

11261  
G  
ZET

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**División de Estudios de Posgrado**

---

Universidad Nacional Autónoma de México

**DEPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**COMPARACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Ascaris*  
*lumbricoides* PARA EL DIAGNÓSTICO  
SEROLÓGICO**

Trabajo realizado por

**MIRIAM CAROLINA MARTÍNEZ LÓPEZ**

en el Laboratorio de Inmunoparasitología  
bajo la asesoría del Dr. Manuel Gutiérrez Quiroz  
para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
(PARASITOLOGÍA)**

**México, 1995**  
**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.

**Dedico esta tesis**

**A mi amado esposo *Marco***

**A mi orgullo, mi hijo *Rubiel***

**por su amor y confianza en cada uno de los proyectos que  
llenan nuestras vidas.**

**A mi familia, especial a mis padres *Vina y Jesús***

**por hacerme sentir que mis pequeños triunfos siempre son  
los de ellos.**

**A mis compañeros y amigos del Laboratorio de  
Inmunoparasitología**

**En especial a *Leticia Ruiz***

**A mis amigos de la Coordinación de Enseñanza**

**por su amistad y apoyo, durante y después de mis estancia  
para la realización de este trabajo.**

**Al Dr. *Manuel Gutiérrez Quiroz***

**por su valiosa asesoría durante mi formación en  
Parasitología.**

**Agradezco la colaboración:**

***Biól. Alberto Gómez Priego*  
*Dr. Raúl Romero Cabello*  
*Q.F.B. Laura González***

**Una dedicatoria especial para:**

***José Luis Cortés Peñaloza***

***Juan Manuel Muñoz Cano***

***Rebeca Estrella Gómez***

***Carlos de la Cruz González***

***Gonzalo González Calzada***

**Agradezco las valiosas sugerencias del Jurado que se me asignó.**

**Presidente:** *Dr. Jorge Tay Zavala*

**Secretario:** *Dra. Patricia Tato Zaldivar*

**Vocal:** *Dr. Manuel Gutiérrez Quiroz*

**Suplente:** *Dra. Rosamaría Bernal Redondo*

**Suplente:** *Dr. Rubén Álvarez Chacón*

## CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
A. Morfología.....	3
B. Ciclo biológico.....	8
C. Patogenia.....	10
D. Cuadro clínico.....	12
E. Epidemiología.....	15
III. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....	18
A. Justificación.....	18
IV. HIPOTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	23
A. General.....	23
B. Específicos.....	24
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
VII. RESULTADOS.....	40
A. Rendimiento proteínico.....	40
B. Reactividad antigénica.....	41
C. Serología.....	42
D. Reactividad cruzada.....	48
VIII. DISCUSION.....	54
IX. CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS.....	61

## INTRODUCCION

En los últimos años se ha visto un considerable avance en el desarrollo de las pruebas inmunodiagnósticas de las enfermedades parasitarias (Ambroise, 1986)

En las técnicas utilizadas para el diagnóstico inmunológico de las parasitosis, se emplean antígenos de diferentes porciones del parásito, obtenidos por distintos métodos de preparación y extracción, hay gran predominio por los extractos crudos del parásito adulto, sin embargo en la actualidad se ha puesto especial interés en la obtención de antígenos purificados, tratando de encontrar la porción más inmunogénica y específica del parásito, con objeto de disminuir o eliminar las reacciones cruzadas que frecuentemente se presentan (Gutiérrez-Q, 1989).

Las técnicas serológicas en las que se utilizan antígenos solubles son: Hemaglutinación Indirecta (HI), Contrainmunolectroforesis (CIEF), Reacción de fijación del complemento (RFC), Inmunoensayo enzimático (ELISA), Difusión en Gel-ELISA (DIG-ELISA) e inmunotransferencia entre otras, éstas técnicas, se emplean en la mayor parte de las parasitosis tisulares, entre las que se encuentra, la ascariosis en su fase de migración tisular.



## BASAMENTO TEORICO

**A.lumbricoides** es un nemátodo que debido a su gran tamaño quizá haya sido el primer parásito conocido por el hombre. Desde la época de los griegos y romanos se tiene conocimiento de su existencia, puesto que en sus luchas por los territorios americanos al dar muerte a sus enemigos podían ver salir de sus intestinos gran número de ellos, e incluso los griegos lo denominaron "Elmis stronggyle"; y los romanos "Lumbricus téres" lo que indica que lo confundían con la lombriz de tierra (Faust, 1974). Linneo en 1758 lo clasificó taxonómicamente y le dió el nombre de **A.lumbricoides**. A partir del siglo XIX comenzó a ser revisado en forma sistemática por Mosler, Leuckart, Stewar, Lutz y los hermanos Koino; en la actualidad continúa siendo estudiado por varios grupos de investigadores (Schmith,1984)

A) MORFOLOGIA Existen dos subespecies de **A.lumbricoides**: **A.lumbricoides lumbricoides** (del hombre) y **A.lumbricoides suum** (del cerdo), las diferencias morfológicas entre éstas subespecies, está basada en pequeñas diferencias de los dentículos, estudiadas por Ubelaker 1972. Fisiológicamente se considera que existen diferencias entre ambas ya que presentan especificidad de huésped (Schmidt 1984), aunque nuestra experiencia nos señala lo contrario; apoyados en trabajos de autores como Kennedy 1989, en los que al usar diferentes técnicas inmunoquímicas, demostró que las larvas L3 de **A.lumbricoides suum** presentan antígenos adecuados para el inmunodiagnóstico, muy semejantes para ambas subespecies, ya que no habría diferencia al usar antígenos de una o de otra en estudios seroepidemiológicos. **A.lumbricoides** se encuentra clasificado dentro del phylum nemátoda con las siguientes características; son gusanos cilíndricos, polimiarios, con sus extremos alargados. La cutícula cubre toda la superficie externa del cuerpo y también reviste la cavidad bucal, faringe, recto, cloaca, vagina y poro excretor. A la microscopía electrónica se diferencian tres capas: corteza, matriz y capa fibrilar. La corteza está compuesta por una capa interna y otra externa, la superficie contiene aminoácidos, colágeno y gran cantidad de enzimas, presenta una capa fina de lípidos que mide menos de 1000 Å de espesor. Debajo de la corteza se encuentra la matriz, compuesta por una capa fibrilar externa y otra capa homogénea. La capa fibrilar presenta canales ramificados que

se dirigen hacia la corteza externa, contiene sustancias ricas en aminoácidos aromáticos, la capa homogénea está compuesta por proteínas de bajo peso molecular, los análisis químicos han revelado la presencia de hidratos de carbono y lípidos. La capa fibrosa es el estrato más interno de la cutícula y está formada por tres capas de naturaleza fibrosa y por la lámina basal. La continua aparición de enzimas sobre la cutícula indica que ésta no es una cubierta inerte del cuerpo sino que presenta actividad metabólica. La cutícula de las larvas de **A.lumbricoides** estructuralmente está constituida sólo por dos capas, y también presentan gran actividad metabólica, de hecho mayor que la del gusano adulto. Debajo de la lámina basal se encuentra una capa muscular relativamente gruesa, ésta musculatura, se adhiere a la cutícula mediante fibras que se originan en la porción contráctil de la célula muscular, atraviesa la lámina basal y se fija en la capa fibrosa (Cheng 1974).

