tiene el inconveniente de que sólo se realiza en instituciones hospitalarias o muy especializadas, por lo que la detección indirecta del parásito o sus productos por medio de la serología, ha resultado una buena alternativa para confirmar el diagnóstico. A pesar de lo anterior, la mayoría de las técnicas serológicas han presentado problemas de sensibilidad, especificidad ó de confiabilidad en los resultados, debido a la inestabilidad de los antígenos, al número elevado de falsos positivos y negativos, a deficiencias en la evaluación diagnóstica, dificultades para la adquisición de materiales o equipos, etc.

A pesar de que el inmunoensayo con anticuerpos ligados a enzimas (ELISA) ha demostrado ser específico, sensible y relativamente sencillo de realizar, tiene como principal inconveniente, el requerir de materiales plásticos y eventualmente de equipo especializado, los cuales son costosos o difíciles de conseguir.

Recientemente, se publicó un trabajo que describe la aplicación de una técnica llamada Difusión en gel-ELISA (DIG-ELISA) para el diagnóstico serológico de la cisticercosis. Esta técnica, que tiene sus antecedentes directos en el Inmunoensayo en Capa Delgada (TIA) y su variante DIG-TIA (Elwing et al., 1976, 1977) y en la prueba de ELISA (Engvall y Perlman, 1972), demostró ser al menos comparable con la Hemaglutinación Indirecta, en la detección de anticuerpos contra el Fluido Vesicular del metacéstodo de *Taenia solium* (Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992). Además de que para su realización no se requiere de material o equipo sofisticado, este método permite cuantificar de manera simple, la concentración de anticuerpos presentes en el suero analizado. Esto, aunado al hecho de que la reacción enzima-substrato se realiza en forma localizada en un medio semisólido y de que el método no requiere de un adiestramiento especializado para su realización, es lo que la hace particularmente útil para estudios serodiagnósticos, seroepidemiológicos y para implementarse en laboratorios modestos.

No obstante lo anterior, la obtención de un resultado rápido se ve obstaculizada por la necesidad de incubar los sueros durante 24 horas para permitir la difusión de los anticuerpos en el seno de la capa de agar.

Por lo anterior, en este trabajo se presentan los resultados del desarrollo, estandarización y aplicación de una nueva técnica, a la que se llamó Inmunoensayo en Capa Delgada-ELISA (TIA-ELISA), para la detección de anticuerpos en el

siero de individuos infectados con el cisticerco de *T. saginatum*. Esta nueva técnica resultó de la modificación de algunas variables de la prueba de DIG-ELISA, especialmente en lo referente a la omisión de la difusión de los anticuerpos en un gel de agar, de manera que los resultados fueran más rápidos, el procedimiento más sencillo y se mantuvieran las cualidades de sensibilidad y especificidad de DIG-ELISA.

La prueba de TIA-ELISA fue evaluada serológicamente en su capacidad diagnóstica para la cisticercosis humana, usando el fluido vesicular de cisticercos de cerdo como antígeno y sueros de pacientes cisticercosos confirmados, de individuos aparentemente sanos y de sujetos infectados con otros agentes micóticos y parasitarios. Los resultados se compararon con los obtenidos en la prueba de ELISA, la que hasta el momento, es uno de los procedimientos de elección para el diagnóstico serológico de la cisticercosis.

Por otro lado, TIA-ELISA también se ensayó con otros sistemas antígeno-anticuerpo en los que se emplearon extractos antigénicos de hongos, protozoarios y de otros helmintos, todos con sus respectivos antisueros homólogos obtenidos tanto de la infección natural como de la inmunización experimental en animales.

Los resultados mostraron que TIA-ELISA tiene mayor sensibilidad que ELISA, pero menor especificidad; ambas pruebas tuvieron igual eficiencia en la detección de anticuerpos, así como nula reactividad cruzada y escasa diferencia en el

valor predictivo para un resultado positivo. Por último, esta prueba funcionó con todos los sistemas antígeno-anticuerpo ensayados, excepto con el de *Trypanosoma cruzi*, no obstante que los sueros analizados fueron seropositivos en ELISA.

Nuestros resultados sugieren que para el serodiagnóstico de la cisticercosis humana o para la detección de anticuerpos en otras enfermedades micóticas o parasitarias, TIA-ELISA puede aplicarse con igual confiabilidad que ELISA, con las ventajas de no requerir de material ni de equipo caro y sofisticado que limite su aplicación en cualquier laboratorio clínico, ni de procedimientos tediosos y complicados para la interpretación de los resultados.

ANTECEDENTES.

El metacéstodo de *T. solium*, también conocido como *Cysticercus cellulosae* o simplemente cisticerco, se aloja principalmente en los tejidos musculares del cerdo, que es el hospedero intermediario por excelencia, aunque de manera accidental, el hombre también puede albergar este parásito en sus tejidos. Cuando el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central o en el globo ocular, esta parasitosis adquiere especial relevancia, debido a que la enfermedad puede ser invalidante e incluso, llegar a causar la muerte del individuo infectado (Woodhouse et al., 1982).

CICLO DE VIDA

Debido a que *T. solium* es la forma adulta de *Cysticercus cellulosae*, el "ciclo de vida del cisticerco" no es más que una parte del ciclo de vida de *T. solium*; además, ambas formas causan parasitosis diferentes, por lo que para hablar de la cisticercosis, se tiene que hacer mención de la teniasis. Debido a que esta última enfermedad es producida por dos tenias diferentes: *Taenia solium* y *Taeniarynchus saginatus*, y desde el punto de vista epidemiológico de la cisticercosis, ambas infecciones se definen como teniasis *solium* y teniasis *saginata*.

El ciclo se inicia cuando los huevos de *Taenia solium* son expulsados del hospedero junto con las heces; estos huevos salen ya sea encerrados dentro de los proglótidos gravidos ó bien libres y mezclados en las heces. Desde el momento que salen, los huevos son infectantes. Para continuar el ciclo de vida, los huevos tienen que ser ingeridos por un hospedero intermediario, generalmente el cerdo. Cuando esto sucede, las enzimas del aparato digestivo (pepsina y tripsina) y las sales biliares del hospedero, actúan sobre la cubierta del huevo, hidrolizando la proteína cementante, separando los bloques embrionofóricos y activando asimismo al embrión, el que en un lapso de 24 a 72 horas y con ayuda de sus ganchos y de las enzimas que posee, se adhiere a la mucosa intestinal y la rompe, llegando al torrente sanguíneo o linfático, para de ahí distribuirse y localizarse finalmente en diversos sitios del organismo. En esos sitios, madura y aumenta de tamaño hasta formar en un lapso de 60 a 70 días un cisticerco, el que forma una cubierta vesicular y origina una pared quística que será la interfase entre el tejido del hospedero y el parásito. En el interior de la cubierta vesicular, se encuentra un líquido (fluido vesicular), que baña la porción cefálica del parásito (escólex). Cuando el hospedero definitivo que es el hombre, ingiere carne de cerdo parasitada, ya sea cruda o insuficientemente cocida, las enzimas y las sales biliares del aparato digestivo, activan al cisticerco, el cuál evagina su escólex y se adhiere a la mucosa del intestino delgado y por un fenómeno llamado proglotización, origi-

na una cadena llamada estróbilo, el que al cabo de 2 a 3 meses, forma una tenia adulta la cual en su porción distal, contiene proglótidos grávidos que contienen miles de huevos, los que serán posteriormente eliminados con las heces, para iniciar nuevamente el ciclo de vida de este parásito (Asada et al., 1956; Lumsden et al., 1982; Botero y Restrepo, 1987).

MECANISMOS DE INFECCION DE LA CISTICERCOSIS

Como se describió antes, el hombre padece de cisticercosis cuando ingiere los huevos de *T. solium*. Esto puede ocurrir de varias maneras:

Por Heteroinfección: Cuando el individuo ingiere huevos de *T. solium* producidos por otro hombre y que contaminan sus alimentos o el agua potable, ó bien, cuando estos son contaminados directamente al ser manipulados por individuos con teniasis sin aseo previo de las manos (Botero y Restrepo, 1987).

Por Autoinfeccion externa: Es un mecanismo de infección por via ano-mano-boca y ocurre en individuos parasitados por *T. solium*. Aunque este mecanismo parece ser el más lógico y fácil para adquirir la cisticercosis, en realidad debe ocurrir muy raramente, ya que la teniasis es prácticamente inexistente entre los pacientes con neurocisticercosis y viceversa (Biagi, 1972; Botero y Castaño, 1982; Aluja et al., 1987).

Por **Autoinfección interna**: Se dice que este mecanismo ocurre en pacientes teniásicos, mediante la regurgitación de proglótidos grávidos hacia la cavidad gástrica, favoreciendo la activación de los huevos. Este mecanismo es casi improbable, pues los proglótidos grávidos se encuentran en la parte distal del gusano, muy cercanos al final del intestino delgado (íleon) y debe suponer que estos tienen que recorrer en sentido inverso todo el intestino hasta llegar al estómago. Además, la escasa probabilidad de que esto ocurra, se vé reforzada por la baja proporción que existe de pacientes con teniasis y con cisticercosis.

Recientemente, se ha propuesto otro mecanismo de infección que involucra la ingestión de carne de cerdo cruda o mal cocida, que contiene formas post-oncosferales viables. Estas estructuras son denominadas así porque tienen el tamaño y la forma de las oncosferas, pero sin ganchos. Debido a que las formas post-oncosferales pueden multiplicarse por gemación, puede hacerse innecesario el paso a la etapa adulta para incrementar el número de individuos. Además de las implicaciones biológicas que esto pudiera tener, también podría explicar las intrigantes diferencias observadas entre las frecuencias de teniasis y cisticercosis (Salazar-Schettino et al., 1988¹, 1992). Sin embargo, es conveniente señalar que

1. Salazar-Schettino, P.M., De Haro, I. y Hernández, R. (1988). Mecanismos de infección de la cisticercosis. Páginas. 5-9. En: Acevedo-Hernández, A. (Ed.). Memorias del II Encuentro de Cisticercosis. Pachuca, Hidalgo. México.

este mecanismo solo se ha demostrado en forma experimental en cerdos y bajo condiciones inducidas de inmunosupresión.

MORFOLOGIA DEL CISTICERCO DE *Taenia solium*

Macroscópicamente, los cisticercos pueden adquirir dos formas: el celuloso y el racemoso.

El primero, también llamado vesicular, es el más frecuente y se presenta en forma de vesículas redondas u ovoidales, de 0.5 a 1 cm en su eje mayor y son de color blanco translúcido. En su interior, se observa una estructura globular que contiene el escólex invaginado e invertido, con sus cuatro ventosas y un rosetelo con dos coronas de ganchos cuyo número va de 22 a 32; se encuentra unido a la pared vesicular por un canal espiral y está bañado por el fluido vesicular. Microscópicamente, la pared vesicular está constituida por tres capas, una externa, acidófila y de forma festoneada, una intermedia formada por tejido conjuntivo y una interna constituida por un retículo de fibrillas. Al microscopio electrónico, la superficie se observa cubierta por unas estructuras delgadas, filiformes, denominadas microtricas que favorecen el intercambio metabólico y la relación inmunológica entre el hospedero y el parásito a través de la pared quística (Ramírez et al., 1982; Cañedo et al., 1982).

El otro tipo de cisticerco llamado racemoso, mide de 5 a 90 mm de diámetro aproximadamente y se considera que puede

ser una larva degenerada de *T. solium* ó una larva de *tenias* aún no identificadas, que parasitan animales. Macroscópicamente, presenta una forma irregular, con múltiples sacos que le confieren la forma de racimo, con una membrana de apariencia más delgada que la forma vesicular y no tiene escólex en su interior ni canal espiral (Rabiela y Flisser, 1990). Este tipo de cisticerco sólo se ha encontrado en humanos.

RELACION HOSPEDERO-PARASITO

Dentro de los aspectos inmunológicos de la relación hospedero-parásito, destacan los mecanismos de evasión que emplea el parásito para sobrevivir en el hospedero. Se han postulado distintas hipótesis para explicar esta sobrevivencia:

- 1) Secreción de un componente del parásito, al que se ha llamado Antígeno B, que no tiene funciones metabólicas ni estructurales vitales para el parásito, pero que es muy inmunogénico. Al parecer, este antígeno tiene propiedades semejantes a las fibrolectinas, como la afinidad por la colágena. Dada su gran inmunogenicidad, los anticuerpos específicos contra este antígeno, carecen de efecto directo sobre el parásito, pues estos reaccionan con un producto que ha sido eliminado y que probablemente está unido al tejido conectivo del hospedero y lejos del parásito; a este mecanismo se asemeja entonces a una "Cortina de Humo" (Correa, 1989).

2) Incorporación de inmunoglobulinas a la superficie del parásito. Hay estudios experimentales hechos con anticuerpos fluorescentes o por técnicas inmunoenzimáticas, que aportan evidencias de que algunas inmunoglobulinas del hospedero están unidas a la superficie del parásito por un receptor para su fragmento Fc, lo que impide la llegada de anticuerpos dirigidos contra otros antígenos de superficie de este metacétodo (Willms y Arcos, 1977). En la cisticercosis murina causada por *Taenia taeniformis*, también se encontró que los cisticercos son capaces de endocitar IgG del hospedero (Hayunga et al., 1989). A este tipo de evasión de la respuesta inmune, se le conoce como "Mimetismo Molecular".

3) Inducción de la inactivación del complemento. Existen estudios que sugieren que los cisticercos de *T. solium* son susceptibles al ataque del complemento *in vitro*, pero no *in vivo*, por lo que es probable que exista un mecanismo que esté relacionado con la inactivación del complemento. Nuevamente, en el modelo murino con cisticercos de *T.taeniformis*, se ha encontrado que hay productos de naturaleza glicoprotéica producidos por el parásito que inhiben tanto la reacción del complemento como la de coagulación. Por otro lado, también se ha observado que el mencionado Antígeno B, es capaz de unirse al C1q (el primer componente de la vía clásica del complemento), a través de su segmento de colágeno, y así inhibir de esta manera la reacción del complemento (Hammerberg et al., 1980; Molinari et al., 1983; Correa, 1989).

4) Inducción supresora de la respuesta inmuno celular. Hay algunas evidencias de que el cisticerco inhibe la actividad de los linfocitos T cooperadores específicos e inespecíficos, permitiendo así el desarrollo de otras enfermedades (Correa et al., 1986).

5) Por ultimo, también se argumenta que el alojamiento preferencial del cisticerco en sitios inmunológicamente privilegiados como el cerebro y el ojo, es de los principales mecanismos de evasión inmune (Barker y Billingham, 1977).

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

La cisticercosis prevalece en sitios donde existe fecalismo al aire libre y malas condiciones de vivienda e higiene, situaciones que frecuentemente se observan en los países del tercer mundo, siendo México y Brasil las zonas más afectadas del continente americano (Maharan, 1982; Schenone et al., 1982).

La frecuencia de la cisticercosis humana no puede ser determinada con precisión, debido a las dificultades para su diagnóstico. Entre ellas se pueden mencionar: la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas (ver más adelante); la existencia de una mínima respuesta inmune en los pacientes asintomáticos y de algunos enfermos con sintomatología evidente y por ultimo, las comunidades antigénicas entre cisti-

cercos y otros helmintos parásitos, lo que lleva a la inducción de anticuerpos de reactividad cruzada. Esto último tiene especial relevancia, ya que se ha informado de una alta reactividad cruzada de los sueros de individuos cisticercosos con antígenos del quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* (Briceño *et al.*, 1961; Schantz *et al.*, 1980; Woodhouse *et al.*, 1982) o de adultos de *Hymenolepis nana* (Gómez-Priego *et al.*, 1991). La reactividad cruzada observada entre la cisticercosis y la himenolepiasis, que ha variado entre el 75 % y el 90 % (Gómez-Priego *et al.*, 1991; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992), es de tomarse en cuenta, debido a la elevada frecuencia de infección (25 %), que al menos en México, presenta la himenolepiasis (Tay *et al.*, 1991).

Con respecto a México, la mayor parte de los estudios que se han realizado para determinar la frecuencia de cisticercosis humana, se han hecho principalmente en pacientes neurológicos hospitalizados y en series de necropsias.

En pacientes hospitalizados, la frecuencia ha variado dependiendo del grupo de edad analizada. Así, Robles (1946) informó de 25 % y Zenteno (1965) del 22.4 % de neurocisticercosis en adultos, mientras que en niños, Macías y Hernández (1966) y López (1982), informaron de sólo un 0.03 % y un 0.3% respectivamente.

En series de necropsias, Briceño *et al.*, (1961) y Rabiela *et al.*, (1979), informaron de frecuencias más altas (3.5 y 3.2 % respectivamente). Todos los autores han coin-

cido en que la dificultad para establecer el diagnóstico, se debe a la gran variación en la intensidad con que se presentan las manifestaciones clínicas. A este respecto, Biagi et al., informaron en 1961, la existencia de un 43.3 % de casos asintomáticos.

Las diferencias entre sexos no son significativas para padecer cisticercosis, pero aparentemente, las mujeres presentan, en comparación con los hombres, una mayor reacción inflamatoria en la neurocisticercosis parenquimatosa (Del Brutto et al., 1988), lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden estar jugando un papel importante en el proceso inflamatorio. En estudios experimentales realizados en la cisticercosis crassiceps, se encontró que en ratones de la cepa BALB/c, hay una mayor susceptibilidad en las hembras que en los machos (Larralde et al., 1988, 1990).

La cisticercosis tiene varias implicaciones médicas y sociales, que de alguna manera repercuten en la economía familiar de los enfermos que la padecen (Velasco et al., 1982). Algunos cálculos realizados para estimar el costo para los cuidados médicos, tales como hospitalización, quimioterapia y diagnóstico por TAC, señalan que en 1986, en nuestro país se gastaron 14.5 millones de dólares para atender cerca de 2,700 casos de neurocisticercosis (Flisser, 1987), lo que ejemplifica el impacto social y económico de esta parasitosis.

Si bien desde el punto de vista antropocéntrico, la cisticercosis humana es una parasitosis de suma importancia,

desde el punto de vista económico, veterinario y de salud pública, la enfermedad en el ganado porcino merece especial atención. La frecuencia de cisticercosis porcina en distintas áreas geográficas de la República, ha variado del 0.005 % al 10 % de un estado a otro. Esta parasitosis se considera como un grave problema económico, ya que para 1980 por ejemplo, se estimaron pérdidas por arriba de 43 millones de dólares por el decomiso de carne infectada, agudizando la situación de la porcicultura mexicana (Aluja, 1982; Zedillo y Bobadilla, 1987).

MANIFESTACIONES CLINICAS

La cisticercosis humana puede ser asintomática o presentar toda una gama de manifestaciones clínicas (polimorfismo clínico); lo cuál depende de la localización y viabilidad del parásito y se puede dividir en cuatro tipos generales (Zenteno, 1982):

1) Cisticercosis diseminada. En esta, los cisticercos están distribuidos en las vísceras, piel y músculos. En el tejido subcutáneo es generalmente asintomática, o si hay síntomas, en general son muy leves. En músculo, la infección cursa asintomática o puede causar dolor y debilidad y es de evolución variable; el diagnóstico se basa comunmente en imágenes radiológicas hiperdensas dadas por los cisticercos calcificados (Zavala et al., 1984). En la mucosa bucal y

sublingual, también la sintomatología es prácticamente nula, presentándose ligeras molestias y generalmente el diagnóstico se confirma a simple vista (López et al., 1974).

2) Oftalmocisticercosis. En el ojo, el parásito puede alojarse en cualquiera de los tejidos oculares, siendo más común en el humor vítreo, tejido subretineal y cámara anterior (Hogan y Zimmerman, 1962; Gómez y De Regil, 1979¹). Cuando el parásito está vivo, causa interferencia en la visión, por cambios de posición del mismo parásito; pero cuando el cisticerco muere, causa una reacción inflamatoria severa, posible atrofia del ojo y pérdida del mismo (González-Barranco et al., 1980; Cárdenas et al., 1985).

3) Neurocisticercosis. Cuando los parásitos se localizan en el sistema nervioso central, los síntomas y signos varían con la localización, número y viabilidad de los parásitos, haciendo que las manifestaciones clínicas sean polimórficas o simplemente nulas. Cuando existen, se deben a la irritación, compresión y frecuentemente a la destrucción del tejido, así como a la oclusión de los conductos de Silvio por donde pasa el líquido cefalorraquídeo. Los síntomas más frecuentes son: crisis convulsivas del tipo epiléptico, vómitos, cefalea, cuadro de hipertensión intracraneal, trastornos mentales y afección de pares craneales. Con esto se

1. Gómez, L.A y De Regil, M.C. (1979). Cisticercosis del globo ocular y sus anexos. Páginas: 57-58. Memorias del V Congreso Mexicano de Oftalmología. Veracruz, Veracruz, México.

afirma que la neurocisticercosis es compleja y sus cuadros clínicos pueden variar ad infinitum (Zenteno et al., 1961; Shanley y Jordan, 1980; Escobar, 1988¹).