En el extremo anterior del parásito, se encuentra la boca trilabiada, uno de los labios es amplio de localización medio dorsal y los otros dos son ventrolaterales; están finamente denticulados, la boca se comunica con el esófago que forma una estructura alargada envuelta por una pared membranosa, éste se continúa con el intestino mediante la llamada válvula esófago-intestinal, el intestino está cubierto por una capa de epitelio cúbico columnar y se divide en tres regiones, la ventricular es secretora a diferencia de

la región media y prerrectal, el intestino se comunica con el recto que finaliza en el ano, éste se encuentra en situación ventral del extremo posterior del cuerpo. El extremo posterior de los machos presenta una curvatura hacia la parte ventral, apreciándose las espículas copulatorias, el aparato reproductor del macho está formado por una serie de túbulos que forman testículos, vasos deferentes y conducto eyaculador; este conjunto de túbulos está enrollado en la mitad posterior del cuerpo y terminan en la cloaca junto con el par de espículas copuladoras. El aparato genital de la hembra está formado por la vulva, localizada en el primer tercio anterior del cuerpo, se continúa con la vagina cónica que se bifurca para formar un par de tubos genitales. Los cuales constan de útero, receptáculo seminal y ovarios, éstos tubos miden varias veces el tamaño del parásito y llegan a contener hasta 27 millones de ovulos. La oviposición se ha calculado hasta en 200,000 huevos diarios. La hembra joven puede depositar huevos no fecundados (infértiles), los cuales son más alargados. Los fértiles se caracterizan por ser ovales o redondos con cubierta mamelonada. ( Salazar, 1980).

El sistema nervioso de **A.lumbricoides** está formado por un anillo circuncéntrico y fibras nerviosas, presentan numerosas comisuras que unen al nervio ventral con los nervios laterales, muchas de las terminaciones de los nervios anteriores y posteriores finalizan como terminaciones de

naturaleza sensorial. En estudios neurofisiológicos de estos parásitos, se ha observado que el líquido pseudocelómico, contiene más sodio que potasio, por ésta razón se ha sugerido que la acción nerviosa está dada por el influjo externo de iones de sodio y que el potencial de reposo está dado por el exceso de potasio en el ectoplasma; se ha demostrado que presenta actividad acetilcolínica, así como también se le observan nervios motores e inhibidores (Schmidt, 1984).

**A. lumbricoides** es un parásito anaeróbico facultativo, fisiológicamente capta oxígeno a través del grupo hemo contenido en la mioglobina de la pared del cuerpo y en la hemoglobina del líquido pseudocelómico, en la primera, actúa igual que la mioglobina de los animales vertebrados, ya que libera oxígeno bajo condiciones anaeróbicas. **A. lumbricoides** puede absorber y romper la hemoglobina del hospedador y al menos la mitad del grupo hemo, puede ser utilizada con pequeñas alteraciones estructurales, en la síntesis de la hemoglobina de éste nemátodo. Es importante hacer notar que la mioglobina del cuerpo del parásito puede actuar no solo como almacén de oxígeno durante los periodos de anóxia, sino que también puede transferir oxígeno desde la cutícula hacia el líquido pseudocelómico.

**A. lumbricoides**, vive en un medio escaso en oxígeno por lo que el metabolismo de los hidratos de carbono juega un papel importante en la obtención de energía. Los lípidos y

proteínas no se prestan a las oxidaciones y reducciones internas, característicos de los procesos anaeróbicos. En **A.lumbricoides**, el glucogéno almacenado se sintetiza a partir de la fructuosa, sorbosa, maltosa y sacarosa que se absorben. Debido a que **A.lumbricoides** presenta aparato digestivo, se acepta que la mayor parte de las proteínas son captadas a través de dicho aparato, por medio de una actividad secretora tanto de tipo merócrina como holócrina. No es posible que las proteínas "per se" sean absorbidas por el revestimiento del tubo, sin embargo, después de una digestión en el lúmen, los aminoácidos obtenidos son incorporados por esta ruta. Los productos finales del metabolismo del nitrógeno son excretados en forma de amoníaco, calculándose que **A.lumbricoides** expulsa 39 mg de nitrógeno por 100 g de peso húmedo del parásito por día, de los cuales el 79% es amoníaco, 7% urea y 13% polipéptidos.

## B.- CICLO BIOLÓGICO

**A.lumbricoides**, presenta una etapa tisular hasta establecerse en su habitat natural en el intestino delgado del hombre. Una etapa externa en el suelo, con condiciones de temperatura y humedad adecuados para que ocurra la embriogénesis de los huevos fecundados que fueron expulsados junto con la materia fecal. Una vez formada la larva de segundo estadio en el interior del huevo, al ser ingeridos por el hombre, la acción de los jugos digestivos, actúa sobre la cubierta y libera la larva de segundo estadio (rabditoide), en el intestino delgado proximal, sus dimensiones son de 200 a 300 micras de longitud por 14 micras de grosor. Las larvas a las 24 horas penetran la mucosa intestinal hasta alcanzar las venúlas y vasos linfáticos mesentéricos y por la circulación porta pasan a hígado donde se localizan después de 24 a 36 horas de ocurrida la infección. Se ha observado que al cuarto día después de la infección, se les encuentra en hígado en mayor número (larvas del tercer estadio). Del cuarto al séptimo día se localizan en pulmón, pero es en esta etapa cuando se presentan en mayor cantidad. En pulmones ocurre la tercera muda que da origen a la larva del cuarto estadio, ahí, rompen la membrana alveolo-capilar y caen a la luz alveolar, llegan a bronquiolos, bronquios, ascienden a tráquea y glotis donde son deglutidas en un proceso que ocurre en un lapso no mayor de 24 hrs.

Hacia el día ocho y diez de la infección se vuelve a incrementar el número de larvas del quinto estadio, en el intestino delgado, en donde se desarrollan a gusanos adultos machos y hembras, los cuales copulan y seis a ocho semanas después inician la producción y eliminación de huevos. Es importante hacer notar que no se encuentran larvas ni en pulmón ni en hígado después del día 13 de la infección (Douvres, 1969).



## C.- PATOGENIA.

De acuerdo al ciclo biológico en el hombre, **A.lumbricoides** en su fase larval de migración extraintestinal, está en contacto estrecho con el organismo durante siete días. La eosinofilia sanguínea y tisular que se presenta, es característica frecuente en las infecciones por este helminto, la cual aparece aproximadamente entre el cuarto y el séptimo día después de la infección. En el hombre la infección por éste nemátodo despierta la producción de anticuerpos reagínicos u homocitotrópicos del tipo IgE e IgG1 y 2 (Johanson, 1968; Cohen, 1974).

En las infecciones por **A.lumbricoides**, después de la primera exposición al gusano, se forman anticuerpos citotrópicos que activan las células cebadas, los cuales al degranularse producen sustancias que atraen y activan eosinófilos y neutrófilos para la citotoxicidad celular dependiente de células hacia los parásitos y en especial hacia las larvas. Esto se lleva a cabo cuando los anticuerpos IgE e IgG sensibilizan basófilos y células cebadas de los tejidos con los que tienen contacto, al fijarse a los receptores Fc de las células sensibilizadas durante un tiempo. Después de una segunda exposición al mismo antígeno, en la célula sensibilizada se produce la degranulación y

liberación de mediadores químicos como la histamina, serotonina, heparina, factor quimiotáctico de los eosinófilos (FQE-A), factor quimiotáctico de los neutrófilos polimorfonucleares (FQN-PME), cininas, metabolitos del ácido araquidónico y sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRL- A), como resultado de la reacción antígeno-anticuerpo (Soulsby, 1972; Katz, 1984). El papel primario de estas sustancias parece ser la defensa contra la lesión, primero provoca inflamación y posteriormente repara los tejidos dañados; sin embargo éstos mediadores de las reacciones alérgicas debido a su actividad farmacológica, pueden producir en el huésped una reacción de hipersensibilidad, tipo I, produciendo un cuadro clínico característico de rinitis alérgica o durante la etapa migratoria de **A.lumbricoides** el síndrome de Löeffler.

#### D.-CUADRO CLINICO

La penetración de las larvas de segundo estadio en la mucosa intestinal durante su fase migratoria, producen muy poco daño, las larvas que se extravían y migran errantes mueren tiempo después en localizaciones anómalas como en hígado, bazo, ganglios linfáticos o en cerebro. Frecuentemente despiertan respuesta inflamatoria que produce síntomas vagos difíciles de diagnosticar y que se confunden con otros padecimientos.

El adulto de **A.lumbricoides** en el tubo digestivo, puede originar alteraciones por dos tipos de acción: a) mecánica, la cual está determinada por la presencia del parásito. En las infecciones masivas, en ocasiones se pueden presentar complicaciones que tienen que resolverse quirúrgicamente como es el caso de vólvulus, invaginación, subobstrucción y obstrucción intestinal, así como perforación del tubo digestivo, b) migración errática, en la cual los parásitos pueden penetrar por el ampulla de Vater y producir obstrucción en conductos biliares o también pueden migrar hacia tubo digestivo alto y salir por narinas o boca. Es probable que **A.lumbricoides** succione sangre de la pared intestinal, aunque su principal alimento es el contenido líquido del intestino. En las infecciones moderadas o severas de esta parasitosis la

succión constante de nutrientes puede producir desnutrición y falta de desarrollo en los niños, dolor abdominal, y fenómenos de sensibilización como edema angioneurótico, insomnio e inquietud, los cuales son ocasionados por la liberación de metabolitos del parásito en la luz intestinal (Pawlowski, 1978).

Durante la migración de las formas larvarias de **A.lumbricoides** y sobre todo en las reinfecciones, se producen alteraciones a nivel hepático, ya que al quedar atrapadas algunas de estas, se genera reacción inflamatoria granulomatosa que se traduce a la clínica con dolor en hipocondrio derecho por hepatomegalia, ésto dependerá del número de larvas atrapadas. En pulmones la extravasación originada por la ruptura de la membrana alveolocapilar, produce exudados de tipo bronconeumónico acompañados de fiebre y eosinofilia de corta evolución (7 días), cuadro clínico conocido como síndrome de Löeffler o neumonía eosinofílica; entre los síntomas y signos predominantes se encuentran tos, dolor torácico y edema facial, a la percusión hay signos de matidez y dolor en el sitio afectado, a la auscultación se detectan soplos tubáricos y estertores crepitantes finos (Arian y Craudall 1971). También se pueden presentar cuadros de tipo asmático, semejante al inducido por cualquier otro tipo de alérgeno en personas susceptibles (Joubert, 1979). Este cuadro clínico puede confundirse con neumonía o con un cuadro asmático de etiología diversa. Se ha

sugerido que la reacción anafiláctica en forma natural por antígenos de **A.lumbricoides**, puede causar incluso muerte súbita en niños (Hogartt Scott 1967).

Por ello, al caracterizar clínicamente un proceso neumónico deben tomarse en consideración dos puntos importantes como son: 1. Determinar si la enfermedad es de origen microbiano y 2. Identificar al agente etiológico, ya que la similitud del cuadro cuando es por **A.lumbricoides** amerita ésta diferenciación para su tratamiento específico, sobre todo en niños ya que debido a las condiciones socioeconómicas y hábitos de juego son más susceptibles a ser parasitados.

## E.- EPIDEMIOLOGIA

Desde el punto de vista epidemiológico y debido a la gran prevalencia de esta parasitosis en su fase intestinal, se le ha considerado como un problema de salud pública, sobre todo en aquellos países con clima cálido y húmedo, o en regiones templadas y húmedas donde a los factores del medio ambiente se combinan condiciones de pobreza, falta de eliminación adecuada de excretas, así como educación sanitaria individual y familiar deficiente que favorece la diseminación de la parasitosis.

Stoll en 1947, calculó que en el mundo aproximadamente 644 millones de individuos se encontraban parasitados por éste helminto (Faust 1974). Había tres millones en Norteamérica, cuarenta y dos millones en América tropical, cincuenta y nueve millones en Africa, cuatrocientos ochenta y ocho millones en Asia, treinta y dos millones en Europa, 19.9 millones en Rusia y 500 000 en las Islas del Pacífico. En el informe técnico de la OMS de 1982 se modificó la incidencia, calculandose aproximadamente mil trecientos millones de individuos infectados en el mundo, mencionando que la magnitud de la transmisión en el hombre depende más de factores socio-económicos que físicos por lo que los principales factores parecen ser, la alta densidad demográfica, el empleo extensivo de excremento humano como

fertilizante, el analfabetismo y el mal saneamiento. Estos factores no se han modificado o ha sido muy poco, en casi dos terceras partes del mundo (países en desarrollo), lo que hace temer que en esta década se halla aumentado el número de afectados en el mundo.

En la población de varios países de América Central y en Sudamérica el promedio de infección con **A.lumbricoides** para 1984 fue aproximadamente de un 45%. En el sur de los Estados Unidos de América, existe una alta frecuencia de ésta parasitosis, probablemente debido a que tienen más inmigrantes latinos (Schmidt, 1984). La ascariosis por ser una de las denominadas parasitosis transmitidas por el suelo (geohelminthiasis), ha resultado tener los índices de frecuencia más elevados entre la población preescolar y escolar. Forrester 1988, encontró en un estudio realizado en Coatzacoalcos Ver. con muestras del suelo de las casas de 428 familias, una alta incidencia de huevos de **A.lumbricoides**; también encontró en los diferentes grupos de edad de dichas familias una frecuencia del 20% de ascariosis. Ambos sexos fueron susceptibles de ser parasitados sin hallar diferencia entre ambos. En una recopilación de trabajos realizados sobre ascariosis intestinal en nuestro país durante 20 años, por Tay, 1978, se estimó que el 26% de la población estaba parasitada por éste nemátodo, y solo el 6% de los infectados presentó esta parasitosis en forma masiva, sin embargo los autores señalan que aún se está lejos de

conocer la frecuencia real de esta helmintiasis en el país, ya que en general el número de personas estudiadas está por debajo del deseable para obtener la frecuencia de ésta parasitosis con significado estadístico.

En la actualidad no se conoce cual es la frecuencia de esta parasitosis, cuando se presentan problemas pulmonares, así como tampoco las alteraciones patológicas que se originan como resultado de la respuesta inmune en los diferentes órganos y tejidos del huésped, por lo que es fundamental su estudio integral. La baja frecuencia de éste parásito en la población adulta, podría ser debida a las diferencias de hábitos con los niños. Algunos autores han atribuido esta baja frecuencia al desarrollo de inmunidad, la cual puede no ser muy marcada, ya que se ha observado que en las infecciones por **A.lumbricoides** en el hombre, ésta inmunidad desaparece en un período de 9 a 12 meses, debido a que en esta parasitosis no se presenta autoinfección interna, pero sí reinfección (Stromberg, 1979).