4) Cisticercosis mixta. En este cuarto tipo se agrupan más de una de las localizaciones mencionadas anteriormente, y el parásito se encuentra en miocardio, hígado, intestinos, mesenterio, peritoneo, etc., por lo que el cuadro clínico y la sintomatología, varían dependiendo del sitio donde esté el parásito (Zenteno, 1982; Flisser y Lerralde, 1986).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico definitivo de la cisticercosis solamente se establece por la demostración del parásito, con procedimientos directos (cirugía) o indirectos como los Rayos X, los que durante muchos años fueron la única herramienta disponible (Santín y Vargas, 1986).

A partir de esta técnica, se desarrollaron variantes tales como la Ventriculografía, Pneumoencefalografía, Angiografía, Mielografía, etc. que, no obstante ser útiles para localizar al parásito, no permiten la definición fina de la le-

1. Escobar, I. (1988). Neurocisticercosis, patología y diagnóstico. Páginas: 57-64. En: Acevedo-Hernández, A. (Ed.). *Memorias del II Encuentro Nacional de Cisticercosis*. Pachuca, Hidalgo. México.

sión, ni tampoco la confirmación etiológica (Dorfsman, 1963; Rodríguez y Palacios, 1977; Rodríguez y Boleaga, 1982).

Con el advenimiento de la Tomografía Axial Computarizada (TAC), descrita por Honsfield (1973) y Ambrose (1973), el diagnóstico de la neurocisticercosis mejoró notablemente, demostrando ser un procedimiento seguro, no agresivo muy sensible y con un grado de certeza diagnóstica de aproximadamente 97 % (Rodríguez y Boleaga, 1982). Además, permite correlacionar las manifestaciones de la enfermedad en un solo estudio. En la actualidad, éste es el procedimiento de elección para la confirmación del diagnóstico de la cisticercosis, aunque por ser una técnica muy cara que requiere de equipo y personal especializado, sólo se encuentra disponible en hospitales de tercer nivel y en otras instituciones privadas, lo que en ocasiones queda fuera del alcance de la población de escasos recursos.

Una forma indirecta para realizar el diagnóstico de la cisticercosis, es aprovechar la respuesta inmune inducida por el parásito en el hospedero. De esta manera, se han desarrollado numerosas pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos en suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) de individuos enfermos, las cuales también han sido útiles para determinar los componentes del cisticerco que participan en la relación hospedero-parásito. Además, estas pruebas suelen ser fáciles de implementar, su costo es relativamente bajo y tienen una sensibilidad y especificidad diagnóstica aceptable, pero requieren de material y equipo no siempre

disponible en laboratorios, lo que reduce su uso como pruebas de rutina para confirmar el diagnóstico clínico de la cisticercosis.

En términos generales, para el serodiagnóstico de la cisticercosis se han empleado la Reacción de Fijación del Complemento (RFC), diversas técnicas de precipitación (Inmunodifusión (ID); Inmunolectroforesis (IEF); Contraimunolectroforesis (CIEF) y otras) de aglutinación (Hemaglutinación Indirecta (HAI), Co-Aglutinación (Co-A, esta también para detectar antígenos) y finalmente, otros procedimientos inmunoenzimáticos, llamados genéricamente EIA, tales como el Inmunoensayo con anticuerpos ligados a enzimas (ELISA), la Electroinmunotransferencia (EITB), la Difusión en Gel-ELISA (DIG-ELISA), la ELISA en punto (DOT-ELISA) y otras mas (Flisser *et al.*, 1975, 1979, 1980; Beltrán y Gómez-Priego, 1973; Arámbulo *et al.*, 1978; Larralde *et al.*, 1986; Téllez *et al.*, 1987; Tsang *et al.*, 1989; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992; Monroy-Ostria *et al.*, 1992). Algunas se han empleado para detectar antígenos circulantes en suero o LCR, pero todas se han utilizado para buscar anticuerpos. Por otro lado, algunas de ellas han permitido profundizar en el estudio de los aspectos de la respuesta inmune en el individuo cisticercoso, por ejemplo, identificando las fracciones antigénicas relevantes del parásito, la clase y subclase de inmunoglobulinas que reaccionan con los antígenos, la variación antigénica entre los cisticercos (Yakoleff *et al.*, 1982), etc. En el Cuadro 1, se presenta una síntesis de las diversas pruebas

aplicadas al serodiagnóstico de la cisticercosis, haciendo énfasis en la especificidad y sensibilidad de los ensayos, mencionando asimismo el tipo de antígeno utilizado.

Al parecer, la primera prueba serológica aplicada al serodiagnóstico de la cisticercosis, fue la RFC. La sensibilidad de la RFC con LCR, ha variado del 76 al 80 % y la especificidad del 89 al 100 % (Nieto, 1956; Biagi et al., 1961) y estos valores han sido mas bajos con suero de cerdos. La técnica tiene ciertas desventajas, siendo las principales el alto porcentaje de falsos positivos con LCR de individuos normales y la anticomplementaridad natural mostrada por algunos sueros; además, es un procedimiento laborioso que exige cuidados extremos en la preparación de las soluciones amortiguadoras y en la implementación de la prueba, así como la para su estandarización y en ocasiones, para la interpretación de los resultados.

También se han utilizado pruebas de precipitación. En estas pruebas, para que se observen los resultados, es indispensable que se cumplan tres requisitos: a) que la concentración de antígeno y de anticuerpos sea relativamente alta; b) que ambos reactantes se encuentren en equivalencia y c) que los antígenos sean polivalentes. Tanto la sensibilidad como la especificidad diagnóstica de estos ensayos, ha variado dependiendo de la prueba y muy especialmente, del antígeno utilizado (Cuadro 1). Hay que señalar que la IEF, ha sido muy útil para identificar los antígenos relevantes del pará-

sito y para demostrar la heterogeneidad de la respuesta inmune en esta enfermedad parasitaria (Flisser et al., 1975). Además, con esta técnica se demostró que casi el 85 % de los individuos cisticercosos, tienen anticuerpos que precipitan con una fracción antigénica isoelectrica a pH 8.6, a la que se le llamó Antígeno B (Flisser et al., 1979, 1980).

Para todas las pruebas serológicas que detectan anticuerpos, la técnica de extracción, el uso de inhibidores de las enzimas proteolíticas presentes en los extractos y la temperatura de conservación de los antígenos, son algunos de los elementos condicionantes para la estabilidad de los materiales antigénicos utilizados y para la reproducibilidad de los ensayos. En 1977, Gómez-Priego y colaboradores, informaron de un método para conservar los antígenos en discos de papel filtro (Inmunodiscos) sin necesidad de cuidados especiales para evitar la degradación. Esta forma de preservación de los antígenos, la demostraron en una variante de la doble inmunodifusión en gel. La sensibilidad, reactividad y especificidad, fueron idénticos a los de la ID tipo Ouchterlony, con la ventaja adicional de que los inmunodiscos permanecen estables y sin contaminación por tiempos prolongados (un año o mas) aún cuando se conservan a temperatura ambiente (Gómez-Priego et al., 1977). No obstante lo anterior, los tiempos necesarios para la completa difusión de los antígenos y anticuerpos en el gel, independientemente de si se acelera (de 4 a 8 h en CIEF) (Beltrán y Gómez-Priego, 1973; Monroy-Ostria et al., 1992) o no con una corriente eléctrica (entre

48 y 72 h en IKF) (Flisser et al., 1975, 1979, 1980), junto con los requisitos de concentración de reactantes y de la equivalencia mencionados antes, son los factores que limitan el uso de estas pruebas de precipitación.

De las diversas técnicas del tipo de la aglutinación, la HAI es la que se usa en forma rutinaria en algunos laboratorios de diagnóstico y nuevamente, tanto la sensibilidad como la especificidad diagnóstica de esta prueba, varía con el antígeno usado (Cuadro 1). Por otro lado, y a pesar de la capacidad de la prueba para detectar bajas concentraciones de anticuerpo, la positividad se vé modificada si el paciente recibió antiinflamatorios (corticoesteroides) como parte de un tratamiento médico antes de la toma de la muestra de sangre (Villanueva-Díaz y González-Barranco, 1980). La reactividad cruzada ha sido alta con sueros de pacientes infectados con el quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* (Arámbulo et al., 1978; Villanueva-Díaz y González-Barranco, 1980) y ha fluctuado entre el 76 y 100 %, aunque también se ha informado de reacciones cruzadas con sueros de pacientes afectados por otras helmintiasis, como la Fasciolosis y Esquistosomiasis (Arámbulo et al., 1978; Olivo et al., 1988). Adicionalmente, hay informes que señalan que la sensibilidad diagnóstica de HAI, puede variar del 91 % en zonas endémicas hasta el 95 % en áreas no endémicas (Larralde et al., 1986).

Como ejemplo de otra técnica de aglutinación, pero diseñada para detectar antígeno, está la Co-A, recientemente aplicada usando ICR de pacientes con neurocisticercosis. De

acuerdo con la localización del parásito en el sistema nervioso central, la sensibilidad del ensayo varió del 50 al 100 %, aunque en general, fue del 79 %, con una especificidad de casi el 90 % (Monroy-Ostria et al., 1992).

No obstante su sencillez, estas pruebas de aglutinación no aportan mayor información que la de un título serológico o una respuesta del todo o nada (positivo o negativo), lo cual, por otro lado, depende de la interpretación subjetiva del observador. Adicionalmente, es muy difícil controlar la cantidad y calidad de los reactivos (antígenos o anticuerpos) unidos a las partículas inertes, por lo que han sido desplazadas por otras técnicas que ofrecen mejores opciones de control y que además, aportan información que, aunque posiblemente también subjetiva, permite por una parte, realizar un manejo matemático más útil de los datos y por otra, conocer las fracciones antigénicas reactivas en los antígenos de prueba y en consecuencia, mejorar la especificidad de los ensayos.

Las técnicas que paulatinamente han substituido a las anteriormente descritas, han sido aquellas que utilizan un segundo anticuerpo unido covalentemente a una marca, que puede ser un isótopo radioactivo (I^{125}), una enzima (peroxidasa) o un cromógeno (fluoresceína). En el primer caso, la técnica se llama Radioinmunoensayo (RIA) y como podría esperarse, muestra valores muy altos de sensibilidad molecular y bastante aceptables de sensibilidad y especificidad diag-

nóstica (Miller et al., 1984). Sin embargo, el riesgo inherente al manejo y deshecho del material radioactivo, así como el alto costo de instalaciones, materiales, equipo y el adiestramiento necesario para su implementación, hace que este ensayo no se haya aplicado ampliamente en el serodiagnóstico de la cisticercosis (Cuadro 1).

Los ensayos que usan un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, llamados genéricamente inmunoenzimáticos (EIA), son los que se han utilizado con mayor frecuencia en los últimos años, debido a su gran versatilidad, a la estabilidad de los reactivos, confiabilidad de los resultados, excelente sensibilidad molecular y a la disponibilidad comercial de los reactivos, materiales y equipo necesarios. Justamente, la versatilidad de los EIA ha propiciado el desarrollo de un gran número de variantes que intentan mejorar los tiempos del ensayo, abatir los costos y eliminar el uso de equipo y materiales de difícil obtención.

Debido a que en este trabajo, se describe precisamente el desarrollo de una variante de un EIA, a continuación se hará una descripción más detallada de estos ensayos aplicados al serodiagnóstico de la cisticercosis.

El principio general de los EIA, se fundamenta en la propiedad que tienen la mayoría de las proteínas para adherirse a superficies plásticas o de otra naturaleza. En consecuencia, el antígeno se puede pegar a superficies plásticas de un tubo o de un pozo de una placa de microtitulación

(ELISA) (Voller et al., 1979); de una caja de Petri (DIG-ELISA) (Klwing y Nygren, 1979) o bien, después de separar los diferentes componentes del extracto antigénico por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferirlos electroforéticamente a hojas de papel de nitrocelulosa, (EITB) (Bittner et al., 1980; Larralde et al., 1986; Tsang et al., 1989). Una vez que el antígeno está inmovilizado sobre un soporte sólido, se agrega el suero del paciente que tiene anticuerpos, los cuales se unen a los determinantes antigénicos expuestos y libres (epitopos) y forman así un complejo antígeno-anticuerpo.

Para hacer visible ese complejo, en la prueba de ELISA se agrega un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, generalmente peroxidasa de rábano fuerte (Engvall y Perlmann, 1972; Voller et al., 1979) o fosfatasa alcalina (Diwan et al., 1982, Espinoza et al., 1986) el cual, al reconocer la porción Fc del primer anticuerpo, se le une y forma un complejo trimolecular. Al adicionar al sistema el sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno y un donador de hidrógeno en el caso de la peroxidasa), este sufre la acción enzimática dando un producto coloreado y la intensidad del color, va a depender de la cantidad de enzima presente en el sistema y esta, de la cantidad del primer anticuerpo fijado al antígeno. La intensidad del color se mide en un espectrofotómetro, fotocolorímetro o en un lector de ELISA, a una determinada longitud de onda en la que el sustrato desdoblado muestra su máxima absorción, generalmente en un intervalo de

405 a 490 nanómetros, por lo que los resultados usualmente se expresan en Densidades Ópticas o Unidades de Absorbancia.

En la RITB, el procedimiento es igual, pero el donador de hidrógeno usado es el 4-cloro-1-naftol o la diaminobenzidina. Aquí, el producto de la reacción enzimática, en vez de ser soluble como en ELISA, precipita justo en el lugar donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo-conjugado y en consecuencia, las lecturas se hacen a simple vista (Towbin *et al.*, 1979; Larralde *et al.*, 1986; Tsang *et al.*, 1989).

La prueba de ELISA fue utilizada por primera vez en la detección de anticuerpos en el suero de enfermos cisticercosos por Arámbulo y colaboradores en 1978. En su ensayo, emplearon dos antígenos somáticos deslipidizados, uno de cisticercos y otro de adultos de *Taenia solium* y el suero de 45 individuos residentes en México, sospechosos de padecer cisticercosis cerebral y sus resultados los comparan con la HAI. En ELISA, obtuvieron un 77.55 % de seropositividad contra 73.47 % en HAI, con un 95.96 % de concordancia entre ambas pruebas. Ellos informaron también de una alta reactividad cruzada en HAI (88.89 %) y sólo el 13.33 % en ELISA con sueros de individuos con hidatidosis. De manera interesante, la reactividad cruzada desapareció al utilizar el antígeno de adulto de *T. solium*. Lamentablemente, no registran la especificidad del ensayo como tal, sino que la confunden con la reactividad cruzada.

En otros estudios, la sensibilidad y especificidad de

ELISA, han variado entre el 61 y 95 % y el 70 y 100 % respectivamente, dependiendo de: a) el antígeno utilizado; b) el tipo de muestra analizada (Suero o LCR); c) la dilución ensayada; d) el umbral de positividad y e) la población escogida como testigo normal para definir dicho umbral. Esto último depende críticamente de la prevalencia de cisticercosis en la población escogida para tomar estas muestras control (Diwan *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 1986; Larralde *et al.*, 1986; Baily *et al.*, 1988; Díaz *et al.*, 1992).

En el primer trabajo en el que se informó del uso de la KITB para detectar anticuerpos séricos contra el fluido vesicular (FV) de cisticercos (Larralde *et al.*, 1986), se observó que la mayoría de los sueros analizados, contenían anticuerpos que identificaban claramente una fracción de peso molecular relativo de 103 Kilodaltones (Kd) y algunos sueros, aunque de manera no clara, con una serie de antígenos de menos de 50 Kd. Sorprendentemente la fracción de 103 Kd, no fue el Antígeno B, el más frecuentemente reconocido por los sueros de cisticercosos en la IEF (Flisser *et al.*, 1975, 1979, 1980).

En otro estudio (Tsang *et al.*, 1989), demostraron que con fracciones glicoproteicas del FV purificadas por cromatografía de afinidad con lectinas de lenteja, 145 de 148 muestras de suero de enfermos cisticercosos, identificaron hasta 7 fracciones comprendidas entre 13 y 50 Kd, siendo las más frecuentemente reconocidas aquellas de 24 y 42 Kd, mientras que solo los sueros de pacientes con hidatidosis, identifi-

caron bandas de mas de 70 Kd. Estos resultados confirman parcialmente las observaciones de Larralde et al., (1986) hechas con las fracciones de menor peso molecular del fluido vesicular (FV) crudo, y dado que no informan de positividad con alguna fracción de 103 Kd, parece que esta última fracción, no es una glicoproteína y concluyen que la EITB puede ser un EIA muy útil, tanto por su sensibilidad (98 %) como por su especificidad (100 %) para el serodiagnóstico de la cisticercosis en el hombre. Finalmente, en un estudio donde comparan la efectividad diagnóstica de ELISA para detectar anticuerpos ó antígeno en LCR y de la EITB para demostrar anticuerpos, Díaz y colaboradores (1992), además de confirmar que la EITB es el método de elección para el diagnóstico serológico de la cisticercosis, señalan una reactividad cruzada del 20 % en ELISA y solo del 2 % en EITB, y ésta con sueros de pacientes himenolepiásicos.

Aprovechando la propiedad que tienen la mayoría de las proteínas para adherirse firmemente a las superficies plásticas por medio de interacciones físicas aún no definidas con precisión (Lehtonen y Viljanen, 1981), Elwing et al., (1976), desarrollaron una técnica serológica que denominaron Inmunoensayo en Capa Delgada (TIA, por sus siglas en inglés) aunque posteriormente se definió como Difusión-en-gel-TIA (DIG-TIA) y que se realiza en cajas de Petri de plástico. Esta técnica consiste en agregar a la caja de Petri sensibilizada con el antígeno, una capa de gel de agar mezclado con proteínas no relacionadas para evitar la adherencia firme del agar

a la placa. Después de la gelificación, se hacen horadaciones en el gel y en los pozos así formados, se agregan las diluciones del suero. Después de 24 horas de incubación para permitir la difusión tridimensional de los anticuerpos, la capa de gel se elimina y las cajas se lavan y secan perfectamente y el anticuerpo unido al antígeno, hace que este complejo se vuelva altamente hidrofílico (en contraste con la gran hidrofobicidad que muestra el antígeno adherido a la superficie plástica), cuando al igual que en DIG-TIA, se revela por medio de la condensación de vapor de agua en la superficie de la caja de Petri donde se encuentra este complejo. Debido a que el anticuerpo difunde en el gel en forma circular y siguiendo la Ley de Difusión, como ocurre en la Inmuno-difusión Radial de Mancini (Mancini *et al.*, 1965) el diámetro de las zonas que muestran grandes acúmulos de gotas de agua debido a la hidrofiliabilidad del complejo, es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos (Elwing *et al.*, 1977).

En 1977, Elwing y colaboradores, publicaron una modificación a la que le llamaron "Spot-TIA". Esta modificación consistió básicamente en agregar pequeños volúmenes (2-7 μ l) de varias diluciones del suero con anticuerpos, directamente sobre la superficie plástica recubierta con antígeno, y después de incubar, lavar y secar, el complejo antígeno-anticuerpo se revela también con vapor de agua. Bajo estas condiciones, con "Spot-TIA" se obtienen resultados semicuantitativos de la concentración de anticuerpos (título del anti-

susero).

Tanto en DIG-TIA como en "Spot-TIA", la sensibilidad molecular del ensayo se incrementa diez veces si antes de revelar, las cajas se incuban con un anticuerpo específico para la clase de inmunoglobulinas presentes en el sistema, por ejemplo anti-IgG. Así en DIG-TIA, después de lavar y secar, los diámetros de las zonas de reacción fueron mayores y mucho mejor definidos que sin el antisuero y a este ensayo se le llamó DIG-TIA Reforzada (Elwing *et al.*, 1976; Ouchterlony y Nilsson, 1978; Ismail *et al.*, 1979; Nilsson *et al.*, 1980), mientras que en "Spot-TIA", en las muestras que inicialmente eran débiles y difíciles de distinguir, la adición del anti-gamaglobulina, las hicieron más evidentes y claramente definibles (Elwing *et al.*, 1977).

Esta secuencia técnica, sentó las bases para desarrollar una variante adicional, llamada Difusión-en-Gel-ELISA (DIG-ELISA) (Elwing y Nygren, 1979; Elwing *et al.*, 1980). En esta, se introdujeron dos modificaciones esenciales para el ensayo: a) el anticuerpo anti-inmunoglobulina específico estaba conjugado con peroxidasa o con fosfatasa alcalina y b) la reacción se revelaba al igual que en ELISA, con el sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno y p-fenilendiamina (PFD) como donador de hidrógeno para la peroxidasa) ó únicamente p-nitrofenilfosfato (PNF) para la fosfatasa alcalina, pero a diferencia de la prueba de ELISA, ambos reactivos se mezclaban en una solución de agarosa o de agar enfriada a 45°

C. En esencia, el resultado es idéntico al observado en DIG-TIA Reforzada, pero en este caso, las zonas circulares de reacción toman un color oscuro cuando el donador de hidrógeno usado para la peroxidasa fue el PFD o un color amarillo formado por la acción de la fosfatasa alcalina sobre el PNF y quedan perfectamente delimitadas con respecto a las zonas incoloras del resto de la placa, ya que la reacción ocurre justo dentro de los límites donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo-conjugado. No obstante que con el sistema fosfatasa alcalina-PNF, el resultado de la prueba podía obtenerse de 15 a 20 min después de agregar el gel que con el substrato y de que las zonas de reacción podían definirse a simple vista y delimitarse fácilmente marcando los bordes de sus diámetros en el reverso de la caja de Petri, después de 2 o 4 horas, y debido a una fotorreducción espontánea, se pierden los límites de las zonas de reacción. Este mismo fenómeno ocurre cuando se usa la o-fenilendiamina (OFD) para la peroxidasa (Gómez-Priego *et al.*, 1985). Por el contrario, con esta última enzima, la reacción fue estable cuando se usó como donador de hidrógeno el PDF o el ácido 5-amino-salicílico (5-AS) (Gómez-Priego y Valdez-Bermúdez, 1988¹) lo que permite además, que los resultados permanezcan sin cambios a pesar de que se secase el gel que contiene el substrato.

1. Gómez-Priego, A. y Valdéz-Bermúdez, O.A. (1986). Cuantificación de anticuerpos en la oncocercosis con la prueba de DIG-ELISA. Pág.: 46. En: Acevedo-Hernández, A. y Gómez-Priego, A. (Eds.). Memorias del VII Congreso Nacional de Parasitología. Puebla, Puebla. México.

La prueba de DIG-ELISA ha sido utilizada para la detección de anticuerpos en la oncocercosis (Gómez-Priego et al., 1982¹, 1985), triquinosis (Ljungstrom, 1983), cisticercosis (Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992) y en infecciones causadas por *Yersinia enterocolitica* O:3 (Lange et al., 1981) y la proporcionalidad entre el diámetro de las zonas de reacción y la concentración de anticuerpos, fue demostrada por Elwing et al., (1980) y confirmada por Gómez-Priego y Valdéz-Bermúdez (1986)². Una observación consistente en esta prueba fue el hecho de que en muestras con diámetros de las zonas de reacción similares, había diferencias en la intensidad de color formado en ellas (Gómez-Priego y Valdéz-Bermúdez, 1986³), sugiriendo que además de éste diámetro, la intensidad del color producido podría tener relación con la concentración de anticuerpos.

Resumiendo estos antecedentes, la cisticercosis humana es una parasitosis de importancia en salud pública, con relativa dificultad para su diagnóstico clínico y su confirmación parasitológica, a pesar de que los recursos serológicos, han ofrecido buenas soluciones a estas dificultades. No obstante que las pruebas de ELISA y EITB son las que en la actualidad ofrecen las mejores condiciones de especificidad y

1. Gómez-Priego, A., Paniagua-Solis, J.F., Rivas-Alcala, A.R. y Ruenes-Meza, M.T. (1982). TIA-ELISA en oncocercosis. Resultados preliminares. Memorias del V Congreso Nacional de Parasitología. Puebla, Puebla. México.

2. Op. cit. (pág. 31).

3. Op. cit. (pág. 31).

sensibilidad para el serodiagnóstico, su uso se restringe a instituciones de investigación ó a aquellas con recursos suficientes para la adquisición de equipos, materiales y reactivos necesarios para su implementación. A pesar de que existe una alternativa como la técnica de DIG-ELISA, que no necesita de equipo, materiales o habilidades técnicas especializadas, tiene aún el inconveniente de requerir de tiempos largos para la obtención de resultados.

La propiedad que tienen los componentes antigénicos del cisticerco de *T. solium* de adherirse firmemente a superficies plásticas, en los EIA les confiere, una gran versatilidad para desarrollar técnicas alternativas que permitan superar los problemas mencionados, tratando de conservar, e incluso mejorar, la especificidad, sensibilidad y eficiencia que los EIA han aportado al serodiagnóstico de la cisticercosis humana.

CUADRO 1.

PRUEBAS SERODIAGNOSTICAS UTILIZADAS
EN LA CISTICERCOSIS.

* Autor at al	Año	Tipo de Antígeno	Fuente de anticuerpos	Prueba	Sens. ¹ (%)	Esp. ² (%)
Nieto	1956	Somático alcohólico	LCR	RFC	76	89
Biagi*	1961	Somático alcohólico	Suero	RFC PTC HAI	80 13 90	100 10 100
Beltrán*	1973	ASC ASI ES FV	Suero	CIEF	100 ≤100	- -
Flisser*	1975	Escólex Pared FV	Suero	IEF	82.5 53.8 56.2	94.6 100 86.5
		Escólex Pared FV		ID	35.7 46.1 57.1	100 94.6 100
Arámbulo*	1978	Somático deslipidizado	Suero	HAI ELISA	73.4 77.5	- -
Flisser*	1980	Antígeno B	Suero	IEF	84.5	75.3
Villanueva*	1980	Somático deslipidizado	Suero	HAI	77.5	95
Schantz*	1980	Somático salino	Suero	HAI	97	76.1
Diwan*	1982	Somático deslipidizado	LCR Suero	KLISA	79 80	85 90
Miller*	1984	Pared	LCR	RIA	90	100
Espinoza*	1986	Antígeno B	Suero	KLISA	80	96
Larralde*	1986	FV	Suero			
				Zona Endémica		
				HAI	91	88
				KLISA	80	70
				Zona No Endémica		
				HAI	95	100
				KLISA	95	100

Tellez*	1987	Antígeno en LCR	Suero de conejo	DOT-ELISA ELISA	59 77	100 100
Baily*	1988	FV Pared Escólex	Suero	ELISA	84.2 64.8 51.3	78.3 33.3 64.8
Teang*	1989	Glicoproteínas del FV	Suero	IETB	98	100
Gómez- Priego*	1992	FV	Suero	HAI DIG-ELISA	100 93.7	97.1 97.1
Monroy- Ostria*	1992	Somático alcohólico	LCR	RFC Co-A** CIEF**	72.7 79 100	75.8 90 59.2
Díaz*	1992	Glicoproteínas del FV	Suero	EITB	100	100

Sens.¹ = Sensibilidad.

Esp.² = Especificidad.

ASI= Antígeno Somático Incompleto.

ASC= Antígeno Somático Completo.

Co-A= Co-Aglutinación.

CIEF= Contrainmunolectroforesis.

DIG-ELISA= Difusión en gel-ELISA.

DOT-ELISA= ELISA en punto.

EITB= Electroinmunotransferencia.

ELISA= Inmunoensayo con anticuerpos ligados a enzimas.

ES= Excreciones y Secreciones.

FV= Fluido Vesicular.

HAI= Hemaglutinación Indirecta.

ID= Doble Inmunodifusión.

IEF= Inmunolectroforesis.

LCR= Líquido cefalorraquídeo.

PTC= Precipitación en Tubo Capilar.

RIA= Radio inmunoensayo.

RFC= Reacción de Fijación del Complemento.

** Detectan antígeno con anticuerpos de conejo.

OBJETIVOS

Apoyándose en lo descrito en la sección precedente, para este trabajo se fijaron los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

1) DESARROLLAR UNA PRUEBA DEL TIPO INMUNOENZIMATICO APLICABLE PARA EL SERODIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1) TOMANDO COMO BASE UN PROCEDIMIENTO GENERAL, ESTANDARIZAR EL ENSAYO POR MODIFICACION DE ALGUNOS DE LOS PASOS TECNICOS, EMPLEANDO UN SISTEMA ANTIGENO - ANTICUERPO AMPLIAMENTE CONOCIDO.

2) DETERMINAR AL MENOS EN FORMA PRELIMINAR, LA APLICABILIDAD DE LA PRUEBA EN DIVERSOS SISTEMAS ANTIGENO- ANTICUERPO EN ENFERMEDADES PARASITARIAS Y MICOTICAS.

3) APLICAR EL PROCEDIMIENTO YA ESTANDARIZADO, A LA DETECCION DE ANTICUERPOS SERICOS EN ENFERMOS CISTICERCOSOS.

4) REALIZAR UNA EVALUACION SEROLOGICA DE LA PRUEBA, USANDO LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON SUEROS DE INDIVIDUOS NORMALES Y DE PACIENTES CON CISTICERCOSIS CONFIRMADA.

5) COMPARAR LA UTILIDAD DEL ENSAYO CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA DE ELISA.

HIPOTESIS

Si las pruebas inmunoenzimáticas como el inmunoensayo con anticuerpos ligados a enzimas (ELISA), la electroinmuno-transferencia (EITB) y la prueba de Difusión en gel-ELISA (DIG-ELISA) aplicados al serodiagnóstico de la cisticercosis, tienen sus fundamentos en la inmovilización del antígeno sobre materiales sólidos (plástico o papel de nitrocelulosa), al combinar y modificar algunos de los pasos técnicos de esos ensayos para desarrollar una nueva prueba para la determinación de anticuerpos específicos en esta y otras enfermedades infecciosas y parasitarias por medio de reacciones enzima-sustrato localizadas, es de esperarse que tanto la sensibilidad y especificidad como la eficiencia, rapidez y economía de esta nueva prueba, sean comparables o incluso mejores a las de ELISA, EITB y DIG-ELISA, para el serodiagnóstico de esas enfermedades.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que la neurocisticercosis es una enfermedad parasitaria frecuente en nuestro medio y que presenta algunas dificultades para establecer el diagnóstico clínico, es necesario contar con métodos serológicos alternos que sean confiables, accesibles y de bajo costo para apoyar el diagnóstico clínico.

En la actualidad, el diagnóstico serológico de esta enfermedad parasitaria se hace por medio de métodos inmunoenzimáticos, los que no obstante que han alcanzado un aceptable grado de confiabilidad, adolecen aún de problemas relacionados con el tiempo para desarrollar la prueba, alto costo de los materiales y reactivos y además, varios de ellos requieren de adiestramiento especializado para su implementación, todo lo cual limita su aplicación en cualquier laboratorio clínico no incorporado a instituciones hospitalarias o de investigación.

Por lo tanto, el desarrollo de nuevos métodos que, al menos en parte, ayuden a minimizar estos problemas, podría coadyuvar no solo a mejorar el diagnóstico de esta enfermedad parasitaria, sino que también, lo pondrían al alcance de cualquier laboratorio de diagnóstico.

MATERIAL Y METODOS

I.- ANTIGENOS.

a) PROCEDENCIA.

En este trabajo, se utilizaron antígenos de tres especies de hongos, uno de protozoarios y cinco de helmintos, gentilmente proporcionados por los laboratorios de Inmunoparasitología, Micología Básica y Biología de los Parásitos, todos Del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como por el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, también de la UNAM, a quienes se les agradece su colaboración. En la Tabla I, se presenta un listado de los antígenos utilizados, indicando asimismo, el tipo de extracto de que se trata.

Los antígenos de *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* y *Ascaris lumbricoides suum*, fueron preparados de acuerdo al método de Sacarosa-Acetona (Clark y Casals, 1958); los de hongos (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*) y el del protozoo *Trypanosoma cruzi*, se preparó siguiendo el método desarrollado por Toriello y Mariat, (1974).

TABLA I.

ANTIGENOS UTILIZADOS EN LA PRUEBA DE TIA-ELISA.

Antígeno elaborado de	Tipo
Albumina Sérica Bovina	Purificado
<i>Sporothrix schenckii</i>	Purificado
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Purificado
<i>Coccidioides immitis</i>	Purificado
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Exoantígeno
<i>Plasmodium berghei yoelii</i>	Exoantígeno
<i>Plasmodium vivax</i>	Crudo
<i>Fasciola hepatica</i>	Crudo deslipidizado
<i>Taenia solium</i> (larva)	Fluido vesicular
<i>Ascaris lumbricoides suum</i>	Crudo deslipidizado
<i>Toxocara canis</i>	Crudo deslipidizado
<i>Trichinella spiralis</i>	Crudo deslipidizado

Debido a que el enfoque del trabajo está principalmente orientado hacia el serodiagnóstico de la cisticercosis, únicamente se describirá al detalle la preparación del antígeno del fluido vesicular del cisticerco de *Taenia solium*.

b) OBTENCION DEL FLUIDO VESICULAR (FV).

El FV se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito por Gómez-Priego y Gutiérrez, (1992). El material básico para la preparación de este antígeno, provino de carne de cerdo infectada naturalmente y decomisada en el Rastro ABC de Los Reyes, Edo. de México.

PROCEDIMIENTO

- 1) Con ayuda de pinzas y bisturí, se extrajo cuidadosamente el mayor número de cisticercos completos.

- 2) Se depositaron en cajas de Petri que contenían de 10 a 15 ml de solución salina 0.85 % (SS).
- 3) En condiciones de esterilidad, se lavaron varias veces con SS para eliminar los restos de tejido.
- 4) Una vez limpios, se colocaron en vasos de precipitado con SS adicionada con antibióticos (Penicilina 1,000 UI/ml; Estreptomocina 1 mg/ml), de tal manera que la solución los cubriera completamente y se dejaron durante una hora a temperatura ambiente (TA).
- 5) Se decantó el sobrenadante y los cisticercos se lavaron varias veces con SS para eliminar el exceso de antibióticos.
- 6) En ambiente de esterilidad, los cisticercos se transfirieron cuidadosamente a una caja de Petri estéril inclinada. Con agujas de disección, se desgarró la pared del cisticerco, dejando escurrir el FV, colocando los restos del parásito en la parte superior de la caja.
- 7) Con pipetas Pasteur se recogió el FV, transfiriéndolo a tubos de centrifuga estériles.
- 8) Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 9) Se recogió el sobrenadante, el cual se repartió en alícuotas de 1 ml en frascos de vidrio, estos se

etiquetaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

c) DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY et al., (1951).

- 1) En tubos de ensaye de 10 ml previamente marcados, se colocó 1 ml de la solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA), diluida en agua destilada de manera que en cada tubo, quedaran concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μg de proteína por ml de solución. Como blanco de reactivos, se usó un tubo con 1 ml de agua destilada.
- 2) En otros tubos, se hicieron diluciones al doble de las muestras problema en agua destilada, partiendo de 1:50 y terminado en 1:1600.
- 3) Se preparó al momento, un volumen suficiente de una mezcla de sulfato de cobre al 1 %, tartrato de sodio y potasio al 2 % y carbonato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 N, en proporción de 0.1 ml, 0.1 ml y 10 ml respectivamente.
- 4) A cada uno de los tubos, se añadieron 3 ml de ésta solución.
- 5) Los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 10 min a TA.

- 6) A cada tubo se agregó 0.3 ml del reactivo de Folin 1 N.
 - 7) Se agitó vigorosamente cada tubo y se dejaron reposar 30 min a TA.
 - 8) Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 0.3 ml de cada tubo y se depositaron por duplicado en las tiras de micropozos colocadas en los marcos portatiras.
 - 9) Después de ajustar el lector de micro ELISA MR-300 (Dynatech) a cero con uno de los pozos del blanco de reactivos, cada pozo se leyó a 490 nm, registrando las densidades ópticas.
 - 10) Con los resultados de las muestras patrón, graficados contra concentración, se obtuvo una línea de referencia en la cual se interpolaron las densidades ópticas de las muestras problema para obtener la concentración virtual.
 - 11) La concentración real, se obtuvo multiplicando la concentración virtual por el factor de dilución de cada muestra.
- d) DETERMINACION DE HEXOSAS POR EL METODO DE DUBOIS *et al.*, (1956).
- 1) En tubos de ensaye de 10 ml previamente marcados,

se colocó 1 ml. de glucosa 0.01 %, diluida en agua destilada de manera que en cada tubo, quedaran concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 100 µg de glucosa por ml de agua destilada. Como blanco de reactivos, se usó un tubo con 1 ml de agua destilada.

- 2) En otros tubos se hicieron diluciones al doble de las muestras problema en agua destilada, partiendo de 1:50 y terminando en 1:1600.
- 3) A cada uno de los tubos se agregó 1 ml de Fenol al 5 % .
- 4) Se agitó y dejó reposar un minuto a TA.
- 5) De un solo golpe, se añadieron 4 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada uno de los tubos, usando una pipeta serológica de 10 ml despuntada.
- 6) Los tubos se agitaron y se dejaron enfriar durante 10 min en baño helado.
- 7) Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 0.3 ml de cada tubo y se depositaron por duplicado en las tiras de micropozos colocadas en los marcos portatiras.
- 8) Después de ajustar el lector de micro ELISA a cero con uno de los pozos del blanco de reactivos, cada pozo se leyó a 490 nm, registrando las densidades ópticas.

- 9) Con los resultados de las muestras patrón, graficados contra concentración, se obtuvo una línea de referencia en la cual se interpolaron las densidades ópticas de las muestras problema para obtener la concentración virtual.
- 10) La concentración real, se obtuvo multiplicando la concentración obtenida en la gráfica por el factor de dilución de cada muestra.

II. SUEROS

a) ORIGEN DE LOS SUEROS.

En la Tabla II, se anota la relación de los sueros utilizados en este trabajo, agrupados de acuerdo a su origen (humano, conejo ó ratón), indicando su número y si provienen de la infección natural ó de la inmunización artificial.

Estos sueros fueron utilizados en la estandarización de la prueba (ratón anti-albumina sérica bovina); en la aplicación para el serodiagnóstico de la cisticercosis (humano anticisticercos y normales) y los restantes, para determinar la reactividad cruzada ó la aplicación de la prueba con otros sistemas antígeno-anticuerpo.

TABLA II.

ANTISUEROS UTILIZADOS EN LA PRUEBA DE TIA-ELISA.*

Sueros con anticuerpos contra:	Prueba Serológica	Especie		
		Humano	Conejo	Ratón
Normal	-----	69**	1	2
Albúmina Sérica Bovina	ELISA	---	---	2
<i>Sporothrix schenckii</i>	Precipitación	2	1	---
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Precipitación	3	---	---
<i>Coccidioides immitis</i>	ELISA	3	---	---
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ELISA, HAI	8	---	---
<i>Plasmodium vivax</i> ***	-----	3	---	---
<i>Plasmodium berghei yoelii</i>	ELISA	---	---	5
<i>Fasciola hepatica</i>	HAI	1	1	---
<i>Taenia solium</i> (larva)	ELISA, HAI	29	---	---
<i>Ascaris lumbricoides</i>	HAI	2	1	---
<i>Toxocara canis</i>	ELISA, HAI	4	1	---
<i>Trichinella spiralis</i>	HAI, CIEF	---	3	---

HAI = Hemaglutinación Indirecta

Precipitación = Doble inmunodifusión tipo Ouchterlony

CIEF = Contraelectroforesis

*Todos los sueros de humano positivos a algún antígeno, provinieron de la infección natural, mientras que los de conejo y ratón lo fueron de la inmunización artificial.

**Sueros de personas aparentemente sanas.

***El parásito se detectó en frotis teñidos con Giemsa.

b) INMUNIZACION ARTIFICIAL DE RATONES

- 1) Antes de la inmunización, varios lotes de 10-12 ratones fueron numerados para su identificación y sangrados para control (ver más adelante).
- 2) Cada ratón se inoculó por vía intraperitoneal con 1 ml de BSA (100 µg/ml) los días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 37 y 44.

- 3) Después de este tiempo, a todos los ratones se les dió un refuerzo con periodicidad mensual con la misma concentración de antígeno.

c) OBTENCION DE LOS SUEROS

- DE LA INFECCION NATURAL (HUMANOS)

Los 29 sueros de individuos cisticercosos utilizados en este trabajo, provinieron de pacientes con diagnóstico confirmado por tomografía axial computarizada, por cirugía o por serología y fueron proporcionados por los laboratorios de Inmunoparasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina y por el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, ambas de la UNAM, mientras que los sueros de pacientes infectados con hongos ó helmintos, fueron donados por los laboratorios de Micología Básica y de Inmunoparasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las muestras fueron enviadas por instituciones hospitalarias o tomadas directamente en esos laboratorios, pero en todos los casos, llegaron con fines de confirmación diagnóstica.

PROCEDIMIENTO

- 1) Las muestras de sangre se obtuvieron por punción

venosa del antebrazo, ya sea con jeringa desechable ó con Vacutainer, previa asepsia de la región.