### III.-ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

#### A.-JUSTIFICACION.

La respuesta contra las etapas larvarias de *Ascaris* puede ser intensa y sigue el patrón típico de los parásitos tisulares. De tal forma que por la capacidad especial de inducir hipersensibilidad inmediata, es que las infecciones por *A.lumbricoides* en el hombre han sido estudiadas durante todo éste siglo (Sadun, 1972). La infección por *Ascaris* causa una potenciación inespecífica de la IgE ya que sólo una pequeña parte del total de IgE tienen anticuerpos específicos (Turner, 1979). En los individuos infectados, la migración tisular de éste parásito puede producir reacciones cutáneas, eosinofilia, síndrome de Löeffler, secuelas patológicas y muerte súbita. En éstos pacientes también se ha detectado que los niveles sanguíneos de IgE se incrementan en las infecciones prolongadas, dirigidas contra proteínas de superficie, de cutícula o productos liberados al medio como productos metabólicos.

La cinética de la respuesta inmunitaria de *A.lumbricoides* guarda relación con el ciclo biológico de los ascarides en los cuales cada fase del desarrollo tiene una actividad inmunizante distinta. La respuesta inmunitaria más notable se manifiesta en la fase inicial de la ascariosis y está condicionada por la inmunogenicidad de los antígenos de

la larva. En ratones, cerdos y cobayos, los anticuerpos pueden detectarse desde el quinto al sexto día de después de la inoculación. quince o veinticinco días después la concentración llega a la máxima, a partir de entonces disminuyen progresivamente hasta 90 o 100 días después de la inoculación. Araki en 1976, encontró que al inicio de las infecciones con helmintos la inmunoglobulina que prevalece es la IgM específica, pero luego hay un incremento paulatino de IgG específica, concordando con las cantidades de células plasmáticas en bazo y ganglios linfáticos, determinado un patrón típico de las parasitosis tisulares en el hombre y demostrándose que la respuesta inmune en la ascariosis se forma por células B y no por células T.

El diagnóstico etiológico de la ascariosis pulmonar es complicado, por que implica obtener la forma larvaria del parásito durante su migración para confirmar el diagnóstico, o bien esperar dos meses a que se desarrolle la forma adulta en el intestino y pueda ser detectado por coproparasitoscópicos. Ante esta dificultad se recurre a otros métodos de laboratorio, entre ellos los inmunológicos, cuyos resultados se valoran en forma conjunta y así obtener el diagnóstico más probable. La preparación de diferentes tipos de antígenos utilizados en las pruebas de inmunodiagnóstico en parasitología, juegan un papel muy importante en los resultados.

Por la facilidad de obtener parásitos adultos, las preparaciones antigénicas son generalmente a base de extractos crudos de éste. A la fecha existe dificultad para el serodiagnóstico de las infecciones por **A.lumbricoides** en el hombre, debido a la gran cantidad de componentes antigénicos del parásito, en especial si se utilizan antígenos del gusano adulto (Torres y Barriga 1975). Desde hace algunos años, se trabaja con diferentes antígenos de **A.lumbricoides** con objeto de encontrar una mayor sensibilidad y especificidad en las pruebas serológicas (Hogarth-Scott, 1968, Sadun, 1972, Dobson, 1981). En 1983, Smith, después de trabajar con antígenos de adultos y de huevos embrionados, recomendaron el uso de los antígenos derivados de las etapas larvarias, por ser los involucradas primariamente en la respuesta inmune del huésped. Se ha observado en forma importante que el uso de antígenos de parásitos adultos producen reacciones serológicas cruzadas con otros géneros y especies de nemátodos adultos, que también infectan al hombre, por lo que la utilización de estos antígenos son de poco valor en el inmunodiagnóstico de estas parasitosis. (Cohen, 1974; Torres, 1975; Así mismo se ha observado en algunas técnicas como la inmunolectroforesis e inmunodifusión, realizadas con sueros hiperinmunes de conejo, gran número de bandas de precipitación de identidad parcial o total con los antígenos de los diferentes parásitos empleados, encontrando que el mayor número de epitopes que se reconocen, está relacionado no sólo con la cercanía

filogenética, sino con la ontogenia del parásito de donde se obtuvieron, como en **A. lumbricoides suum, A. lumbricoides lumbricoides , Toxocara canis y T. leonina.** (Smith,1983).

#### IV.- HIPOTESIS

Sí la respuesta inmune del huésped humano infectado con **A. lumbricoides** está dirigida a los antígenos de la larva en migración, entonces es de esperar que el empleo de éstos antígenos sean en el diagnóstico serológico de la parasitosis más específicos que los obtenidos del gusano adulto.

## V.-OBJETIVO

### A. GENERAL

Realizar un estudio comparativo de cuatro extractos antigénicos de larvas y gusanos adultos de **A.lumbricoides suum** y de su capacidad para detectar anticuerpos para el diagnóstico de la ascariosis durante su etapa de migración larval.

## B. ESPECIFICOS

1.- Preparar dos antígenos de la fase larval L3 de **A.lumbricoides suum** : a) superficie de larvas (SL) y b) completo de larvas (CL).

2.- Extraer dos antígenos de gusanos adultos de **A.lumbricoides suum**: a) completo de adulto (CA) y b) excreciones y secreciones de adulto (ESA).

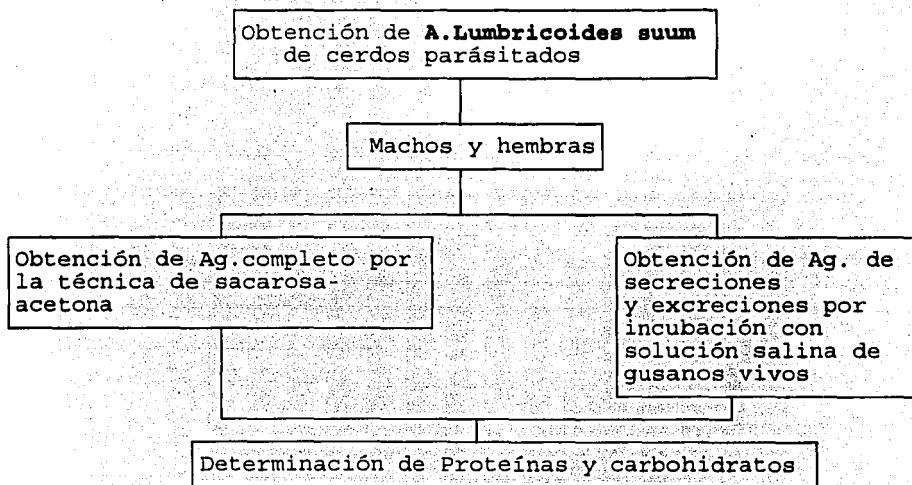
3.- Cuantificar la reactividad de los cuatro antígenos de **A.lumbricoides suum**, contra sueros de pacientes con ascariosis, mediante la técnica de hemaglutinación indirecta.

4.- Identificar la reactividad cruzada de los cuatro antígenos de **A.lumbricoides suum**, contra sueros de pacientes positivos a otras parasitosis tisulares.

5.- Determinar sensibilidad y especificidad de los cuatro antígenos con la técnica de hemaglutinación indirecta en pacientes con ascariosis.