- 2) En el primer caso, la sangre fue transferida a tubos de centrifuga Wasserman de 9 ml estériles, mientras que en el segundo, la sangre se dejó en los mismos tubos.
- 3) Las muestras se incubaron a 37°C durante una o dos horas y luego a 4°C durante dos horas adicionales para lograr la retracción del coágulo.
- 4) Se centrifugó a 1,500 rpm en centrifuga clinica TA durante 15 min, separando antes el coágulo con aplicador de madera.
- 5) En ambiente de esterilidad, se cosechó el suero con pipeta Pasteur estéril y se transfirió a tubos de vidrio Wasserman estériles.
- 6) Se agregó azida de sodio 1.54 M hasta obtener una concentración final de 15 mM; se repartió en alícuotas de 0.4 ml, se etiquetaron y se conservaron en congelación a -10°C hasta su uso.

- DE LA INMUNIZACION ARTIFICIAL (RATONES)

PROCEDIMIENTO

- 1) Con el ratón colocado sobre la tapa de la jaula,

se agregó talco a lo largo de toda la cola.

- 2) Con las tijeras se cortaron de 3 a 4 mm del extremo distal de la cola.
- 3) Con los dedos índice y pulgar, se frotó la cola del ratón con un movimiento descendente hasta obtener una gota de sangre en la punta de la cola.
- 4) La gota de sangre se recogió aplicando el extremo de un tubo capilar heparinizado.
- 5) Se repitieron los pasos 3 y 4 hasta que la columna de sangre llegara a aproximadamente 5-6 mm del otro extremo del tubo capilar.
- 6) Se sellaron los tubos con fuego por el extremo vacío y se transfirieron a tubos Wasserman previamente identificados con el número del animal. Los pasos 3,4,5 y 6 se repitieron hasta obtener 10 tubos capilares de cada animal (aproximadamente 0.5 ml).
- 7) Se centrifugaron en centrifuga clínica a 1,500 rpm durante 15 min a TA.
- 8) Los capilares se cortaron en la interfase plasma-leucocitos y el plasma se recogió en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- 9) A cada tubo Eppendorf se agregó azida de sodio hasta una concentración de 15 mM y los plasmas se

mezclaron para integrar una muestra de cada fecha.

- 10) Se etiquetaron y almacenaron en el congelador hasta su uso.

- CONEJO Y CABRA

Los sueros hiperinmunes de conejo y cabra, no fueron preparados en el laboratorio, sino que se consiguieron por donaciones. En consecuencia, y debido a que los protocolos de inmunización para cada especie de animal y para cada antígeno fueron diferentes y no se tuvo acceso al procedimiento específico, no se detallarán en esta sección.

III.- CONJUGADOS

- a) OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN GAMAGLOBULINA (Parkhouse y Abney, 1981).

PROCEDIMIENTO

- 1) En un vaso de precipitados de 50 ml, se disolvieron aproximadamente 300 mg de suero liofilizado antigamaglobulina en 5 ml de agua destilada.

- 2) Se agregaron 10 ml de PBS 150 mM, pH 7.2 y se dejó en agitación constante durante 10-15 min, procurando evitar la formación de espuma.
- 3) La solución se transfirió a tubos Wasserman de 9 ml y se centrifugó 15 min, TA a 1,500 rpm en centrifuga clínica.
- 4) El sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados de 50 ml colocado en baño helado.
- 5) Se agregaron 15 ml de solución saturada de sulfato de amonio en PBS (SSSA-PBS) fría, gota a gota y agitando, dejándose en baño helado y en agitación constante durante 30 min.
- 6) La suspensión se transfirió a tubos de centrifuga y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min.
- 7) Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en 15 ml de PBS.
- 8) Se repitieron los pasos 5 y 6.
- 9) El precipitado se redisolvió en 2.5 ml de PBS y dializó 24 h con 500 ml de PBS, dos cambios.
- 10) Se determinó la concentración de proteínas, se envasó en alícuotas de 1 ml, se etiquetó y almacenó en congelación hasta su uso.

- b) CONJUGACION CON PEROXIDASA (Avrameas y Ternynck, 1971; Parkhouse y Abney, 1981).

PROCEDIMIENTO

- 1) Se pesaron 10 mg de peroxidasa de rábano fuerte, tipo VI (Sigma), se disolvieron en 0.2 ml de PBS 10 mM, pH 6.8, adicionado de glutaraldehído (concentración final de 1.25 %) y se dejó reposar toda la noche a TA.
- 2) Se ajustó a 1 ml con SS y se dializó contra la misma solución (dos cambios).
- 3) La enzima activada se transfirió a un tubo de ensaye, se agregó 1 ml del anticuerpo (5 mg) en SS y 1 ml de bicarbonato de sodio 100 mM, pH 9.5. El tubo se tapó y dejó en reposo a 4°C durante 24 h.
- 4) Después de este tiempo, se añadieron 0.2 ml de L-lisina 200 mM y se dejó incubar a TA durante 2 h.
- 5) Se dializó contra PBS (dos cambios).
- 6) El conjugado se precipitó en frío con un volumen igual de SSSA-PBS y se dejó durante 20 min con agitación constante en baño helado.
- 7) Se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C.
- 8) Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un volumen igual de SSSA-PBS al 50 %

de saturación y se centrifugó como en el paso anterior; esto se realizó dos veces.

- 9) Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 2 ml de PBS, dializándose contra la misma solución con tres a cuatro cambios.
- 10) La solución del conjugado se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C.
- 11) Se reactivó el sobrenadante y se le agregaron 20 mg de BSA. Se repartió en alícuotas de 0.2 ml y se etiquetó y almacenó en congelación hasta su uso.
- 12) Se tituló el conjugado en la prueba de ELISA tipo directa (ver más adelante). Para ello, y dependiendo de la especificidad del conjugado, se utilizó como antígeno, suero normal de humano, de conejo ó de ratón, diluidos serialmente al doble (10 diluciones), partiendo de 1:100 en amortiguador de carbonatos 64 mM, pH 9.5 (BC), mientras que el conjugado se diluyó en PBS adicionado con Tween-20 al 0.05 %, concentración final (PBS-T), partiendo de 1:250. El título se definió como la dilución más alta del conjugado que diera una absorbancia mayor de 0.35 unidades de densidad óptica con la dilución más baja del antígeno.

IV. INMUNOENSAYO CON ANTICUERPOS LIGADOS A ENZIMAS (ELISA).

- a) METODO INDIRECTO (Parkhouse y Abney, 1981; Gómez-Priego et al., 1991) (Figura 1).

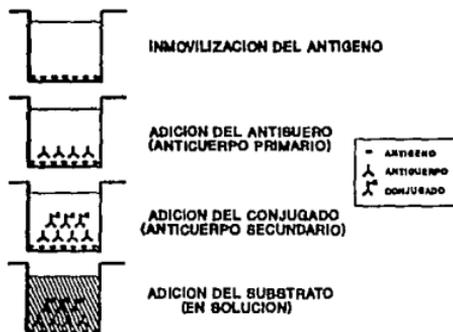


Figura 1. Representación esquemática de los cuatro pasos fundamentales en el desarrollo del inmunoensayo con anticuerpos ligados a enzimas (ELISA). Cada paso requiere de un período de incubación y de un lavado previo con PBS-T. El paso final muestra el sustrato coloreado después de la reacción enzimática.

PROCEDIMIENTO

- 1) A cada pozo, de placas de micro-ELISA de 96 pozos, fondo plano (Immulon II, Dynatech, Alexandria, VA, USA), se agregó 0.1 ml del antígeno (3.4 µg/ml) diluido en BC, excepto en dos pozos en los cuáles sólo se agregó BC.
- 2) Se incubó toda la noche (18 h) a 4°C.

- 3) Pasado este tiempo, se decantó el sobrenadante sacudiendo la placa en el vertedero. El exceso de líquido se eliminó sacudiendo las placas contra papel absorbente colocado sobre la mesa.
- 4) Se agregaron 0.25 ml de BSA al 0.5 % en BC a cada pozo para bloquear las superficies libres.
- 5) Se dejó incubar durante 60 min a 37°C.
- 6) Se eliminó el sobrenadante como en el paso 3 y se lavó con PBS-T tres veces, cada lavado de 3 min.
- 7) Los sueros se diluyeron al doble con PBS-T, partiendo de 1:240 y se agregó 0.1 ml de cada dilución a pozos por duplicado. En cada placa, siempre se incluyeron pozos con suero testigo (negativo y positivo), también por duplicado.
- 8) Se repitieron los pasos 5 y 6.
- 9) Se agregó 0.1 ml de la dilución óptima del conjugado (1:1000), diluido en PBS-T a cada pozo, excepto en los que no tuvieron antígeno.
- 10) Se repitieron los pasos 5 y 6.
- 11) Se preparó al momento, un volumen suficiente de la solución del sustrato (ácido cítrico 24 mM; fosfato dibásico de sodio 51 mM, pH 5.0; o-fenilendiamina 0.4 mg/ml y peróxido de hidrógeno al 3 % 1.6 μ l/ml) y se agregaron 0.25 ml a cada pozo.

- 12) Se incubó 30 minutos en la obscuridad y a TA.
- 13) Se detuvo la reacción agregando 0.025 ml de ácido sulfúrico 2.5 M a cada pozo.
- 14) La placa se colocó en el lector de ELISA y se obtuvieron las densidades ópticas (DO) a 490 nm.

b) METODO DIRECTO

PROCEDIMIENTO

- 1) Este método se utilizó para titular los conjugados. Para ello, y dependiendo de la especificidad del conjugado, se empleó como antígeno suero normal de humano, de conejo ó de ratón diluidos al doble en BC, partiendo de 1:100 (10 diluciones).
- 2) El conjugado se diluyó en PBS-T, partiendo de 1:250 y se agregó 0.1 ml a cada poza, siguiendo una titulación tipo tablero de ajedrez, es decir, en las hileras horizontales se colocan las diluciones del antígeno y en las verticales, las diluciones del conjugado. El resto del procedimiento fue idéntico al método indirecto.
- 3) El título se definió como la dilución más alta del conjugado que diera una absorbancia mayor de 0.35 unidades de densidad óptica (DO), con la dilución más baja del antígeno.

c) DETERMINACION DE LOS COCIENTES DE DENSIDAD OPTICA (CDO) (Gómez-Priego et al., 1991).

Debido a la variabilidad en las DO observadas entre placas, los resultados se transformaron a cocientes de densidad óptica (CDO), calculados con la fórmula: $CDO = DOP/DON$, donde DOP fue la densidad óptica del suero problema y DON fue la media más dos desviaciones estándar de la DO obtenida de los duplicados del suero testigo negativo.

d) DETERMINACION DEL CRITERIO DE POSITIVIDAD EN ELISA (Gómez-Priego et al., 1991).

De los CDO's de los sueros de los individuos normales, se obtuvo la media y se le sumó dos veces su desviación estándar, dando un valor de 1.90, que redondeado a 2, se consideró como el umbral de positividad en la prueba.

e) CODIFICACION DE LOS TITULOS

Para uniformar los resultados, las diluciones de los sueros se transformaron logarítmicamente (\log_2) obteniendo así los títulos codificados (TC) en donde a la primera dilución (1:240) se le dió un TC de CER0 o negativo y aumentando una unidad hasta la última dilución ensayada (1:15, 360).

V. INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA-ELISA (TIA-ELISA) (Elwing et al., 1980; Gómez-Priego et al., 1991). (Figura 2)

a) ESQUELETO TECNICO DEL PROCEDIMIENTO

En términos generales, la técnica consta de: a) fase Físicoquímica, que implica la adsorción del antígeno a la superficie plástica de una caja de Petri; b) fase Inmunológica, que incluye la unión del primer anticuerpo al antígeno inmobilizado y la del segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa al complejo antígeno-anticuerpo y c) fase Bioquímica, que es la acción de la enzima sobre su sustrato, realizándose en forma localizada y denotada por un característico color pardo, que se inicia justo arriba del complejo trimolecular.

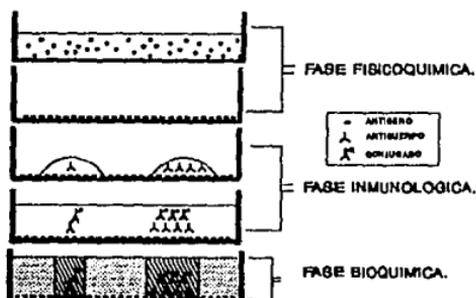


Figura 2. Representación gráfica del desarrollo de la prueba de TIA-ELISA. Las diferencias en el ashurado en la última ilustración, representan el sustrato degradado (//) y no degradado (•••) en el gel por la acción enzimática de la peroxidasa unida covalentemente al anticuerpo de cabra anti-gammaglobulina específico.

b) ESTANDARIZACION DEL ENSAYO

Para la estandarización y optimización de la prueba, se analizaron las variables que se indican en las Tablas III y IV.

TABLA III.

VARIABLES ANALIZADAS DE LA FASE FISICOQUIMICA DE TIA-ELISA.

VARIABLE	ESPECIFICACION
AMORTIGUADOR	A) Carbonato-Bicarbonato de Sodio 65 mM, pH 9.6 B) Fosfatos-Salina 150 mM, pH 7.2 C) Salina 135 mM, pH 6.8
TEMPERATURA	A) Temperatura ambiente (18-22°C) B) 37° C
CONCENTRACION TIEMPO	50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.00013 µg/ml (10 ml). 5, 15, 60, 120, 180 minutos.

TABLA IV.

VARIABLES ANALIZADAS DE LA FASE INMUNOLOGICA DE TIA-ELISA.

VARIABLE	ESPECIFICACIONES
TITULO DE ANTICUERPOS	Suero de títulos medios (1:40 a 1:40,960) Suero de altos títulos (1:40 a 1:327,960)
TITULO DE CONJUGADOS	1:50, 1:100; 1:200; 1:400; 1:600; 1:800 1:1,000; 1:1,200
DILUYENTE DE ANTISUEROS*	Fosfatos-Salina 150 mM, pH 7.2 (PBS) PBS-Tween-20 (PBS-T) Suero de Ratón Normal con NaN_3^{**} (PO^-) Suero de Ratón Normal con SS (PO^+)

* Realizadas en placas con y sin antígeno.

** 15 mM, concentración final.

Para analizar la sensibilidad molecular de la prueba (titulación de los sueros), se analizaron 14 diluciones hechas al doble (\log_2), en PBS-T de dos antisueros preparados en ratón, uno de altos títulos (1:327,680) (Suero 9) y otro de títulos medios (1:40,960) (Suero 11), demostrados en ELISA tipo indirecto. Por otro lado, también se titularon los conjugados siguiendo dos métodos: En el primero, al que se le llamó directo, se usó como antígeno suero normal de ratón, de conejo o de humano diluidos 1:200 en BC para sensibilizar una caja de Petri (Technicare, México) y las diluciones del conjugado se agregaron en gotas de 5 μ l y en el segundo, llamado método indirecto, se usaron varias placas sensibilizadas con BSA o con FV de cisticercos, seguido de 5 μ l de las diluciones de los antisueros específicos y finalmente, de 8.5 ml de las diluciones del conjugado a analizar.

Por último, para analizar la influencia que pudiera tener el diluyente de los antisueros en la especificidad del resultado en TIA-ELISA, éstos fueron diluidos en PBS, PBS-T ó en suero de ratón normal. En este último caso, y debido a que el suero diluyente estaba hemolizado y contenía abundantes peroxidasas naturales de los eritrocitos, para determinar la influencia de la actividad enzimática inespecífica de estas peroxidasas, el suero se dividió en dos partes iguales; a una se le adicionó azida de sodio (15 mM, concentración final) para inhibir la actividad de las peroxidasas naturales (Sparrow y Williams, 1986; Lim, 1988) y a la otra, usada como testigo positivo, se agregó el mismo volumen de SS. Estos

reactivos fueron denominados PO⁻ y PO⁺ respectivamente.

PROCEDIMIENTO GENERAL

- 1) A la caja de Petri de plástico, se agregó la concentración óptima del antígeno diluido en 10 ml de un amortiguador determinado.
- 2) Se dejó incubando con agitación constante durante 2 h a TA.
- 3) Se decantó el sobrenadante y la placa se lavó con SS y agua destilada.
- 4) Se secó completamente con una corriente ligera de aire.
- 5) Se hicieron 6 diluciones al doble en PBS-T de los sueros, iniciando con 1:30 y se colocaron 5 µl de cada dilución, distribuyéndose por duplicado en la placa, siguiendo un patrón preestablecido.
- 6) Las cajas tapadas e invertidas, se incubaron en cámara húmeda a 37° C durante 60 min y se lavaron después con PBS-T.
- 7) Sin secar, se agregaron 8.5 ml de la dilución óptima del conjugado en PBS-T y se incubaron en cámara húmeda como se indicó arriba.
- 8) Después de eliminar el sobrenadante, las placas se lavaron con PBS-T y PBS.

- 9) Se colocaron las placas sobre una superficie perfectamente horizontal.
- 10) Se agregó el sustrato (1.6 µl/ml de peróxido de hidrógeno y 0.5 mg/ml de Acido 5-aminosalicílico (5-AS) (Sigma, Chemicals St. Louis MO. USA), disueltos en 10 ml de agar noble (DIFCO) al 0.75 % en PBS y enfriado a 45° C.
- 11) Se dejó gelificar a TA durante 15 min a que procediera la reacción enzimática.
- 12) A simple vista, se detectó el resultado como manchas de color pardo obscuro en el sitio donde se colocó el suero con anticuerpos.

c) REGISTRO DE RESULTADOS

Los resultados se detectaron visualmente y se registraron como Título Codificado (TC) y Unidades Arbitrarias de Color (UAC'S). En el primer caso, se hizo una transformación logarítmica (\log_2) de las diluciones como se indicó antes (ver Método de ELISA) y en el segundo, se tomó en cuenta tanto la intensidad del color como el tamaño de las zonas de reacción de cada dilución para hacer un registro por cruces. Cada cruz recibió un valor arbitrario de 25 unidades, excepto cuando el resultado fue \pm , donde el valor fue de 5. La suma de todos estos valores, fue lo que integró las UAC's.

VI. EVALUACION SEROLOGICA. (Voller y DeSavigny, 1981; Morrow, 1981; Méndez et al., 1984).

Para determinar la utilidad de TIA-ELISA para el serodiagnóstico de la cisticercosis, se realizó una evaluación serológica siguiendo los procedimientos indicados por Morrow (1981) y Méndez et al., (1984). Esta evaluación se realizó con los resultados obtenidos con: a) 69 sueros de individuos normales, sin ninguna sintomatología atribuible a cisticercosis; b) 29 sueros de pacientes con diversos tipos clínicos de cisticercosis, diagnosticados ya sea por Tomografía Axial Computarizada, por cirugía o por serología positiva en ELISA (Larralde et al., 1986), y c) con 19 sueros de individuos infectados con helmintos, hongos y protozoos como se indica en la Tabla II.

Los parámetros evaluados fueron: sensibilidad, especificidad, valor predictivo tanto para un resultado positivo como para un negativo en la prueba, eficiencia y por último, reactividad cruzada (Cuadro 2).

Estos parámetros se definen como sigue:

a) **SENSIBILIDAD:** Proporción de sueros de individuos que tienen la enfermedad y que fueron positivos a la prueba. Se calculó dividiendo el número de sueros de individuos cisticercosos positivos a la prueba, entre el número total de sueros de cisticercosos analizados y el resultado se multiplicó por 100.

CUADRO 2.
REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA EVALUACION
DIAGNOSTICA DE UNA PRUEBA SEROLOGICA
PARA LA CISTICERCOSIS HUMANA.

CISTICERCOSIS	RESULTADOS DE LA PRUEBA SEROLOGICA		
	POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
SI	a	b	e
NO	c	d	f
TOTAL	g	h	i

SENSIBILIDAD: $a + e \times 100$

ESPECIFICIDAD: $d + f \times 100$

VALOR PREDICTIVO

POSITIVO: $a + g \times 100$

NEGATIVO: $d + h \times 100$

EFICIENCIA: $a + d + i \times 100$

FALSOS NEGATIVOS: $b + e \times 100$

FALSOS POSITIVOS: $c + f \times 100$

a- Sujetos con la enfermedad positivos a la prueba.

b- Sujetos con la enfermedad negativos a la prueba.

c- Sujetos aparentemente sanos positivos a la prueba.

d- Sujetos aparentemente sanos negativos a la prueba.

e- Total de individuos enfermos estudiados.

f- Total de sujetos estudiados aparentemente sanos y sin la enfermedad.

g- Total de sujetos seropositivos a la prueba.

h- Total de individuos seronegativos a la prueba.

i- Total de individuos estudiados.

b) **ESPECIFICIDAD:** Entendido como la proporción de sueros de individuos aparentemente sanos que **NO** tienen la enfermedad y que fueron negativos a la prueba. Esta proporción se obtuvo al dividir el número de sueros de los sujetos aparentemente sanos y sin síntomas sugerentes de cisticercosis que resultaron seronegativos, entre el total de sueros estudiados de estos individuos, multiplicando el resultado por 100.

c) **VALOR PREDICTIVO:** Este parámetro tiene dos acepciones: 1) para un resultado positivo en la prueba y 2) para un resultado negativo. Para el primer caso, el concepto debe entenderse como el grado de confiabilidad (expresado en por ciento) que debe tener un resultado positivo y se calculó

al dividir el número de sueros de individuos que tienen la enfermedad y que fueron positivos en la prueba, entre el número total de seropositivos, multiplicando el resultado por 100. En el segundo caso, se debe entender como el grado de confiabilidad que debe atribuirse a un resultado negativo en la prueba. El cálculo se hizo dividiendo el número de sueros de individuos normales, no cisticercosos y que fueron negativos a la prueba, entre el total de seronegativos y multiplicando el resultado por 100.

d) EFICIENCIA: La eficiencia del ensayo, entendida como la capacidad de la prueba para identificar tanto el suero de un individuo que tiene la enfermedad como al del que no la tiene y que está aparentemente sano, se calculó sumando el número de sueros de pacientes cisticercosos positivos a la prueba, mas el número de sueros de individuos normales, aparentemente sanos y que fueron negativos a la prueba (verdaderos positivos y negativos respectivamente), dividiendo éste resultado entre el número total de sueros estudiados (con y sin la enfermedad) y multiplicándolo por 100.

e) REACTIVIDAD CRUZADA: Este parámetro serológico es la proporción de sueros de sujetos que tienen otras enfermedades distintas a la que se está estudiando, en este caso cisticercosis, y que fueron positivos a la prueba.

VII. ANALISIS ESTADISTICO.

Debido a que las diluciones de los sueros son una progresión geométrica, para obtener la media aritmética, cada una de las diluciones fue transformada calculando su logaritmo base 2 para obtener el Título Codificado (TC). Con estos valores, se procedió a calcular los valores estadísticos fundamentales (Media, desviación estándar y error estándar) siguiendo los procedimientos usuales (Downie y Heath, 1971).

Para determinar visualmente las diferencias obtenidas entre grupos de sueros, se siguió el método gráfico descrito por Dice y Leraas (1936). Para esto, además de los datos estadísticos fundamentales ya indicados, se obtuvo también la media mas o menos una desviación estándar y la media mas o menos dos veces el error estándar, así como los valores mínimo y máximo de cada grupo. En este método gráfico, si las áreas correspondientes a la media mas dos veces el error estándar se entrecruzan, entonces las diferencias no son estadísticamente significativas; lo contrario ocurre cuando se observa que estas areas no se entrecruzan.

RESULTADOS.

Los resultados se presentarán en cuatro secciones: 1) Resultados preliminares; 2) Estandarización del ensayo; 3) Utilidad de TIA-ELISA en otros sistemas antígeno-anticuerpo y 4) Aplicación de la prueba en la cisticercosis.

1) Resultados preliminares. En la Figura 3, se presenta una imagen típica de la prueba de TIA-ELISA inmediatamente después de finalizar el experimento.

De esta figura, resaltan los siguientes aspectos: 1) Las zonas de reacción son mas o menos circulares y perfectamente definidas con respecto al medio circundante; 2) La intensidad del color y diámetro de la zona de reacción es igual para las primeras diluciones (1:100 a 1:800, posiciones 10-7; 17-14; 41-40; 48-47) y va disminuyendo conforme se aumenta la dilución (1:1,600 y 1:3,200, posiciones 6-5; 13-12; 38-36; 45-43); 3) El tamaño y definición de las zonas de reacción no es uniforme en todas las diluciones y, por último, 4) Los sueros que no tienen anticuerpos son fácilmente identificables, ya que no se forman manchas de color en el sitio donde se colocaron las diluciones del mismo (posiciones 25-20; 33-28). Por otro lado, en algunas placas aparecieron también manchas amorfas en zonas ajenas a los sitios de colocación de las muestras. Para estandarizar la prueba de TIA-ELISA, se analizaron cuatro variables de la fase fisicoquímica y tres de la fase inmunológica, pero ninguna de la fase bioquímica. Excepto cuando la variable por

analizar fue la concentración de antígeno, el tipo de amortiguador, la temperatura ó el tiempo de incubación, en todos los experimentos de estandarización, el antígeno se utilizó a una concentración de 50 ug diluido en 10 ml en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato, a temperatura ambiente durante 2 h con agitación constante. Asimismo, se utilizaron dos sueros de ratón anti-BSA, uno con títulos altos (Suero 11) y otro con títulos medios (Suero 9), ambos determinados previamente en ELISA.

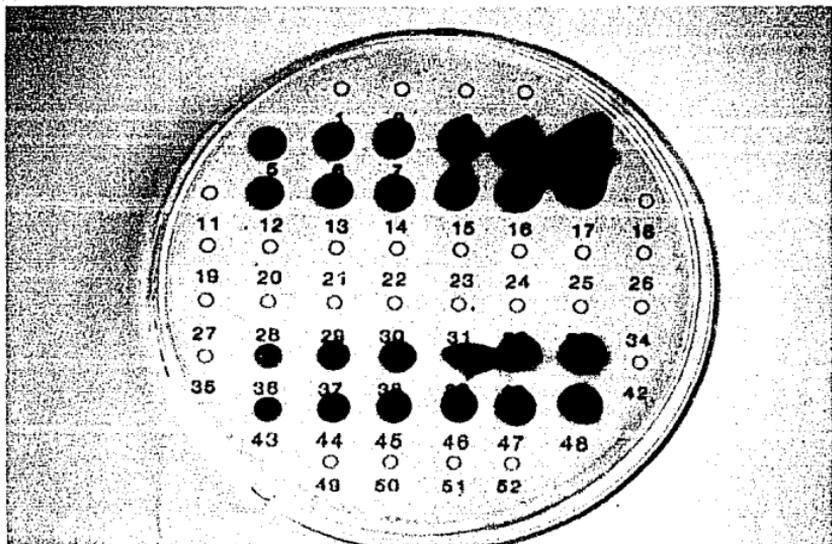


Figura 3. Imagen representativa de la prueba de TIA-ELISA, que ilustra también el patrón de colocación de las muestras. En todos los casos, las diluciones fueron desde 1:100 hasta 1:3,200 y los números indican la posición de cada muestra por duplicado. 10-5 y 17-12 suero de altos títulos; 41-36 y 48-43 suero de títulos medios y 25-20, 33-28 suero normal negativo. Nótese las variaciones en intensidad del color, el tamaño y las zonas amorfas, que no interfieren en la lectura del resultado.

2) Estandarización del ensayo con un antígeno puro (BSA).

Cuando se utilizó el amortiguador de carbonato-bicarbonato para el pegado del antígeno (Figura 4 A), el suero de ratón con títulos altos anti-BSA, presentó mayores Unidades Arbitrarias de Color (UAC's) que en las placas donde se empleó PBS ó solución salina, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además en las placas con el antígeno diluido en amortiguador de carbonatobicarbonato, no se observaron las manchas inespecíficas que aparecieron en las que se utilizaron los otros amortiguadores y en ningún caso, estas manchas interfirieron en la lectura de los resultados. Por lo tanto, el amortiguador mas apropiado para diluir la BSA, fue el de carbonato-bicarbonato de sodio 64 mM, pH 9.5.

La prueba de TIA-ELISA resultó positiva a concentraciones tan bajas de el antígeno como de 13 ng/ml (Figura 4B). Las UAC's de los dos antisueros a esta concentración de antígeno, fueron prácticamente iguales, lo cual no ocurrió a 50 μ g/ml. Con el suero de títulos medios, la diferencia entre ambas concentraciones fue de 250 UAC's, mientras que con el suero de títulos altos, las diferencias fueron de 480 UAC's (Figura 4B), lo que sugiere una relación entre concentración de anticuerpos y la intensidad de color en las zonas de reacción. Por otro lado, hay un incremento paulatino en UAC's hasta los 5 μ g/ml, el cual se detiene a 50 μ g/ml. Bajo estas condiciones, la concentración óptima del antígeno en TIA-ELISA, ensayada en el sistema de BSA-anti-BSA es de 5 μ g/ml.

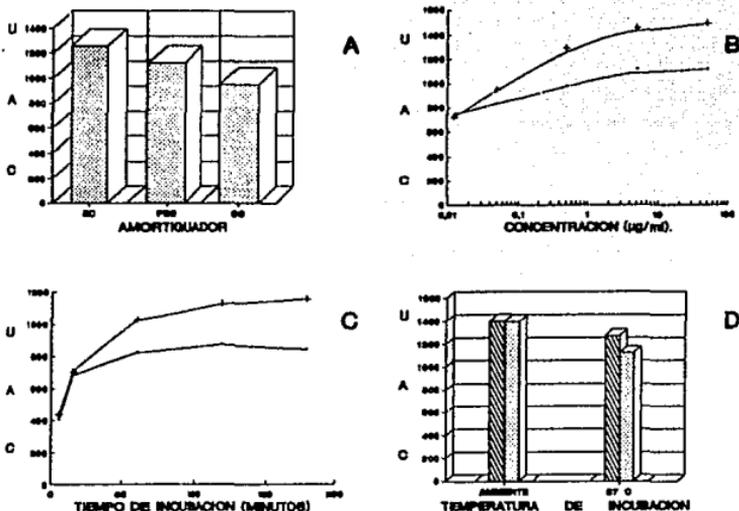


Figura. 4 Estandarización de TIA-ELISA en su fase fisicoquímica usando albumina sérica bovina como antígeno y sueros de ratón anti-BSA. (|) y (+) Suero 9, título en ELISA 1:327,680; (||||) y (*) Suero 11, título en ELISA 1:40,960. BC= Amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 64 mM, pH 9.6; PBS= Amortiguador salino de fosfatos 150 mM pH 7.2; SS= Solución salina 135 mM pH 6.8. A= Amortiguador diluyente del antígeno; B= Concentración del antígeno; C= Tiempo de incubación y D= Temperatura de incubación. UAC= Unidades Arbitrarias de Color.

El antígeno se adhiere rápidamente y en cantidades suficientes a la superficie plástica como para tener resultados identificables a los 5 min; sin embargo, las UAC's registradas son bajas comparadas con las obtenidas después de 2 o 3 h de incubación, donde son mas altas y estables (Figura 4C). Se observa que después de 60 min y hasta las 180 min de incubación el suero de altos títulos produjo UAC's claramente diferenciables con respecto al de títulos medios. Estos re-

sultados señalan que en TIA-ELISA, el tiempo óptimo de incubación de la BSA diluida en amortiguador de carbonato-bicarbonato, es de 120 min y nuevamente sugieren una relación entre la concentración de anticuerpos y la intensidad del color formado. Por último, la incubación a temperatura ambiente, dá mejores o iguales resultados con ambos antisueros que cuando se incuba a 37° C (Figura 4D).

En conclusión, a excepción del amortiguador y de la agitación constante de la solución durante el pegado del antígeno, las condiciones óptimas de la fase fisicoquímica de TIA-ELISA, resultaron similares a las de DIG-ELISA, y su representación esquemática, y sus pasos técnicos finales, se presenta en la Figura 5.

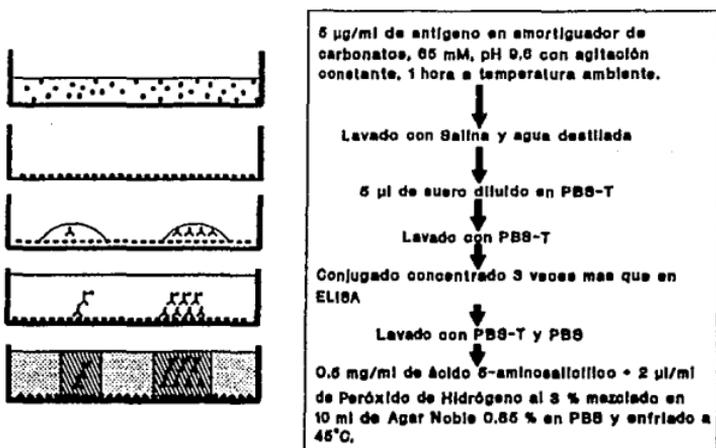


Figura 5. Representación esquemática del desarrollo final de la prueba de TIA-ELISA. En el recuadro, se anota la secuencia y características finales de cada paso técnico.

Para eliminar la posibilidad de que el color desarrollado en las zonas de reacción pudiera deberse a un pegado inespecífico de las gamaglobulinas ó a la actividad de las peroxidases naturales presentes especialmente en los sueros hemolizados, se determinó la influencia del diluyente del antisuero en la especificidad del ensayo (ver Material y Métodos). Los resultados de estos experimentos, se ilustran en la Figura 6.

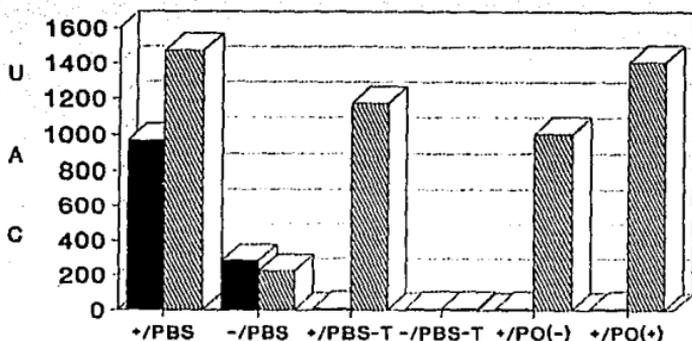


Figura 6. Efecto del diluyente del antisuero en la prueba de TIA-ELISA. Se utilizaron cajas incubadas previamente con amortiguador de carbonato-bicarbonato 64 mM pH 9.6 (BC) solo (■) ó con 5 µg/ml de albúmina sérica bovina. (▨). Los sueros con anticuerpos específicos (+) o normales (-), fueron diluidos en PBS, PBS-T ó con suero de ratón normal hemolizado, adicionado con azida de sodio 15 mM (PO⁺) ó con solución salina 135 mM, pH 6.8 (PO⁻). En las ordenadas, se anotan las Unidades Arbitrarias de Color (UAC).

Con PBS solo, la gamaglobulina de los sueros inmunes (+)

y la de los normales (-), se pegó de forma inespecifica tanto en las placas con 5 μ g de antígeno, como en aquellas que contenían únicamente amortiguador carbonato-bicarbonato, siendo los valores del suero inmune mas altos que los del normal. Cuando al PBS se le agregó Tween-20 a una concentración final de 0.05 %, solo se observaron zonas coloreadas especificas con el suero inmune en las placas con antígeno, lo que no se presentó en los sueros de ratón normal en ninguna de las placas. Por último, cuando el suero inmune se diluyó con suero hemolizado de ratón normal, ya sea adicionado o no con azida de sodio, se observaron resultados positivos únicamente en las placas sensibilizadas con antígeno y las UAC's estuvieron dentro del intervalo obtenido con el suero diluido con PBS-T.

Para determinar la sensibilidad molecular de TIA-ELISA (titulación del primer anticuerpo), además de utilizar los sueros de ratón anti-BSA de títulos altos y medios, el conjugado se usó diluido 1:500. La curva obtenida al graficar las UAC's de estos sueros contra sus títulos codificados, se presenta en la Figura 7 A.

La intensidad del color de las zonas de reacción en TIA-ELISA, se mantiene igual hasta un título codificado de 6 (1:160) para ambos sueros. A partir de este punto, los sueros se separan una dilución, que permanece constante hasta el título codificado de 10 (1:2,560) y la diferencia se incrementa en un título a diluciones mayores.

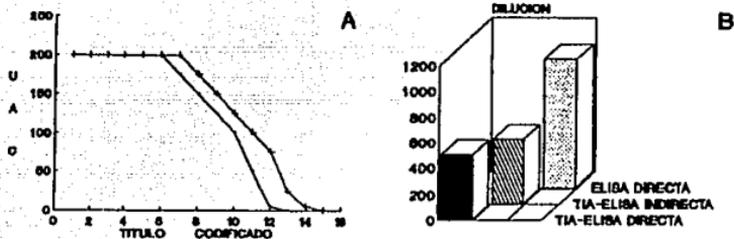


Figura 7. Resultados de la estandarización de la Fase Inmunológica de la prueba de TIA-ELISA. A) Titulación de anticuerpos. Se usaron dos sueros anti-BSA, uno de títulos altos (+) y otro de títulos medios (+), demostrados previamente en ELISA. B) Titulación de conjugado en TIA-ELISA directa (■), TIA-ELISA indirecta (▨) y ELISA directa (▩). El conjugado utilizado, fue un anticuerpo de cabra anti-gamaglobulina de ratón.

Resultados similares se obtuvieron al analizar en ELISA los mismos sueros y a la misma concentración de antígeno (5 µg/ml), excepto que los puntos de cambio en la curva son tres títulos más que lo observado en TIA-ELISA (Datos no mostrados).

Para determinar la dilución óptima del conjugado en la prueba de TIA-ELISA, los experimentos se realizaron siguiendo el método directo y el indirecto (ver Material y Método). En ambos casos, los resultados fueron idénticos, dando una dilución óptima de 1:600, que es más de la mitad de la mejor

dilución obtenida en ELISA (1:1000) (Figura 7B). Por otro lado, y debido a que posteriormente la prueba de TIA-ELISA se utilizaría con sueros de conejo o de humanos como fuente del primer anticuerpo, también se titularon los conjugados anti-gamaglobulina homólogos siguiendo estos mismos lineamientos. En la Tabla V se presentan los resultados de estas titulaciones. En términos generales, al igual que lo observado en la titulación del primer anticuerpo, la dilución óptima de estos conjugados, fue inferior a la obtenida en ELISA (1:1000).

TABLA V.
RESULTADOS DE LA TITULACION DE CONJUGADOS
EN LA PRUEBA DE TIA-ELISA.

CONJUGADO ANTI-GAMA DE	TITULO EN ELISA	M E T DIRECTO	O D O INDIRECTO
CONEJO	1:1,000	1:250	1:250
HUMANO	1:800	1:100	1:100

3) Factibilidad de TIA-ELISA con antígenos simples o semipurificados. Una vez determinado que TIA-ELISA funcionaba con un antígeno protéico razonablemente puro (BSA), se determinó su factibilidad al aplicarse con otros antígenos más complejos molecularmente (extractos semipurificados de helmintos o protozoarios) o con otros cuyos componente principal eran carbohidratos (extractos de hongos) (Tabla VI).

TABLE VI.
RELACION DEL TIPO Y CONCENTRACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS (HEXOSAS) DE 11 ANTIGENOS ANALIZADOS EN TIA-ELISA.

Antigeno elaborado de	Tipo	Concentración (mg/ml)	
		Proteinas	Carbohidratos
<i>Sporothrix schenckii</i>	Purificado	1.08	9.06
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Purificado	4.22	6.30
<i>Coccidioides immitis</i>	Purificado	1.54	10.48
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Exoantigeno	3.42	---
<i>Plasmodium berghei yoelii</i>	Exoantigeno	0.53	---
<i>Plasmodium vivax</i>	Crudo	7.86	---
<i>Fasciola hepatica</i>	Crudo deslip.	3.74	---
<i>Taenia solium</i> (larva)	Fluido vesic.	4.86	1.89
<i>Ascaris l. suum</i>	Crudo deslip.	1.79	---
<i>Toxocara canis</i>	Crudo deslip.	2.53	---
<i>Trichinella spiralis</i>	Crudo deslip.	1.95	---

* No hecho.

Estos se realizaron con un número reducido de sueros homólogos provenientes de la infección natural en humanos o ratones, o de la inmunización artificial de conejos (Tabla II). Los resultados, expresados como títulos codificados (TC), y se anotan en las Tablas VII y VIII.

TABLE VII.
UTILIDAD DE LA PRUEBA DE TIA-ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS SERICOS DE HUMANOS CONTRA ANTIGENOS DE HONGOS, PROTOZOARIOS Y HELMINTOS.

SUROS DE HUMANOS INFECTADOS CON:	N	TITULO CODIFICADO (media)
<i>Sporothrix schenckii</i>	2	5
<i>Histoplasma capsulatum</i>	3	4
<i>Coccidioides immitis</i>	3	4
<i>Trypanosoma cruzi</i>	8*	0
<i>Fasciola hepatica</i>	1	5
<i>Ascaris lumbricoides suum</i>	2	7
<i>Toxocara canis</i>	4	5
<i>Trichinella spiralis</i>	3	6
Normal	10	0

* Todos estos sueros tenian títulos $\geq 1:100$ en ELISA.

TABLA VIII

UTILIDAD DE TIA-ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS SERICOS DE CONEJO INOCULADOS CON ANTIGENOS DE HONGOS Y HELMINTOS.