Objetivo 2.- Elaborar dos antígenos de adultos de **A.lumbricoides suum**:  
Completo de Adultos (CA) y secreciones y excreciones (ESA)

B).-Obtención y elaboración de antígenos gusanos adultos de  
**A.lumbricoides**

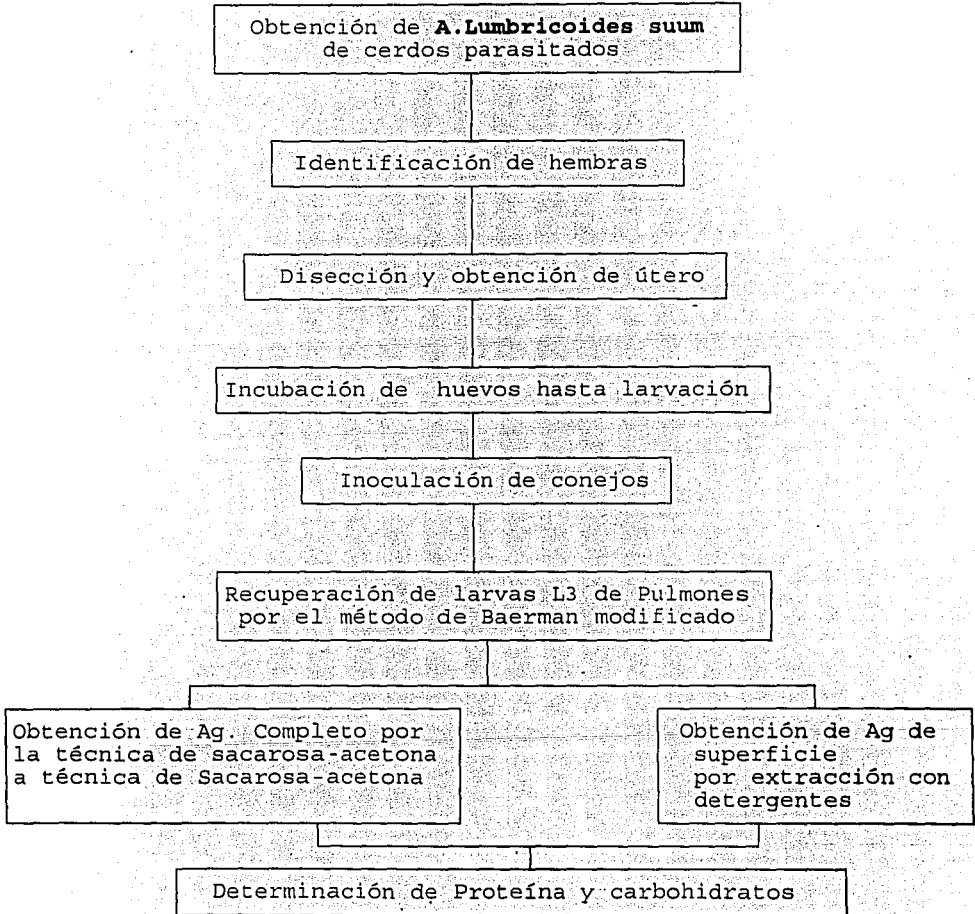




VI.- DISEÑO EXPERIMENTAL

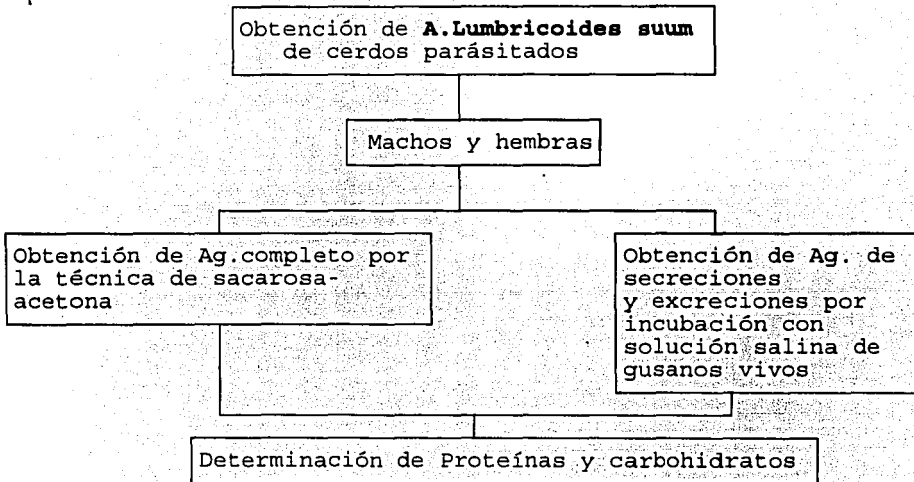
Objetivo 1.- Preparar dos antígenos de la fase larval L3 de **Ascaris lumbricoides suum**: superficie de larvas (SL) y completo de larvas (CL).

A).-Obtención y elaboración de antígenos larvales de **A.lumbricoides**



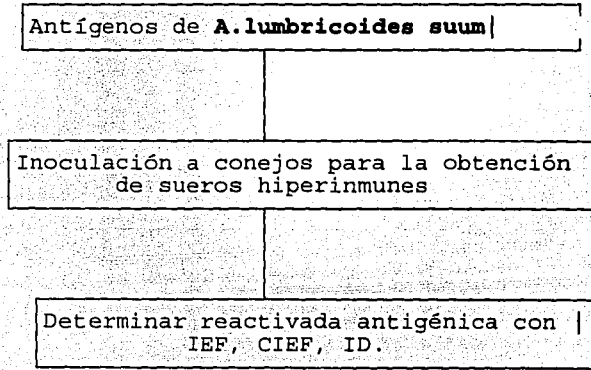
Objetivo 2.- Elaborar dos antígenos de adultos de **A.lumbricoides suum**:  
Completo de Adultos (CA) y secreciones y excreciones (ESA)

B).-Obtención y elaboración de antígenos gusanos adultos de  
**A.lumbricoides**



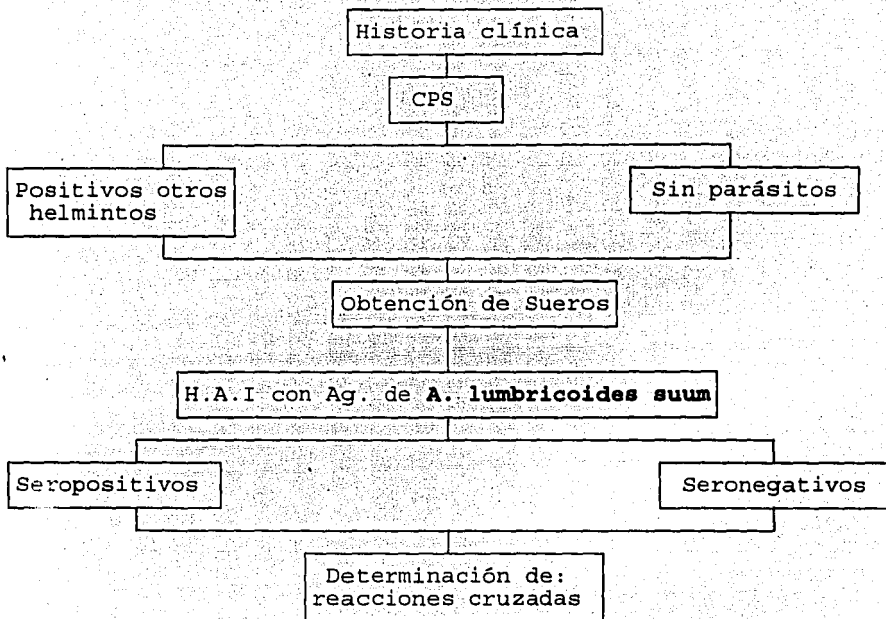
Objetivo 3.- Cuantificar la reactivada de los cuatro antígenos de **A.lumbricoides suum**, contra suero hiperinmune de conejos con ascariosis, mediante la técnica de hemaglutinación indirecta.

c) Reactivada de los antígenos.