SUROS DE CONEJOS INOCULADOS CON ANTIGENOS DE:	N	TITULO CODIFICADO (media)
<i>Sporothrix schenckii</i>	1	3
<i>Fasciola hepatica</i>	1	6
<i>Ascaris lumbricoides suum</i>	1	7
<i>Toxocara canis</i>	1	4
<i>Trichinella spiralis</i>	3	7
<i>Taenia solium</i> (larva)	1	6
Normal	2	0

Como se puede apreciar, TIA-ELISA fue positiva en todos los sistemas ensayados, con la notable excepción del modelo de *Trypanosoma cruzi*, en el cuál el resultado fue consistentemente negativo, a pesar de que se probaron diferentes concentraciones del antígeno adicionado a la placa (3, 10 y 50 µg/ml), se cambiara el amortiguador diluyente del antígeno (carbonato-bicarbonato, PBS ó solución salina) o la dilución del conjugado (1:800; 1:400; 1:200; 1:100 y 1:50).

Estos resultados son mas intrigantes aún si se considera que en la prueba de ELISA, todos estos sueros mostraron anticuerpos a títulos superiores a 1:100.

Por otro lado, y al igual que con el sistema de BSA-anti-BSA, en algunas placas se observaron manchas amorfas fuera de los sitios esperados de reacción. Por tal motivo, los tres antígenos de hongos así como los de *Fasciola hepatica* y *Ascaris lumbricoides suum*, se analizaron con los tres amortiguadores utilizados antes para diluir el antígeno para la

sensibilización de las placas.

Los resultados de estos experimentos, se presentan resumidos en la Figura 8.

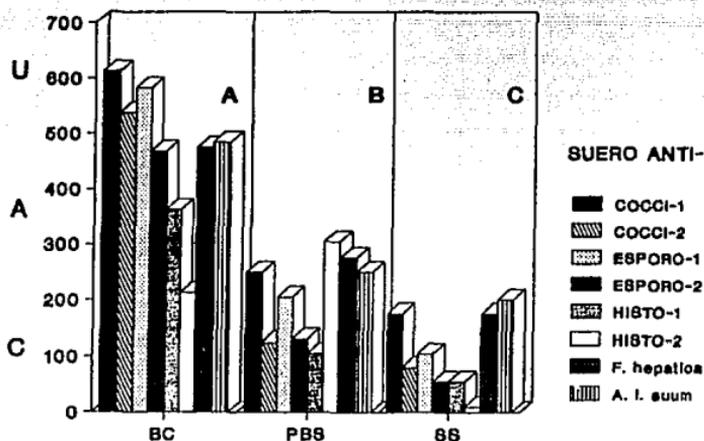


Figura 8. Resultados de la prueba de TIA-ELISA con varios sistemas antígeno-anticuerpo homólogos, expresados como Unidades Arbitrarias de Color (UAC). Cada panel representa el promedio de cada sistema analizado en el que el antígeno se diluyó con Amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 64 mM pH 9.6 (A); Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 150 mM pH 7.2 (B); y Solución salina 135 mM pH 6.8 (SS).

En la mayoría de los casos, la intensidad de la respuesta varía con la naturaleza del amortiguador empleado. En general, los resultados fueron mas altos cuando los antígenos se diluyeron con amortiguador de carbonato-bicarbonato, sin importar el grado de pureza o su naturaleza química, señalando que la prueba de TIA-ELISA funciona para detectar anti-

cuerpos ya sea en el suero de humanos o en el de animales infectados naturalmente o inoculados artificialmente con antígenos de diversa naturaleza y composición.

4) Factibilidad de TIA-ELISA en la cisticercosis. Una vez demostrado que TIA-ELISA funcionaba con casi cualquier antígeno, incluyendo el FV de cisticercos de *T. solium*, independientemente de su grado de pureza y que la reactividad y limpieza de la prueba, depende del amortiguador utilizado para el pegado del antígeno, fue necesario determinar las condiciones óptimas para el FV. Estos experimentos se realizaron con una mezcla de 10 sueros de cisticercosos positivos en ELISA y una de 10 individuos normales. De esta manera, las condiciones óptimas fueron: a) 3.4 µg/ml de FV diluido en PBS; b) Los sueros diluidos al doble con PBS-T, partiendo de 1:30, ya que a diluciones menores, la inespecificidad del ensayo resultó inaceptable y por último, c) El conjugado diluido 1:100 con PBS-T, el resto del procedimiento quedó igual. De esta manera, se analizaron en TIA-ELISA un total de 117 sueros, de los cuales, 69 pertenecieron a individuos normales, en los que no se detectó ningún dato sugerente de cisticercosis; 29 a pacientes con neurocisticercosis confirmada, ya sea por serología, TAC o por cirugía y por último, 19 muestras provinieron de sujetos infectados con otras parasitosis o micosis, estos últimos para determinar la reactividad cruzada de la prueba. Para efectos de comparación, los mismos sueros y antígeno se analizaron en ELISA, pero los

sueros se diluyeron 8 veces al doble con PBS-T, iniciando con 1:240, el conjugado se usó diluido 1:800 en PBS-T y el sustrato de la enzima, fue OFD con peroxido de hidrógeno al 3 %, ambos disueltos en solución amortiguadora de fosfato-citrato. Con los títulos codificados obtenidos de estos grupos, se hizo una distribución de frecuencias y los histogramas resultantes se presentan en la Figura 9.

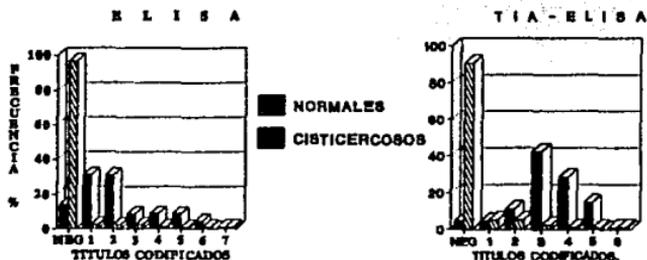


Figura 9. Distribución de frecuencias de los títulos codificados obtenidos en ELISA y TIA-ELISA con 69 sueros de individuos aparentemente sanos y de 29 de individuos cisticercosos analizados con el fluido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*.

En TIA-ELISA, el 90 % de los sueros normales fueron negativos, mientras que el resto se distribuyó entre los títulos codificados 1 y 3 dando una proporción de falsos positivos del orden del 10 %. Por el contrario, solo uno (3 %) de los sueros de pacientes cisticercosos fue falso negativo y 28 (97 %) fueron positivos, mostrando una tendencia a una distribución unimodal y mas normal que los anteriores, con

una máxima frecuencia entre TC 3 y 5. En ELISA, los sueros de individuos normales, mostraron una distribución diferente a la de TIA-ELISA y solo tres sueros de este grupo (4.35 % de falsos positivos) reaccionaron a títulos codificados de 1, 2 y 3, uno en cada dilución. Por el contrario, 25/29 (86. %) de los sueros de cisticercosos, fueron positivos, distribuyéndose la mayoría entre los primeros 2 títulos codificados y solo el 14 % fueron negativos, lo que representa la proporción de falsos negativos.

De acuerdo con estos resultados, fue necesario determinar el umbral de positividad serológica para ambas pruebas. Para ello, se calculó la media y la desviación estándar de los títulos codificados obtenidos con los sueros de individuos normales. A la media se le sumó dos veces el valor de la desviación estándar para tener un 95 % de nivel de confianza estadística en la determinación. Así, tanto para TIA-ELISA como para ELISA, se obtuvo el título codificado de 1 que se consideró como el umbral de positividad.

Para apreciar la dispersión que presentaron los títulos codificados obtenidos en las dos pruebas, se construyeron sendas gráficas donde con una línea, se indica el umbral de positividad y con puntos, los títulos codificados obtenidos con cada suero, tanto de individuos normales como de infectados (Figura 10).

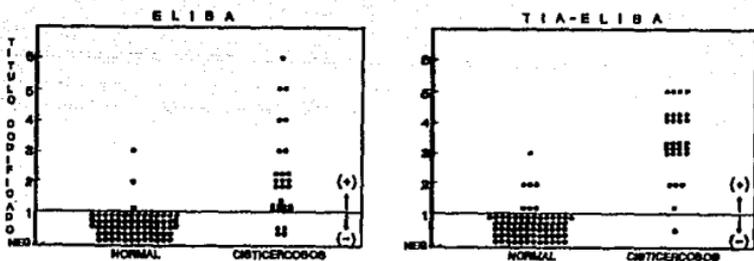


Figura 10. Comparación de los títulos codificados que se registraron en las pruebas de ELISA y TIA-ELISA. El umbral de positividad, representado por la línea horizontal, divide la población de sueros positivos (+) y negativos (-) a las pruebas.

En TIA-ELISA, los sueros normales mostraron una dispersión discreta, resultando 62 negativos (90 %) y 7 positivos (10 %), lo que contrasta con la mostrada por los sueros de pacientes con cisticercosis, los cuales tuvieron al menos una muestra representada en cada uno de los títulos codificados analizados y aproximadamente el 69 % de los casos cayó entre los títulos codificados 3 y 4, mientras que solo uno (3 %) fue negativo. En ELISA, la distribución de los sueros normales, fue similar, aunque solo 3 (4 %) fueron positivos, mientras que en el grupo de cisticercosos, la dispersión fue mas amplia y la mayoría se concentró entre los títulos codi-

ficados 1 y 2 y sólo 4 (14 %) fueron negativos.

Para apreciar gráficamente la significancia de las diferencias entre grupos de sueros y entre las pruebas, con los datos estadísticos fundamentales calculados (media, desviación estándar y error estándar) y los valores máximos y mínimos de cada grupo, se construyó una gráfica de acuerdo con el método de Dice y Leraas (1936). Los resultados se presentan en la Figura 11.

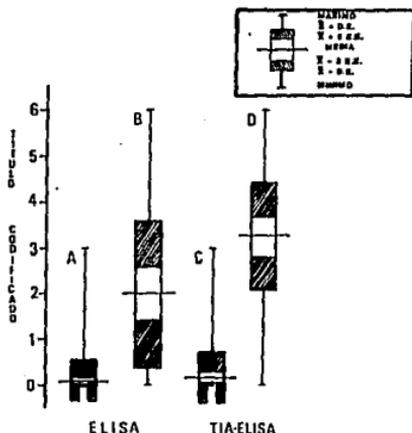


Figura 11. Diagrama de los datos estadísticos fundamentales calculados a partir de los títulos codificados obtenidos con las pruebas de ELISA y TIA-ELISA para en la detección de anticuerpos séricos en sueros de individuos normales (A y C) y cisticercosos (B y D), presentado de acuerdo con el método gráfico de Dice y Leraas (1936). En el recuadro, se anota la simbología.

Tanto en ELISA como en TIA-ELISA, la media de los títulos codificados obtenidos con los sueros de personas aparentemente sanas (A= 0.09 y C= 0.17) son diferentes a las de los

cisticercosos (B= 1.97 y D= 3.71).

De acuerdo con este método, si las áreas correspondientes a la media mas o menos dos veces el error estándar de los grupos se llegaran a entrecruzar, entonces las diferencias entre ellos, carecen de significancia estadística y lo contrario sucede si no lo hacen. De esta manera, fácilmente se puede apreciar que los resultados obtenidos en ELISA y TIA-ELISA con los sueros normales y cisticercosos (A vs B y C vs D respectivamente), son diferentes y estas diferencias son por lo tanto, estadísticamente significativas.

Por otro lado, también se puede apreciar que la reactividad serológica de TIA-ELISA, en términos de títulos codificados, es significativamente mayor que la obtenida en ELISA al comparar las figuras de los grupos B y D, pero que la especificidad de ambas pruebas es muy semejante (A vs C).

La evaluación serológica de las pruebas de TIA-ELISA y ELISA se presenta en forma comparativa en la Tabla IX.

TIA-ELISA mostró una mayor sensibilidad que ELISA (96.85 vs 86.20 %) pero menor especificidad (89.85 vs 95.65 %) y ambas pruebas tuvieron una eficiencia similar, poca diferencia en el valor predictivo para un resultado negativo y ambas pruebas presentaron nula reactividad cruzada con los antisueros señalados en la Tabla II. Esta información sugiere que TIA-ELISA es una prueba serodiagnóstica útil en la cisticercosis y comparable a la ELISA tradicional.

TABLA IX

RESULTADOS DE LA EVALUACION SEROLOGICA COMPARATIVA
DE DOS PRUEBAS INMUNOENZIMATICAS PARA EL
SERODIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS.

PARAMETRO	TIA-ELISA	ELISA
	(%)	(%)
SENSIBILIDAD	96.55	86.20
ESPECIFICIDAD	89.85	95.65
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	80.00	89.28
NEGATIVO	98.41	94.28
EFICIENCIA	91.83	92.85
REACTIVIDAD CRUZADA	0.00	0.00

Para determinar qué tanta semejanza existe entre las dos pruebas, se realizó un análisis de regresión lineal de los títulos codificados (Figura 12).

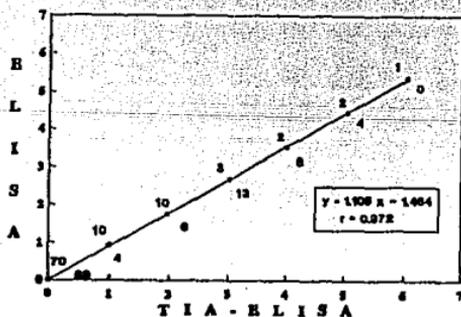


Figura 12. Correlación lineal de los títulos codificados obtenidos en ELISA y TIA-ELISA con 98 muestras de suero analizadas con el fluido vesicular de cisticercos. Los números representan el total de sueros con ese título en cada prueba. En el recuadro, se anota la ecuación de la recta resultante y el valor del coeficiente de correlación.

El coeficiente de correlación $r = 0.97$, indica una estrecha relación entre los resultados de ambas pruebas. Es evidente que a títulos codificados menores o iguales a 2, hay mas casos en ELISA que en TIA-ELISA y lo contrario sucede a títulos codificados mayores. Sin embargo, estos resultados son mas aparentes que reales, ya que en ELISA, la primera dilución fue 1:240, que representa tres diluciones más que la inicial usada en TIA-ELISA (1:30).

Por otro lado, 92 de los 98 sueros analizados, fueron positivos o negativos en cualquiera de las dos pruebas, lo que indica una concordancia del 93.9 % y una discrepancia en los resultados del orden del 6 % (Tabla X).

TABLA X
CONCORDANCIAS Y DISCREPANCIAS ENTRE TIA-ELISA Y
ELISA EN LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA
EL FLUIDO VESICULAR DE CISTICERCOS.

TIA-ELISA	ELISA	N	CONCORDANCIA
+	+	28	93.9 %
-	-	64	
+	-	5	DISCREPANCIA
-	+	1	6.1 %

Dentro de las discrepancias, 5 sueros normales que fueron positivos a TIA-ELISA, fueron negativos en ELISA, mientras que sólo un suero de los cisticercosos, fue negativo a la

primera pero positivo en la segunda. El análisis caustístico de estas discrepancias, se presenta en la Figura 13.

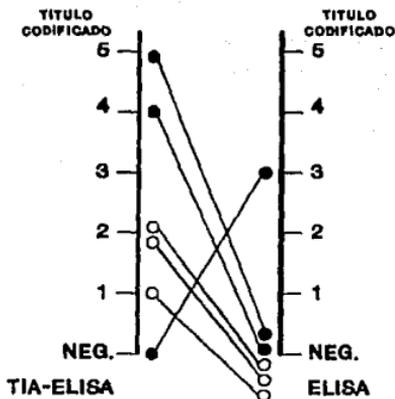


Figura 13. Análisis detallado de las discrepancias que se observaron en los resultados obtenidos con 3 sueros de individuos normales (O) y 3 de pacientes con cisticercosis (●) en las pruebas de ELISA y TIA-ELISA.

Como se puede observar, 3 muestras de sujetos normales, que no presentaron ningún dato clínico sugestivo de cisticercosis, tuvieron anticuerpos detectables a títulos codificados bajos (1 y 2) en TIA-ELISA pero no en ELISA, y dos cisticercosis negativos en esta última, mostraron altos títulos en TIA-ELISA. Por último, sólo el suero de un cisticercosis que fue negativo en TIA-ELISA por el contrario, dió un título codificado de 3 en ELISA. El análisis de este subgrupo

sugiere por un lado, que TIA-ELISA puede ser mas sensible o reactiva que la prueba de ELISA y por otro, que es menos especifica y reactiva para la detección de anticuerpos séricos en la cisticercosis.

Finalmente, y como se observó en la estandarización de la prueba, hay una correlación entre la media de los títulos codificados y las UAC's obtenidas con los sueros de pacientes con neurocisticercosis (Figura 14), lo que confirma que es indistinto utilizar uno u otro para registrar los resultados.

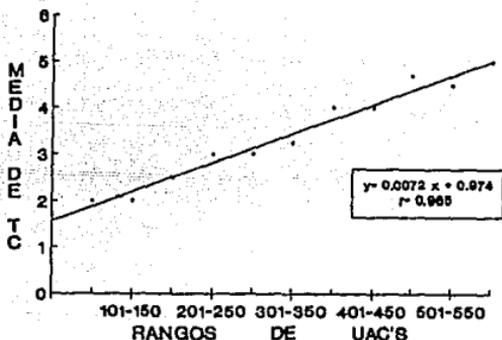


Figura 14. Análisis de correlación lineal entre la media de los Títulos Codificados (TC) y Rangos de Unidades Arbitrarias de Color (UAC's) obtenidas con 29 sueros de pacientes cisticercosos en la prueba de TIA-ELISA. La ecuación de la recta se anota en el recuadro.

DISCUSION

En este trabajo, se desarrolló, estandarizó y aplicó una prueba serológica del tipo inmunoenzimático llamada TIA-ELISA para detectar anticuerpos en el suero de pacientes con neurocisticercosis, con algunas micosis como esporotricosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis o con otras parasitosis (trpanosomiasis americana, malaria, fasciolosis, ascariasis, toxocariasis visceral y triquinosis) o bien, de animales de laboratorio hiperinmunizados con extractos preparados de los agentes etiológicos de esas enfermedades. La prueba funcionó con los antígenos descritos en la Tabla I, no obstante sus diferencias en origen y grado de pureza, las que variaron desde lo razonablemente puro, representado por la fracción V de la albúmina sérica bovina (proteína) y extractos semipurificados de hongos (*Sporothrix shenckii*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*), ricos en carbohidratos, hasta extractos crudos de helmintos (*Fasciola hepatica*, *Ascaris lumbricoides suum*, *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis*), cuya composición química estuvo integrada por proteínas, carbohidratos y posiblemente otros compuestos.

El principio de esta prueba se fundamenta en la propiedad que tienen la mayoría de las proteínas, al ser diluidas en un amortiguador, de pegarse a superficies plásticas por fuerzas físicas débiles no bien definidas en su naturaleza (Lehtonen y Viljanen, 1981). Al adherirse, las moléculas proteicas, sin perder su estructura globular, dejan expuestos epitopos

que pueden ser reconocidos por anticuerpos que se añaden al sistema (Elwing et al., 1976, 1977). Al complejo antígeno-anticuerpo así formado, se le puede unir a su vez, un segundo anticuerpo antigamaglobulina específica, conjugado con una enzima (peroxidasa). La presencia del complejo trimolecular (antígeno-anticuerpo-conjugado), se revela agregando el sustrato de la enzima, cambiando de color por la actividad enzimática. Hasta aquí, el principio es idéntico al de la prueba de ELISA cuando el sustrato y el donador de hidrógeno se agregan en solución (Voller et al., 1979). Por el contrario, en el ensayo que aquí se describe, estos últimos reactivos se añaden mezclados en un gel, en el cuál, se lleva al cabo la reacción enzimática, pero de manera localizada que se inicia en la interfase y se continua en el seno del gel, pero que está limitada por la propia distribución del conjugado unido al complejo antígeno-anticuerpo primario. En consecuencia, el hecho de que en TIA-ELISA la reacción enzima-sustrato se realice en forma localizada y no libremente en toda la capa de gel afectando a todo el sustrato como ocurre en ELISA, es lo que establece la principal diferencia entre ambas pruebas; esta diferencia también es válida para la prueba de DIG-ELISA, la que de hecho, es el antecedente directo del ensayo que aquí se describe (Elwing y Nygren, 1979; Elwing et al., 1980; Gómez-Priego et al., 1982¹, 1985).

1. Gómez-Priego, A., Paniagua-Solis, J.F., Rivas-Alcala, A.R. y Ruenes-Meza, M.T. (1982). TIA-ELISA en oncocercosis. Resultados preliminares. Memorias del V Congreso Nacional de Parasitología. Puebla, Puebla. México.

De los resultados de la estandarización de la fase fisicoquímica, llama la atención que por una parte, TIA-ELISA puede detectar anticuerpos aún con una concentración de antígeno tan baja como 13 ng/ml y por otra, la rapidez con la que el antígeno se pega al plástico (5 min). En el primer caso, esta sensibilidad molecular está muy cercana a la que se ha indicado para la prueba de ELISA (1-10 ng/ml) (KurstaK, 1985), pero muy lejana a la obtenida en la prueba de DIG-TIA para la esquistosomiasis (100 µg/ml) (Ismail et al., 1979), amibiasis (200 µg/ml) (Nilsson et al., 1980) o en la estandarización de la prueba de DIG-ELISA con un antígeno crudo de *Onchocerca volvulus* (100 µg/ml) (Gómez-Priego et al., 1993¹). Como lo señala KurstaK (1985), estas semejanzas y diferencias podrían estar dadas más por el título de anticuerpos en el suero que por las características del antígeno. En el segundo caso, es decir, la velocidad de adhesión, no está muy claro si a los 5 min es poca la cantidad de antígeno la que se pega o si la unión con la superficie plástica es débil, ya que conforme avanza el tiempo de incubación, la intensidad de la respuesta se incrementa en forma no lineal hasta los 60 min y permanece prácticamente sin cambios hasta las 3 h de incubación. Por otro lado, la unión del antígeno al poliestireno, no es dependiente de temperatura, o al menos el intervalo parece ser muy amplio, ya que los resultados fueron mejores en las placas incubadas a temperatura ambiente, cuyas

1. Gómez-Priego, A., Paniagua-Solis, J.F., Schlié-Guzmán, A. y Ruenez-Meza, M.T. (1993). DIG-ELISA en oncocercosis II. Mejoras de la técnica. Manuscrito en preparación.

variaciones fueron desde los 15°C hasta los 23°C. que los obtenidos en aquellas incubadas a 37°C durante el mismo tiempo (1 h). En cambio, en ELISA se requiere de aproximadamente 18 horas de incubación a 4°C o de 30 min a 37°C, pero con altas concentraciones de antígeno, para obtener los mejores resultados (Kurstak, 1985). De cualquier manera, con base a estos tres factores: concentración de antígeno, tiempo y temperatura de incubación, se puede decir que en comparación con la ELISA tradicional, TIA-ELISA es un ensayo con la misma sensibilidad molecular pero de mayor rapidez (aproximadamente 2 a 3 h).

De las tres soluciones que se han usado comunmente para facilitar el pegado del antígeno a la superficie plástica en otros EIA, concretamente en ELISA y DIG-ELISA (Voller *et al.*, 1979; Elwing y Nygren, 1979; Elwing *et al.*, 1980; Kurstak, 1985; Gómez-Priego *et al.*, 1985; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992), el amortiguador de carbonato-bicarbonato, resultó mejor para pegar el BSA en TIA-ELISA que la solución salina amortiguadora de fosfatos 150 mM, pH 7.2 y que la solución salina 135 mM, pH 6.8, lo que también resultó válido para todos los antígenos analizados, excepto para el de *Trypanosoma cruzi*, que no funcionó con ninguno de los tres amortiguadores y para el FV de cisticercos de *Taenia solium*, que dió los mejores resultados cuando se diluyó en PBS. Esto podría sugerir que el pegado del antígeno al plástico, depende de la combinación de al menos dos factores: a) De las características fisicoquímicas del amortiguador usado para diluir el

antígeno (composición química, molaridad, fuerza iónica ó pH) y b) De la naturaleza intrínseca del antígeno. La combinación apropiada de estos, resultaría en una adhesión tan fuerte del antígeno al plástico como para que al agregar los otros reactantes (anticuerpo y conjugado) y se formara el complejo trimolecular, este quedara razonablemente estable y firmemente inmovilizado al soporte sólido, de manera que al añadir el gel que contiene el sustrato y donador de hidrógeno, la fase bioquímica podría realizarse sin restricciones, pero en forma localizada y en este caso, el ensayo sería positivo. Alternativamente, si la adherencia del antígeno fuera débil y por tanto inestable, el complejo tri-molecular se desprendería desde el primer lavado ó en los subsiguientes, posiblemente debido a que el tamaño del complejo facilitaría el arrastre físico de las soluciones de lavado y en consecuencia, la prueba sería negativa o sería notoria una reducción en la reactividad.

La importancia del amortiguador en la firmeza en la adhesión del antígeno al plástico, también puede reflejarse en la formación de las manchas amorfas de color observadas en varios experimentos. En las placas de BSA diluida en amortiguador de carbonato-bicarbonato ó en aquellas con el fluido vesicular diluido en PBS, sólo ocasionalmente y de manera débil se detectaron estas manchas amorfas, mientras que lo contrario sucedió con el uso de los otros amortiguadores. Además, las manchas no se formaron en toda la placa, sino en zonas muy irregulares y aparentemente distribuidas al azar,

aunque invariablemente, parecían tener su origen en áreas de reacción muy intensas. Esta observación, además de que refuerza la hipótesis de la disociación de complejos antígeno-anticuerpo-conjugado débilmente unidos al plástico, también sugiere que tal vez por exceso de anticuerpo, la interacción primaria del antígeno con su anticuerpo y la secundaria, es decir, la del anticuerpo con el conjugado, probablemente sean débiles y por lo tanto, estos componentes son arrastrados y mezclados en el agar debido a la densidad y la temperatura del agar vertido a la placa. Tales manchas, por tanto, pueden ser consideradas como parte de la coloración de fondo del ensayo. A este respecto, Barlough *et al.*, (1983) informaron que la coloración de fondo que altera la especificidad de ELISA en la detección de anticuerpos contra coronavirus que infectan gatos, se puede eliminar cuando se cambia la solución amortiguadora o el pH, por ejemplo, usando agua desionizada a pH 6.9, y concluyen que dicha coloración no es dependiente de la composición o de la fuerza iónica de la solución amortiguadora, sino del pH. Además, consideran que este factor debe influir sobre los antígenos pH-dependientes de la solución antigénica empleada para sensibilizar la superficie plástica. A pesar de que para confirmar lo anterior, la caracterización fisicoquímica de la mayoría de los antígenos utilizados en el presente trabajo está aún por realizarse, los comentarios de Barlough *et al.*, (1983) podrían aportar una explicación complementaria a la presencia de las manchas amorfas en las placas de TIA-ELISA, las que si bien

no desaparecieron totalmente al cambiar la solución amortiguadora para pegar el antígeno a la superficie plástica, si al menos disminuyeron en intensidad. De cualquier manera, la presencia de estas manchas amorfas no interfieren con la lectura del resultado de la prueba. Por lo anterior, antes de intentar aplicar TIA-ELISA con cualquier antígeno y en ausencia de datos fisicoquímicos específicos del antígeno, primero se deberá precisar por el método del ensayo y error, el amortiguador óptimo para la adhesión del antígeno.

La composición de la solución diluyente del suero, también tiene importancia en el ensayo. El PBS-T impidió que las inmunoglobulinas no específicas de los sueros normales o inmunes se pegaran al antígeno o al plástico, pero no interfirió en el reconocimiento de los epitopos de las moléculas antigénicas adheridas al fondo de la placa por los anticuerpos específicos de los sueros inmunes. La ausencia del Tween-20 en el PBS, por el contrario, resultó en un pegado inespecífico de inmunoglobulinas, observado tanto en las placas sensibilizadas como en las que no tenían antígeno. Esta especificidad de la reacción, debe atribuirse a la propiedad tensoactiva del Tween, que anula la interacción plástico-inmunoglobulina y favorece la unión antígeno-anticuerpo, como sucede en las pruebas de ELISA y DIG-ELISA (Voller *et al.*, 1979, Elwing y Nygren, 1979; Elwing *et al.*, 1980; Gómez-Priego *et al.*, 1985, Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992).

La posibilidad de que la disminución paulatina en la intensidad del color en las zonas de reacción observadas en

TIA-ELISA, pudiera deberse a una simple dilución de anticuerpos junto con todas las proteínas del suero, quedó eliminada con los resultados de los experimentos donde se mantuvo constante la concentración total de proteínas en la muestra, al utilizar suero normal de ratón como diluyente. Además, la adición de azida de sodio para inhibir la actividad de las peroxidases naturales presentes en el suero diluyente (Sparrow y Williams, 1986; Lim, 1988), si bien no modifica la especificidad del ensayo, sí parece influir en su reactividad, ya que la intensidad del color formado por las muestras diluidas en PO^- , fue menor a la observada con las diluidas en PO^+ , aunque tales diferencias no fueron estadísticamente significativas. No obstante esto último, pudiera ser que la concentración de la azida de sodio agregada (15 mM), haya sido insuficiente, lo que sugiere la conveniencia de que, al agregar este reactivo como preservador de los sueros, la concentración final debería ser de al menos, 30-40 mM. De cualquier manera, estos resultados, al lado de la clara diferenciación entre las zonas de reacción y el resto de la placa donde no se colocaron anticuerpos, dejan pocas dudas acerca de la especificidad de la prueba de TIA-ELISA.

Con respecto a la fase bioquímica del ensayo, en DIG-ELISA se han usado conjugados con fosfatasa alcalina (Elwing y Nygren, 1979) o con peroxidasa (Elwing y Nygren, 1979; Elwing et al., 1980; Gómez-Priego et al., 1985; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992). Por otro lado, también se han usado varios donadores de hidrógeno cuando esta última enzima se

emplea como marca en los conjugados (Elwing y Nygren, 1979; Elwing et al., 1980; Gómez-Priego et al., 1985, Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992). El producto de la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina sobre el p-nitrofenilfosfato, es un compuesto amarillento, el que contrasta bien con el medio circundante. Sin embargo, conforme se deja transcurrir el tiempo hasta 1-2 h, se pierde definición en los límites de las zonas de reacción, por lo que es necesario hacer un registro fotográfico inmediatamente después de terminado el experimento (15-20 min). Por el contrario, cuando el sistema enzima-sustrato se cambia a peroxidasa y p-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno como sustrato, no obstante que el producto color pardo contrasta igual que el anterior, resulta más estable y no requiere de prontitud en el registro (Elwing y Nygren, 1979). Con un donador de hidrógeno similar (o-fenilendiamina), el producto naranja-amarillento también mostró los mismos problemas observados con la fosfatasa alcalina (Gómez-Priego et al., 1985). Cuando se utilizó el ácido 5-aminosalicílico (5-AS) como donador de hidrógeno, el producto de la reacción fue de color pardo oscuro y bastante estable (Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992). Es más, dicha estabilidad se puso de manifiesto cuando las placas se dejaron a temperatura ambiente durante una semana, ya sea en la oscuridad o expuestas a la luz. Si bien todo el gel se oscureció, no existieron dificultades para diferenciar un resultado positivo de uno negativo. El oscurecimiento del gel, puede deberse a que el peróxido de hidrógeno es un reactivo poco es-

table y por lo tanto, tiende a liberar espontáneamente hidrógenos al medio, los que inmediatamente son capturados por el 5-AS y éste cambia de color en todo el seno del gel.

Es conveniente mencionar que si bien la actividad enzimática de la peroxidasa es específica sobre el peróxido de hidrógeno, para el donador de hidrógenos no lo es, por lo que se ha informado del uso de al menos 6 donadores en los ensayos inmunoenzimáticos que emplean peroxidasa como marca (Kurstak, 1985). Además, entre estos donadores hay algunos en los que el producto final de la reacción permanece en estado soluble y otros que precipitan *in situ*. Esta flexibilidad en el uso del donador, ha sido explotada principalmente en las técnicas inmunohistoquímicas o en la electroinmunotransferencia (EITB), donde se emplean conjugados con peroxidasa (Kurstak, 1985; Sparrow y Williams, 1986; Towbin *et al.*, 1979; Bittner *et al.*, 1980; Larralde *et al.*, 1986; Tsang *et al.*, 1983, 1989). Por estas razones, aún existe la posibilidad de que en la prueba de TIA-ELISA, el 5-AS, que da un producto soluble de color pardo, pueda ser substituido por un donador que precipite *in situ*, por ejemplo, el 4-clo-ro-1-naftol, que da un color azul o la diaminobenzidina, que da un color pardo, semejante al del 5-AS (Kurstak, 1985). Además, esto podría hacerse ya sea mezclándolos en un gel de agar o bien agregándolos junto con el peróxido de hidrógeno simplemente en forma de solución, lo que podría simplificar aún más el procedimiento.

En resumen, TIA-ELISA resultó ser un ensayo inmunoen-

zimático sensible y específico, con gran potencialidad para detectar anticuerpos en el suero de ratones inoculados experimentalmente con un antígeno de naturaleza protéica y razonablemente purificado (BSA). Después de la estandarización, la técnica resultó similar a la descrita previamente para DIG-ELISA (Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992), aunque es evidente que algunas de las condiciones establecidas para un tipo de antígeno, no fueron las óptimas para todos los antígenos probados. Además, la reactividad de la prueba resultó altamente específica, debido a que por un lado, la actividad de las peroxidasas naturales de los sueros analizados, sobre todo en aquellas muestras hemolizadas, fue inhibida por la adición de la azida (Sparrow y Williams, 1986; Lim, 1988) y por otro, a que es posible diferenciar claramente un suero positivo de uno negativo, ya que al no existir anticuerpos específicos en la muestra en cantidad suficiente tanto éstos como las inmunoglobulinas no específicas no se pegan al sistema. Por último, y a diferencia de la prueba de ELISA, los resultados pueden ser detectados a simple vista.

La utilidad de la prueba de TIA-ELISA como herramienta para la detección de anticuerpos en enfermedades infecciosas y parasitarias, quedó demostrada con los resultados obtenidos tanto con el fluido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*, como con otros antígenos derivados de hongos, protozoarios y de otros helmintos. Para el serodiagnóstico de la cisticercosis, TIA-ELISA fue comparable con ELISA, tal como señala la evaluación serológica y la correlación lineal

existente entre los resultados de ambas pruebas. Las semejanzas pueden ser mas aparentes que reales, ya que es posible que esto no refleje más que las diferencias en reactividad (3 diluciones) obtenidas durante la titulación de anticuerpos mencionada en la estandarización con BSA. De cualquier manera, los resultados de TIA-ELISA con sueros de individuos con o sin cisticercosis, y al igual que en ELISA, son fácilmente diferenciables cuando se analiza la respuesta por grupo de sueros, como se establece en la comparación gráfica de resultados hecha con el método de Dice y Leraas (1936).

Si bien existieron algunas diferencias entre los títulos codificados y los intervalos de UAC's obtenidos con los sueros de cisticercosos, éstas nunca fueron más allá de un título codificado, y el hecho de que se obtuviera una correlación estrecha entre estas unidades de medida cuando fueron analizadas en forma agrupada, señala, por un lado, que puede ser indistinto utilizar cualquiera de estas unidades para registrar los resultados y por otro, sugiere que en TIA-ELISA, la intensidad de color en las zonas esperadas de reacción, probablemente no se deba a la presencia de anticuerpos de alta afinidad unidos al antígeno inmovilizado a la placa (Holmgren y Svennerholm, 1973) sino mas bien, a diferencias en la concentración de anticuerpos (Lange *et al.*, 1981). Existen evidencias que apoyan este concepto en los estudios hechos con DIG-ELISA en oncocercosis (Gómez-Priego y Valdéz-Ber-

múdez, 1986¹).

La sensibilidad diagnóstica de TIA-ELISA y KLISA obtenida en este trabajo (98.85 % y 86.2 % respectivamente), resultó mayor ó al menos quedó comprendida dentro de los intervalos de sensibilidad que han mostrado DIG-ELISA y ELISA en el serodiagnóstico de la cisticercosis (Cuadro 1). Dichos valores han variado del 33.3 al 95 %, y el origen de esta variación se encuentra en el antígeno utilizado (excólex, fluido vesicular o extracto total); el grado de purificación; tipo de muestra analizada, dilución y por último, de la prevalencia de cisticercosis en el área de donde provinieron las muestras en estudio (Arámbulo *et al.*, 1978; Diwan *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 1986; Larralde *et al.*, 1986; Baily *et al.*, 1988; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992; Díaz *et al.*, 1992). Por otro lado, parece ser que para buscar anticuerpos anticisticerco en el suero ó en LCR, el fluido vesicular crudo ó parcialmente purificado parece ser el más adecuado por presentar buena sensibilidad y adecuada especificidad en cualquiera de las pruebas utilizadas para el serodiagnóstico de la cisticercosis (Flisser *et al.*, 1975, 1979, 1980; Larralde *et al.*, 1986; Gómez-Priego y Gutiérrez, 1992). En este sentido, los resultados presentados aquí, aportan datos confirmativos para este concepto.

1. Gómez-Priego, A., Valdéz-Bermúdez, O.A. (1986). Cuantificación de anticuerpos en la oncocercosis con la prueba de DIG-ELISA. Pág. 46. En: Acevedo-Hernández, A. y Gómez-Priego, A. (Eds.). *Memorias del VII Congreso Nacional de Parasitología*. Puebla, Puebla. México.

En cuanto a la especificidad, los autores informan de muchas variaciones, las cuales también han sido dependientes del antígeno utilizado y nó menos importante, de los criterios empleados para la evaluación serológica, en especial de la prevalencia de la enfermedad o de la probabilidad que tengan los individuos incluidos en el grupo de sujetos normales de padecer cisticercosis (Larralde et al., 1986; Baily et al., 1988). Como señalan Larralde y sus colaboradores (1986), el umbral de positividad para una prueba serodiagnóstica y la prevalencia de la enfermedad en la población que se estudia, muy especialmente en la que se usa como testigo negativo para la prueba, tienen un valor preponderante. Si esto se cumple, las estimaciones de sensibilidad, especificidad y sobre todo del valor de predicción, quedan montadas sobre bases firmes y por tanto, apropiadas para cualquier comparación, ya que por ejemplo, en los países en desarrollo la frecuencia e incidencia de enfermedades parasitarias, tanto en aquellas con evidencias clínicas como en las asintomáticas, es comparativamente más alta que la encontrada en los países industrializados. Esto se traduce en una alta concentración de inmunoglobulinas séricas, tanto específicas como inespecíficas que eventualmente pueden interferir en el resultado de la reacción serológica que se estudia (Gómez-Priego y Schlié-Guzmán, 1978). Por estas razones, en el presente trabajo se utilizaron como testigo negativo, sueros de sujetos sanos y sin ningún dato clínico sugestivo de cisticercosis, todos los cuales tenían las mismas posibilidades de infección por otras enfermedades infectocontagiosas y

parasitarias, así como niveles socioeconómicos y hábitos higiénicos semejantes a los de los individuos con cisticercosis (datos no mostrados), por lo que ambas poblaciones son comparables. De acuerdo con estas consideraciones, estas pruebas pueden ser utilizadas con un alto grado de confiabilidad en México y en otros lugares donde la cisticercosis es endémica.

Las diferencias observadas en sensibilidad y especificidad, al igual que en el valor predictivo, pueden ser el reflejo de las discrepancias en la reactividad de las pruebas mostradas en la Tabla X y en la Figura 13. Estos resultados señalan que TIA-ELISA puede tener una alta proporción de falsos positivos o que ELISA detecta una mayor cantidad de casos en forma de falsos negativos, lo que de una u otra manera, puede influir en la determinación de si la prueba es o no de utilidad para detectar al individuo cisticercoso. Tales discrepancias son, sin embargo, elementos insuficientes para calificar o descalificar la utilidad de estas pruebas para el serodiagnóstico de la cisticercosis, mas bien sirven para orientar la decisión de qué es lo que se desea sacrificar: la especificidad o la sensibilidad, lo cual depende a su vez, del uso que se le quiera dar a la prueba. Por ejemplo, para hacer un diagnóstico individual la sensibilidad es fundamental, mientras que para realizar un estudio o encuesta serológica la especificidad es ahora lo que adquiere mayor importancia y es por esto por lo que se deben considerar los valores porcentuales derivados de la evaluación serológica.

Por otro lado, como establecen claramente Voller y DeSavigny, (1981); Morrow, (1981) y Méndez et al., (1984), es prácticamente imposible obtener valores de sensibilidad, especificidad y reactividad absolutos para una prueba diagnóstica, ya que todos ellos dependen de factores inherentes a la prueba en sí, al antígeno utilizado en ella o a al rigor usado para la evaluación de la misma. Por ejemplo, el umbral de positividad de ELISA y de la hemaglutinación indirecta, cuando se determinó con una muestra de sueros de individuos normales residentes en una población no endémica de cisticercosis, fue menor que el obtenido con sueros de una población donde esta enfermedad es frecuente (Larralde et al., 1986), lo que reafirma la importancia de la población donadora de las muestras usadas como testigo negativo al evaluar la prueba.