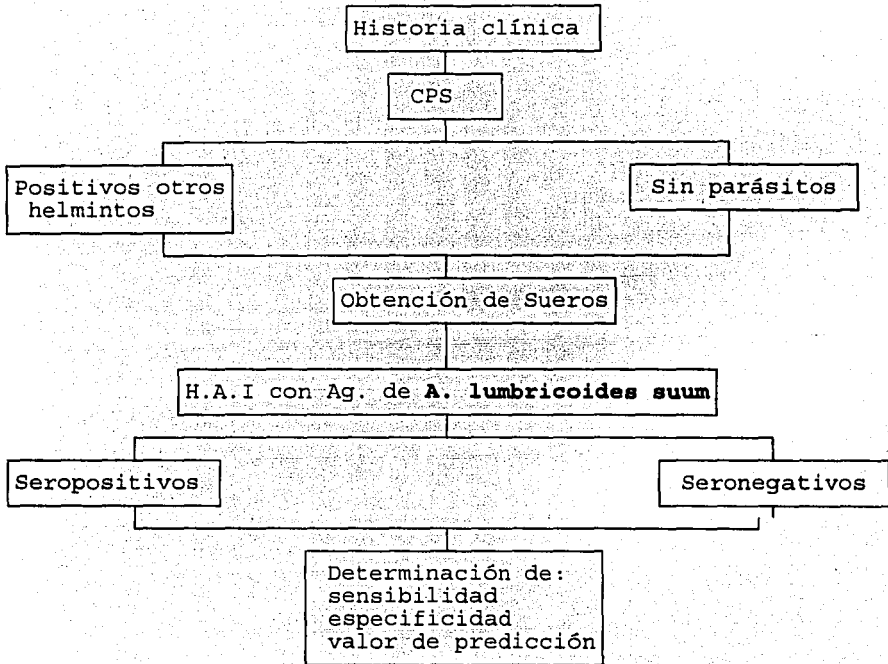


Objetivo 4.-Identificar reactivada cruzada de los cuatro antígenos contra suero de pacientes positivos a otras parasitosis tisulares.

d) Selección de pacientes



Objetivo 5.- Determinar sensibilidad y especificidad de los cuatro antígenos contra suero de pacientes positivos a **A.lumbricoides suum**  
e) Selección de pacientes



## METODOLOGIA

Los adultos de *A.lumbricoides suum*, se obtuvieron del intestino de cerdos sacrificados en el rastro de "Ferrería" de la Cd. de México, con los helmintos se formaron tres lotes.

### a). PREPARACION DE ANTIGENOS LARVALES.

Un lote constituido por gusanos adultos hembras, que se utilizaron después del lavado exhaustivo, con solución salina isotónica estéril 0.15 M y pH 7.2, posteriormente se expusieron durante una hora a la acción antimicrobiana de 1 mg de estreptomycin y 1000 U.I. de penicilina sódica cristalina por 100 ml de solución, se cortaron en pequeños fragmentos, para extraer del útero los huevos fecundados que se embrionaron in vitro, mediante la utilización de 100 ml de solución amortiguadora, Solución Buffer Fosfatos (PBS) pH 7.2 0.15 M, con formaldehído al 1% (Costello, 1961, Douvres, 1969). Se incubaron a 15 y 22°C, durante 3 a 4 semanas, hasta obtener huevos larvados, checando y aereando ocasionalmente la suspensión de huevos (Douvres, 1969, Douvres, 1971). Se infectaron 60 conejos New Zeland de 2 Kg. de peso mediante sondeo gástrico con 5000 huevos por animal; 7 días después de la infección se sacrificaron obteniendo los pulmones que se cortaron en pequeños fragmentos. Para obtener larvas del tercer estadio (L3) se utilizó el método de

Baerman modificado, que consistió en colocar los fragmentos de pulmón infectado en un frasco Virtis, agitar vigorosamente en rotor durante 15 minutos y posteriormente colocar los fragmentos en el dispositivo de Baerman, a intervalos de 10 minutos abrir la pinza y coleccionar el líquido, que se deja sedimentar en baño maría durante 10 minutos; del sedimento se obtienen entre 700 y 1000 larvas en cada cambio, de ésta manera se recuperaron alrededor del 90% de las larvas contenidas en los pulmones en un tiempo 5 veces menor al usado en el Baerman tradicional. (Martínez-López, 1986). Las larvas obtenidas se lavaron exhaustivamente con solución salina isotónica y antibióticos, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm para eliminar el sobrenadante; el paquete de larvas se almacena en congelación hasta su uso.

ANTIGENO COMPLETO DE LARVAS. Este se preparó por el procedimiento de sacarosa-acetona (CL). Este método descrito por Clarke y Casals en 1958 fue modificado por Beltrán, 1977. Para éste trabajo se utilizaron *A. lumbricoides suum* completos tanto de la etapa larval como de adultos machos y hembras, lavados, tratados con antibióticos y liofilizados. Por cada gramo de material liofilizado se agregó 100 ml de solución de sacarosa 0.25 M. Se homogenizó en baño frío a 0°C, hasta desaparecer el tejido. Este material se depositó en un frasco de boca ancha, que contenía 800 ml de acetona fría a -20°C; se dejó reposar en baño de hielo durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó una cantidad igual de

acetona y se dejó reposar durante una hora en baño de hielo, el procedimiento se repite pero ahora con 200 ml de acetona, luego se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos, se resuspendió en PBS pH 7.2 0.15 M frío y estéril en proporción de 40 ml por gramo de material inicial; la suspensión se colocó en un matraz y se dejó en agitación constante durante 16 horas en cuarto frío a 4°C. Se centrifugan a 5,000 rpm, en centrífuga refrigerada durante una hora, el sobrenadante se almacena en alicuotas hasta su uso e -20°C.

ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LARVAS (SL). Las larvas se colocaron en Desoxicolato de sodio al 20% en solución de Tris Doc 10 M pH 8.6, agregando un volúmen de esta solución a 4 volúmenes de larvas empacadas (0.1 ml de larvas + 4 ml de Solución de Tris Doc). Se incubó a 0°C durante 30 minutos con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C durante 20 minutos; el sobrenadante se utilizó como antígeno SL. (Almond, 1986, Parkhause, 1981, Soria, 1982), esté se dividió en alicuotas para su almacenamiento.

Objetivo 2.

B). PREPARACION DE ANTIGENOS DE GUSANO ADULTO.

Fueron usados dos lotes de gusanos adultos

Lote I.- Constituido por parásitos adultos hembras y machos que se lavaron exhaustivamente como se describió



anteriormente. despues fueron fragmentados y homogenizados en un Virtis, mediante el método de sacarosa-acetona se extrajo el antígeno que denominamos completo de adulto (CA). (Beltrán,1977).

Lote II.- Constituido por gusanos adultos machos y hembras, se lavaron igual que los del lote 1, pero en vez de fragmentar y homogenizar, se incubaron en solución salina isotónica 0.15 M y pH 6.4, durante 16 horas, en baño maría a temperatura de 37°C. y en obscuridad, la solución de la incubación se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se colectó el sobrenadante y a éste, lo denominamos antígeno de excreciones y secreciones de adulto (ESA).

Objetivos 3.

c).Reactividad de los antígenos in vitro.

Para la preparación de antisueros se utilizaron dos conejos New Zeland para cada uno de los antígenos utilizados, ajustando la cantidad de proteínas con el método de Lowry. Para la inmunización se utilizó la técnica de Smith y Hervert 1976, todos se sangraron previamente para asegurar su seronegatividad a los extractos. La inmunización se manejo de la manera siguiente:

1.-Primera semana.- 500  $\mu$ g de proteína en 0.5 ml de antígeno y 0.5 ml de adyuvante completo de Freund inoculado en el cojinete plantar derecho e intraperitonealmente.

2.-Segunda semana.- 500  $\mu$ g de proteína en 0.5 ml de antígeno y 0.5 ml. de adyuvante incompleto de Freund inoculado en el cojinete plantar izquierdo e intraperitonealmente.

3.-Tercera semana.- 500  $\mu$ g de proteína en 0.5 ml de antígeno y 0.5 ml. de adyuvante incompleto de Freund inoculado intraperitonealmente e intramuscularmente en múltiples sitios. Cinco días después se realizó sangrado para determinar presencia de anticuerpos.

Una vez preparados los antisueros se determinó la actividad antigénica de nuestros extractos a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo, mediante las siguientes pruebas de precipitación en gel.

Inmunodifusión (ID), Contraimmunoelectroforésis (CEF) e inmunoelectroforésis (IEF), se usaron los extractos a las diferentes concentraciones de proteínas que se obtuvieron no se manejaron diluciones: CA 1.770 mg/ml; ESA .280 mg/ml; SL .330 mg/ml y CL .520 mg/ml Los antisueros tampoco fueron diluidos para su uso.

Objetivo 4,5.

Determinar las reacciones cruzadas contra otros parásitos tisulares así como la sensibilidad, especificidad y el valor de predicción de la prueba.

El método coproparasitoscópico utilizado para la confirmación de la parasitosis intestinal fue el de Faust con dispositivo de concentración, el cual consistió en utilizar campanas de tipo Ferreira para tubos de 10 x 150 mm implementado por el Dr. Romero Cabello en el pabellón de pediatría del Hospital General de la Secretaria de Salud de la Cd. de México.

El estudio clínico se llevó a cabo en la consulta de parasitología del Hospital General de México S.S. mediante la entrevista indirecta de los pacientes. Los datos se concentraron en una hoja, o ficha personal que contenía los siguientes datos: Nombre, edad, sexo, lugar de procedencia y lugar de residencia. El estudio socioeconómico para determinar el nivel de los entrevistados, consistió en preguntar tipo de vivienda, disposición de excretas, y tipo de alimentación. En cuanto a los antecedentes patológicos de importancia se hizo hincapie en enfermedades parasitarias y antecedentes alérgicos, los signos y síntomas estuvieron

relacionados con los que se describen para la ascariosis intestinal y pulmonar. En la misma hoja de concentración de datos, se vaciaron los resultados obtenidos del laboratorio en la búsqueda de eosinofilia sanguínea, búsqueda del parásito en heces y detección de anticuerpos contra los diferentes antígenos utilizados en este trabajo.

La población utilizada para efectuar el trabajo presentó las siguientes características:

I.- Grupo problema.- Constituido por 42 niños tomados de la consulta externa del pabellón de Pediatría del Hospital General de la S.S. de México D.F., con edades que fluctuaron de los 10 meses a los trece años, y nivel socioeconómico bajo, todos ellos provenientes de la periferia de la ciudad, y con un dato que se consideró de gran importancia para los objetivos del trabajo, que era el ser CPS positivo en serie de tres únicamente a **A.lumbricoides**. Se les efectuó biometría hemática, para búsqueda de eosinofilia, no presentaron relación clínica clara con el cuadro parasitario.

II.-Grupo de no parásitados.- Constituido por 17 niños que presentaron las mismas variables anteriores pero negativos incluso a protozoos no patógenos, determinado esto mediante CPS de tres o más muestras; las madres de los niños negaron que éstos hubiesen eliminado parásitos en un período no menor

un año a la fecha de la toma de las muestras. Se le efectuó biometría hemática para búsqueda de eosinofilia. No se encontró relación con el cuadro parasitario.

III.- Grupo de parasitado a otros helmintos tisulares.- Fue de 39 niños que fueron serológicamente positivos en Hemaglutinación Indirecta a otras helmintiasis intestinales o tisulares diferentes a ascariosis.

La hemaglutinación indirecta que fue utilizada para probar los sueros de los individuos en estudio. En ella se emplean globulos rojos de carnero tratados con ácido tánico, de esta manera tiene mayor avidéz de sus glicoproteínas de membrana para la region Fc de las inmunoglobulinas IgM e IgG, haciendo la prueba altamente eficaz ya que ambas son adsorbidas en inmejorables condiciones por las glicoproteínas de los eritrocitos, por ello esta técnica se considera altamente sensible ya que detecta desde  $2\mu\text{g/ml}$  de concentración de proteínas, tiene la ventaja de que los resultados se interpretan a simple vista, es fácil de realizar y de bajo costo. Para cuantificar la presencia de inmunoglobulinas especificas presentes, se efectuan diluciones logarítmicas del suero, con cantidades constantes de una suspensión de glóbulos rojos sensibilizados con el antígeno correspondiente, la dilución más alta de suero que determine una clara aglutinación, se considera como

punto final de la reactividad y representa el título de la dilución. La prueba se realizó en placas de microtitulación. ( ).

#### EVALUACION ESTADISTICA SEROLOGICA

Esta se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Morrow 1982 y Galem 1976, en la teoría del valor de predicción en pruebas inmunológicas.

##### 1.-SENSIBILIDAD DIAGNOSTICA.

La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad. Se obtiene dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de casos que no tienen la enfermedad.

##### 2.-ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICA.

Esta dado por la proporción de verdaderos positivos (número de seronegativos que tienen la infección), obtenida dividiendo el número de verdaderos positivos entre el número total de casos que tienen la infección.

##### 3.-VALOR DE PREDICCIÓN PARA UN RESULTADO POSITIVO.

Esta dado por la prevalencia de la enfermedad en la población estudiada de tal manera que entre más alta sea la prevalencia mayor es la probabilidad de padecer está. Este valor se estimó dividiendo el número de verdaderos positivos entre el total de casos serologicamente positivos.

#### 4.-VALOR DE PREDICCIÓN PARA UN RESULTADO NEGATIVO.

Para este caso entre más baja sea la prevalencia mayor es la probabilidad de NO padecer la enfermedad si el resultado de la prueba es negativo. Este valor se estimó dividiendo el número de verdaderos negativos entre el número total de casos serológicamente negativos a la prueba.

#### 5.-REACTIVIDAD CRUZADA.

Proporción de sueros de individuos infectados con otros helmintos excepto *A.lumbricoides*, que fueron positivos a la prueba.

#### CRITERIO DE POSITIVIDAD.

Mediante la siguiente fórmula de probabilidad de aparición del fenómeno:  $X + 2S$

Donde X significa la media muestral y S la desviación estándar muestral.