La utilidad de TIA-ELISA con otros sistemas antígeno-anticuerpo homólogos, quedó demostrada en los experimentos de detección de anticuerpos en el suero de humanos infectados naturalmente o de animales hiperinmunizados experimentalmente en el laboratorio con esos antígenos. El hecho de que se obtuvieran resultados diferentes con respecto a la solución amortiguadora, sin importar la naturaleza química de los componentes de los antígenos ni su complejidad, no hace más que reforzar lo indicado anteriormente, en el sentido de que hay que estandarizar el ensayo para cada sistema antígeno-anticuerpo. Además, es evidente que esta prueba tiene amplias posibilidades de ser utilizada en el serodiagnóstico de prácticamente todas las enfermedades infecciosas y parasitarias

donde la detección de anticuerpos sea un procedimiento alternativo. A este respecto, es conveniente mencionar que en las pruebas serológicas que utilizan cajas de Petri de plástico como soporte sólido para el ensayo, se ha informado del éxito para detectar anticuerpos contra 17 antígenos en TIA, 5 en DIG-TIA y 16 en DIG-ELISA (Elwing *et al.*, 1977, Elwing y Nygren, 1979; Jeansson *et al.*, 1979; Lange *et al.*, 1981; Ismail *et al.*, 1979; Gómez-Priego *et al.*, 1985), a los que habría que agregar los 8 adicionales ensayados aquí con TIA-ELISA.

La ausencia de reactividad de TIA-ELISA con el antígeno de *Trypanosoma cruzi*, no deja de llamar la atención, ya que esta negatividad fue consistente, independientemente de que se cambiara el amortiguador, la concentración del antígeno ó la dilución de los sueros o del conjugado. Esto contrasta con lo informado por Nilsson y Voller (1982), quienes trabajando con un extracto crudo preparado a partir de epimastigotes de *T. cruzi* crecidos en cultivo, encuentran una correlación estrecha entre ELISA y TIA (DIG-TIA) con sueros de personas residentes en Brasil. Lamentablemente, no indican la concentración del antígeno, aunque para DIG-TIA, mencionan que fue diluido 1:50 en salina. Esto puede tener importancia por que, como se mencionó antes, hay diferencias notables entre la concentración del antígeno utilizado en TIA-ELISA y DIG-TIA (3 µg y 200 µg/ml respectivamente), por lo que pudiera ser que los resultados negativos obtenidos con la primera de esas pruebas, pudiera deberse a la baja concentración de

antígeno (50 $\mu\text{g/ml}$). Debido a lo limitado del material antigénico y de los sueros disponibles para este estudio, no pudieron hacerse experimentos adicionales para determinar la razón de esta negatividad. A reserva de que esto se haga en un futuro, por el momento solo se puede decir que estos resultados refuerzan la sugerencia de que la prueba se debe estandarizar con cada sistema antígeno-anticuerpo utilizado, para obtener las condiciones óptimas del ensayo.

CONCLUSION

Considerando las grandes similitudes en los valores porcentuales obtenidos en la evaluación serológica en ambas pruebas y el alto grado de concordancias, TIA-ELISA puede ser una prueba tan efectiva o más que la de ELISA para la detección de anticuerpos séricos en la cisticercosis humana, con amplias posibilidades para su aplicación en estudios epidemiológicos o de diagnóstico individual de esta enfermedad parasitaria. Además, hay que recalcar que para su implementación, TIA-ELISA no necesita materiales o equipo especializado, costoso o de difícil obtención, como sucede en las pruebas de BITB y ELISA (papel de nitrocelulosa, equipo para electroforesis vertical y de transferencia para el primero; placas de poliestireno y lector para la segunda), ni tampoco es necesario un adiestramiento especializado. Esta simplicidad para su implementación, la hace especialmente adecuada para que se aplique en cualquier laboratorio clínico, ya que su costo final es reducido por utilizar cajas de Petri de fabricación nacional y por que el equipo necesario se encuentra normalmente en cualquier laboratorio. Finalmente, una ventaja adicional que pudiera tener TIA-ELISA dentro de la investigación serológica de la cisticercosis o de otras enfermedades micóticas o parasitarias, es la posibilidad de conservar la evidencia del resultado en forma permanente, para lo cual, es suficiente dejar secar la capa de gel que contiene el resultado de la reacción, ya sea separándola de la caja de Petri o dejándola en ella.

REFERENCIAS

- Aluja, A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. Páginas: 53-62. En: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.) *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York.
- Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, V. y Willms, K. (1987). Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Ambrose, J. (1973). Computerized transverse axial scanning (Tomography). Clinical application. *Br. J. Radiol.* 46: 1023-1035.
- Arámbulo, P.V., Walls, K.W., Bullock, S. y Kagan, I.G. (1978). Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta Tropica.* 35: 63-67.
- Asada, J., Otagaki, H., Kagi, K., Aokage, K. y Ochi, G. (1956). On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. *Iji Shinshi.* 73: 153-156.
- Avrameas, S. y Ternynck, T. (1971). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochem.* 8: 1175-1179.
- Baily, G.G., Mason, P.R., Trijsserneck, F. y Lyons, N. (1988). Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA test using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 295-299.
- Barker, F.C. y Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25: 1-5.
- Barlough, J.E., Jacobson, R.H., Downing, D.R., Marcella, K.L., Lynch, T.L. y Scott, F.N. (1983). Evaluation of a computer-assisted, kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of coronavirus antibodies in cats. *J. Clin. Microbiol.* 17 (2): 202-217.
- Beltrán, H. F. y Gómez-Priego, A. (1973). Evaluación de la contraelectroforesis (CIEF) para la detección de anticuerpos en la cisticercosis experimental y humana. *Antioquia Médica.* (Colombia). 23: 472-473.

Biagi, F. (1972). Epidemiología de la cisticercosis en México. *Gac. Med. Méx.* 103: 7-10.

Biagi, F., Navarrete, F., Piña, A., Santiago, A. y Tapia, L. (1961). Estudio de tres reacciones serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Méx.)*. 25: 501-508.

Bittner, M., Kupferer, P. y Morris, C.F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102: 459-471.

Botero, D. y Castaño, S. (1982). Treatment of cysticercosis with praziquantel in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 810-821.

Botero, D. y Restrepo, M. (1987). *Parasitosis Humanas*. Segunda Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.

Briceño, C.E., Biagi, F. y Martínez, B. (1961). Observaciones sobre 97 casos de autopsia. *Prensa Med. Méx.* 26: 193-197.

Cañedo, L., Laclette, J.P. y Morales, E. (1982). Evagination of metacystode of *Taenia solium*. Páginas: 6-7. En: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Cárdenas, F., Quiroz, H., Meza, A., Aluja, A. (1985). Consideraciones de la respuesta inmunológica ocular en la cisticercosis. *An. Soc. Mex. Oftal.* 59: 53-57.

Clark, D.H. y Cassals, J. (1958). Technique for haemagglutination and haemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573.

Correa, D. (1989). Cisticercosis humana: Relación inmunológica huésped-parásito. Páginas: 31-44. En: Flisser, A. y Malagón, F. (Eds.). *Cisticercosis Humana y Porcina. Su Conocimiento e Investigación en México*. Limusa-Najera. México, D.F.

Correa, D., Gorodezky, C., Castro, L., Rabiela, M.T. y Flisser, A. (1986). Detection of MHC products on the surface of *Taenia solium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 28: 363-368.

Del Brutto, O.H., García, E., Talamas, O. y Sotelo, J. (1988). Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch. Intern. Med.* 148: 544-546.

Díaz, J.F., Verástegui, M., Gilman, R.H., Tsang, V.C.W., Pilcher, J.B., Gallo, C., García, H.H., Torres, P., Montenegro, T., Miranda, E. y The Cysticercosis Working Group in Perú (CWG). (1992). Immunodiagnosis of human cysticercosis

(*Taenia solium*): a field comparison of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 610-615.

Dice, L. y Leraas, H. (1936). A graphic method for comparing several sets of measurements. *Contribution to Laboratory Vertebrate Genetics.* 3: 1-3.

Diwan, A. R., Coker-Vann, M., Brown, P., Subianto, D.B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibbs, C. J. y Gajdusek, D.C. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 364-369.

Dorfman, J. (1963). The radiologic aspects of cerebral cysticercosis. *Acta. Radiol.* 1: 836-842.

Downie, N.M. y Heath, R.M. (1971). *Métodos Estadísticos Aplicados.* Harper and Row Publishers Inc. New York., México.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-353.

Elwing, H., Lange, S. y Nygren, H. (1980). Diffusion-in-gel-enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA): Optimal conditions for quantitation of antibodies. *J. Immunol. Methods.* 39: 247-256.

Elwing, H., Nilsson, L.A. y Ouchterlony, O. (1976). Visualization principles in thin-layer immunoassay (TIA) on plastic surfaces. *Inter. Arch. Allergy. Applied. Immunol.* 51: 757-762.

Elwing, H., Nilsson, L. y Ouchterlony, O. (1977). A simple spot technique for thin layer immunoassay (TIA) on plastic surfaces. *J. Immunol. Methods.* 17: 131-145.

Elwing, H. y Nygren, H. (1979). Diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA): A simple method for quantitation of class-specific antibodies. *J. Immunol. Methods.* 39: 101-107.

Engvall, E. y Perlmann, P. (1972). ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109: 129-135.

Espinoza, B., Ruiz-Palacios, P., Tovar, A., Sandoval, M.A., y Flisser, A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536-541.

- Flisser, A. (1987). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today*. 4: 131-137.
- Flisser, A. y Larralde, C. (1986). Cysticercosis. Páginas: 109-181. En: Walls, K.W. y Schantz, P. (Eds.). *Immunodiagnosis of parasitic diseases*. Vol. I: Helminthic Diseases. Academic Press. New York.
- Flisser, A., Pérez-Montfort, R. y Larralde, C. (1979). The immunology of human and animal cysticercosis: A review. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 57: 839-856.
- Flisser, A., Tarrab, R., Willms, K. y Larralde, C. (1975). Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 6: 1-12.
- Flisser, A., Woodhouse, E. y Larralde, C. (1980). Human cysticercosis: Antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 27-37.
- Gómez-Priego, A., Godínez-Hanna, A.L. y Gutiérrez-Quiroz, M. (1991). Detection of serum antibodies in human *Hymenolepis* infection by enzyme immunoassay. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 645-647.
- Gómez-Priego, A. y Gutiérrez, Q.M. (1992). DIG-ELISA en la cisticercosis humana: Evaluación de la prueba con el fluido vesicular del metacéstodo de *Taenia solium*. *Rev. Mex. Parasitol.* 3: 16-21.
- Gómez-Priego, A., Paniagua-Solis, J.F., Rivas-Alcalá, A.R. y Ruenes-Meza, M.T. (1985). Successful application of the Diffusion-in-gel-enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) in onchocerciasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 159-161.
- Gómez-Priego, A. y Schlié-Guzmán, A. (1978). Estudios inmunológicos en la oncocercosis. I. Niveles de inmunoglobulinas séricas. *Sal. Pùb. Méx.* 20 (5): 575-583.
- Gómez-Priego, A., Valencia-Cruz, E., Riddel de Fonseca, J. y Beltrán-Hernández, F. (1977). Inmunodiscos: Nuevo recurso para el diagnóstico serológico de las enfermedades parasitarias. *Sal. Pùb. Méx.* 19 (5): 735-741.
- González-Barranco, D., Barcelata, F., Sandoval, I. y Cárdenas, L. (1980). Estudio inmunológico del humor acuoso en cisticercosis ocular. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Méx)*. 43: 420-423.
- Hammerberg, B., Dnagler, C. y Williams, J.F. (1980). *Taenia taeniaformis*: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. *J. Parasit.* 66: 569-574.

Hayunga, E.G., Sumner, M.P. y Letanja, T. (1989). Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniformis*. *J. Parasit.* 75: 638-642.

Hogan, M.J. y Zimmerman, L.R. (1962). *Ophthalmic Pathology*. Second edition. Saunders W.B. Co. Philadelphia, USA.

Holmgren, J. y Svennerholm, A.M. (1973). Enzyme-linked immunosorbent assay for cholera serology. *Inf. Immun.* 7: 759-763.

Honsfield, G.N. (1973). Computerized transverse axial scanning (Tomography). I. Description of the system. *Br. J. Radiol.* 46: 1016-1019.

Ismail, M., Draper, C., Ouchterlony, O., Nilsson, L.A. y Terry, R. (1979). A comparison between a new serological method, thin layer immunoassay (TIA), and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies in schistosomiasis. *Parasite Immunology*. 1: 251-258.

Jeanson, S., Elwing, H. y Nilsson, H. (1979). Thin layer immunoassay for determination of antibodies to Herpes Simplex Virus. *J. Clin. Microbiol.* 9: 317-322.

Kuratak, E. (1985). Progress in enzyme immunoassay: Production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 63 (4): 793-811.

Lange, S., Gunnarsson, H., Larsson, P. y Nygren, H. (1981). Diffusion-in-gel-enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for detection of antibodies to *Yersinia enterocolitica* O:3. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* B9 (1): 63-66.

Larralde, C., Lacleste, J.P., Owens, C., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. y Goodsaid, F. (1986). Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and Hemmagglutination tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 965-973.

Larralde, C., Sciutto, E., Grun, J., Diaz, M.L., Govezensky, T. y Montoya, R.M. (1986). Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. Páginas: 325-330. En: Cofredo, L., Todd, L., Packer, L. y Joss, J. (Eds.). *Cell Function and Disease*. Plenum Press. New York.

Larralde, C., Sciutto, E., Huerta, L. (1990). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia* 63: 271-275.

Lehtonen, O.P. y Viljanen, M.K. (1981). Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods*. 34: 61-70.

- Lim, T. S. (1988). A sensitive malaria immunoperoxidase assay for the detection of *Plasmodium falciparum* antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38 (2): 255-257.
- Ljungstrom, I. (1983). Immunodiagnosis in man. Pág. 403-445. En: Campbell, W.C. (Ed.). *Trichinella and trichinellosis*. Plenum Press. New York. USA.
- López, F. (1982). Un nuevo caso de cisticercosis del cuerpo vítreo. *Gac. Med. (Méx)*. 28: 180-183.
- López, M.R., Nájera, O.O. y Macotela, R.E. (1974). Cisticercosis cutánea. *Prensa Med. Mex.* 39: 1-4.
- Lowry, O.H., Rosenbroug, N.J., Farr, A.C. y Randall, R.C. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lumsden, R.D., Voge, M. y Soganders, B.F. (1982). The metacystode tegument: fine structure, development topochemistry and interactions with the host. Páginas: 307-362. En: Fliesser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.
- Macías, S.R. y Hernández, P. (1966). Cisticercosis cerebral. *Prensa Med. Mex.* 31: 147-155.
- Maharan, R.C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. Páginas: 39-46. En: Fliesser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.
- Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J. F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2: 235-254.
- Méndez, R.I., Namihira, G.D., Moreno, A.L. y de Sosa, M.C. (1984). *El Protocolo de Investigación. Lineamientos para su Elaboración y Análisis*. México: Editorial Trillas. pág.123-156.
- Miller, B., Goldberg, M., Heiner, D. (1984). A new immunologic test for CNS cysticercosis. *Neurology.* 34: 695-697.
- Molinari, J.L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, S. y Tato, P. (1983). *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasit.* 55: 340-343.
- Monroy-Ostria, T., Monroy-Ostria, A., Valdez-Trujillo, V. M., Chávez-Sánchez, F.R. y Estrada-Parra, S. (1992). La técnica de coaglutinación y su comparación con otras dos técnicas inmunológicas para el diagnóstico de la neurocisticercosis. *Rev. Mex. Parasitol.* 3: 30-31.

Morrow, R.H. (1981). Diagnostic measures in tropical diseases. Epidemiological perspectives. pág. 39-43. En: Morrow, R.H. (Ed.). Report of an informal consultation of further development of diagnostic methods for tropical diseases. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

Nieto, D. (1956). Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. *Neurology*. 8: 725-732.

Nilsson, L.A., Petchclai, B. y Elwing, H. (1980). Application of thin layer immunoassay (TIA) for demonstration of antibodies against *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 254-259.

Nilsson, L.A. y Voller, A. (1982). A comparison of thin layer immunoassay (TIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 95-97.

Olivo, A., Plancarte, A. y Flisser, A. (1988). Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other plathelminthes. *Int. J. Parasitol.* 18: 543-545.

Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Páginas: 19.1-19.44. En: Weir, D.H. (Ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. 3ª Edición. Blackwell Scientific Publications, Oxford y Londres.

Parkhouse, R.M.E. y Abney, E.R. (1981). Tecnología de hibridomas aplicada al diagnóstico serológico de la oncocercosis. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de Las Casas. Chiapas, México.

Rabiela, M.T. y Flisser, A. (1990). Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol. Today*. 5: 357-359.

Rabiela, M.T., Rivas, A.H. y Rodríguez, J. (1979). Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis como causa de muerte. *Patología. (Mex)*. 17: 119-123.

Robles, C. (1946). Consideraciones acerca de la cisticercosis cerebral. *Arch. Neurocir.* 3: 23-43.

Ramírez, B., Merchant, M.T., González, P.M., Cañedo, L. (1982). Neurology and excretory structures of *Cysticercus cellulosae*. Páginas: 261-280. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Rodríguez, C. y Boleaga, D. (1982). Neuroradiology of human cysticercosis. Páginas: 139-162. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F.

(Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Rodríguez, C. y Palacios, E. (1977). Radiology of cysticercosis of the central nervous system including computed tomography. *Radiology*. 125: 127-131.

Salazar-Schettino, P.M., De Haro, I., Ruiz, A. y Cabrera, M. (1992). Mecanismos de infección de la cisticercosis. *Rev. Fac. Med. (Méx)*. 271: 8-9.

Santín, G. y Vargas, J. (1986). Roentgen study of cysticercosis of the central nervous system. *Radiology*. 188: 520-529.

Schenone, H., Villareal, F., Rojas, A., Ramírez, R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. Páginas: 25-38. En: Flisser, A., Willis, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Shanley, D.J. y Jordan, C.M. (1980). Clinical aspects of CNS cysticercosis. *Arch. Intern. Med.* 140: 1309-1313.

Schantz, P., Shanka, D. y Wilson, M. (1980). Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 609-612.

Sparrow, R. L. y Williams, N. (1986). An *in situ* immunoperoxidase staining procedure for human cell colonies grown in semi-solid agar culture. *J. Immunol. Methods*. 87: 145-148.

Tay-Zavala, J., Lara-Aguilera, R., Velasco-Castrejón, O. y Gutiérrez-Quiroz, M. (1991). *Parasitología Médica*. 5a Ed. Edit. Méndez Cervantes, México, D.F.

Tellez, G., Ramos, M., Dufour, L. (1987). Detection of *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid by dot-enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 169-173.

Toriello, C. y Mariat, F. (1974). Etude comparée des polysides de champignons *Ceratocystis stevensii* et *Sporothrix schenckii*, composition chimique et analyse immunologique. *Ann. Microbiol.* 125: 287-307.

Towbin, A., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 76: 4350-4354.

Tsang, V.C.W., Brand, J.A. y Boyer, A.E. (1989). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. In-*

fact. Dis. 159: 50-59.

Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. y Simons, A.R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrophoretic transfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 92: 377-391.

Velasco, S., Bravo, M.A. y Quirasco, F. (1982). Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. Páginas: 47-52. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Villanueva-Díaz, G. y González-Barranco, D. (1980). Aplicación de la prueba de hemaglutinación indirecta en la cisticercosis humana. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Mex)*. 43: 253-256.

Voller, A., Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1979). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate application. Dynatech Laboratories. Alexandria, Virginia, USA.

Voller, A. y DeSavigny, D. (1981). Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *J. Immunol. Methods*. 46: 1-29.

Willms, K. y Arcos, L. (1977). *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. *Exp. Parasitol.* 43: 396-406.

Woodhouse, E., Flisser, A. y Larralde, C. (1982). Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. Páginas: 11-24. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Yakoleff, G., Flisser, A. Sierra, A. y Larralde, C. (1982). Analysis of antigen variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 68: 39-47.

Zavala, V.J., Bolio, C. y Suárez, H. (1984). Cisticercosis por *Cysticercus racemosus* de localización muscular. *Patología. (Mex)*. 22: 99-103.

Zedillo, G. y Bobadilla, V.I. (1987). Historia de la cisticercosis porcina en México. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 18: 77-90.

Zenteno, G. (1985). Aspectos neuroquirúrgicos en 2,000 enfermos internados en la Unidad de Neurología y Neurocirugía del Hospital General de México en el período 1959-1983. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Mex)*. 28: 515-520.

Zenteno, G. (1982). A classification of human cysticercosis. Páginas: 107-123. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds.). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press. New York.

Zenteno, G., Martínez, B. y Biagi, F. (1961). Observaciones sobre la cisticercosis humana. *Rev. Fac. Med. (Mex)*.3: 617-633.