La suma de la media más dos desviaciones estándar del grupo niños no parasitados observada para cada uno de los antígenos

El análisis estadístico se dio mediante tablas de contingencia de 2 X 2, tomando los criterios descritos arriba.

		HEMAGLUTINACION INDIRECTA		TOTAL
		Positivo	Negativo	
A S C	CPS +	a	b	a+b
A R I A	CPS -	c	d	c+d
S I S		a+c	b+d	a+c+b+d

\* Determinada por CPS

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

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c+d} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción positiva} = \frac{S(P)}{S(P)+b(P)} \times 100$$

$$\text{Valor de predicción negativa} = \frac{b(P)}{b(P)+c(P)} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de la prueba} = \frac{a+d}{a+b+c+d} \times 100$$

a= verdaderos positivos

b= falsos negativos

c= falsos positivos

d= verdaderos negativos

a+b= infectados

c+d= no infectados

a+c= seropositivos

b+d= seronegativos

P= Prevalencia de la enfermedad

S= Sensibilidad

E= Especificidad



## VII.-RESULTADOS

### A. Rendimiento proteínico de los extractos.

Antígenos	R e n d i m i e n t o		
	Concentración de proteínas mg/ml	gramos de peso seco	volumen extraído
CA	1.770	1.1	100 ml
CL	0.520	0.1	1.5 ml
SL	0.330	0.1	0.4 ml
SE	0.330	1.1	100 ml

La concentración de proteínas obtenida en los diferentes antígenos fue la siguiente:

Antígeno ESA.- Por cada 15 **A.lumbricoides** adultos de aproximadamente 25 cm de largo se obtuvieron 100 ml de antígeno, cuya concentración de proteínas fue de .330 mg/ml.

Antígeno CA.- Por cada gramo de peso seco de los parásitos adultos se obtuvieron 40 ml de antígeno, cuya concentración de proteínas fue de 1.770 mg/ml.

Antígeno SL.- Por cada 0.1 ml de larvas empacadas se obtuvieron .4 ml de antígeno cuya [ ] de proteínas fue de .330 mg/ml.

Antígeno CL.- Por cada 0.1 gramo de larvas empacadas se obtuvo 1.5 ml de antígeno con una concentración de proteínas de .520 mg/ml

Resultados de la reactividad de los antígenos. Se probaron de acuerdo a las especificaciones de Ourchelony, 1952

a).-Inmunodifusión.

En esta técnica el antígeno completo de adulto dió bandas de identidad cuando se probó contra antisueros obtenidos con antígeno de gusanos adultos y fue negativo para los antígenos larvales y de excreciones y secreciones de adulto. Se observó esta misma característica cuando los antígenos se probaron contra el antisuero larval ya que solo identificó a los antígenos de superficie de larvas pero no al resto de los antígenos.

b).-Contrainmunolectroforesis.

Con el antígeno completo de adulto se observaron dos bandas centrales cuando se probaron contra antisueros de gusano adulto y se identificó una banda con el antígeno de excreciones y secreciones de adulto en el ánodo, después se probaron los antígenos de larvas con éste mismo antisuero y se encontró que el de superficie de larvas dió una banda con tendencia hacia el ánodo y para el completo de larvas dos bandas también hacia el ánodo. Contra el suero hiperimmune larval no se observó ninguna banda para los diferentes antígenos del gusano adulto; pero sí una banda muy marcada

que rodea casi todo el pozo para el antígeno de superficie larval, no reconociendo bandas para el completo de larvas.

c).-Inmunoelectroforésis.

Con el antígeno completo de larvas se observaron dos bandas, una grande y otra pequeña en el ánodo cuando se probó contra el antisuero obtenido con antígenos del gusano adulto; con el antígeno completo de gusano adulto contra el antisuero correspondiente se observaron 8 bandas bien definidas de las cuales 5 estaban hacia el ánodo, una central y dos hacia el cátodo. Este mismo antisuero fue negativo para el antígeno de superficie larval.

Resultados de sensibilidad, especificidad y valor de predicción.

Todos los sueros se probaron con la técnica de hemaglutinación indirecta, utilizando para la misma, los cuatro antígenos de *A.lumbricoides suum* preparados. La sensibilización de los eritrocitos utilizados en la prueba no se llevó a cabo en la forma tradicional en la que el título del antígeno ante un suero conocido, es el que se toma en cuenta para demostrar la reactividad del mismo, independientemente de la cantidad de proteínas que contenga; en nuestro caso se estandarizaron a 22.5 microgramos por mililitro de proteína de antígeno.

La dispersión de los títulos de anticuerpos obtenidos en cada uno de los 59 sueros (de paciente infectados y control negativo) estudiados en la prueba de hemaglutinación indirecta, se presentan en el cuadro 6. De acuerdo al criterio de positividad calculado para cada antígeno, se realizaron los siguientes títulos de corte, para determinar la reactividad de los antígenos:

Completo de larvas	1:16
Superficie de larvas	1:16
Completo de adulto	1:32
Excreciones y secreciones de adulto	1:16

Se encontró la positividad serológica en Hemaglutinación indirecta, con un alto porcentaje para los diferentes antígenos de *A. lumbricoides suum* en los sueros de individuos infectados con este parásito con n=42, se debe tomar en cuenta que la sensibilidad y especificidad encontradas en nuestros resultados son nosológicas, para el paciente y no analíticas para la prueba en sí, ya que la sensibilidad y especificidad diagnóstica pueden revelar algo sobre la prueba que se está aplicando, pero más que nada son utilizadas para confirmar el diagnóstico de un paciente del cual se conoce sobre su estado patológico o su cuadro clínico.

Se determinó el valor de predicción negativo y positivo, ya que éstos, estimarán la posibilidad de enfermedad, considerando los resultados obtenidos en la prueba, y la

prevalencia de la enfermedad en la población estudiada. De tal forma que en la tabla 1 se encontró que el antígeno de superficie de larvas, con la técnica de hemaglutinación indirecta en pacientes infectados con *A. lumbricoides* tiene una sensibilidad del 80.95%, una especificidad diagnóstica del 100%, y de acuerdo a los valores de predicción encontrados, cada prueba positiva efectuada con este antígeno, indica la posibilidad de enfermedad en un 100% de los casos. Si un suero sale negativo, tiene solo un 8% de posibilidad de que sea un falso negativo.

TABLA No 1

ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LARVAS				
H E M A G L U T I N A C I O N				
A S C A R I A S I S		Positivo	Negativo	TOTAL
	CPS +	34	8	42
	CPS -	0	17	17
	TOTAL	34	25	59

Sensibilidad = 80.95%  
 Especificidad = 100.0%

El antígeno completo de larvas presentó, sensibilidad del 52.38% y especificidad diagnóstica del 88.24%; sin embargo los valores de predicción de la enfermedad están muy por debajo de los encontrados con el otro antígeno larval, ya que en éste se señala que por cada prueba positiva efectuada con este antígeno, indica enfermedad solo en un 96.31% de los casos, y da la posibilidad de falsos negativos en el 22.16% de la población estudiada. (tabla 2).

TABLA No 2

ANTIGENO COMPLETO DE LARVAS					
HEMAGLUTINACION					
ASCARIASIS		Positivo	Negativo	TOTAL	
	CPS +		22	20	42
	CPS -		2	15	17
TOTAL		24	35	59	

Sensibilidad = 52.38 %

Especificidad = 88.24 %

En las tablas 3 y 4, se observa que con los antígenos del gusano adulto se encontraron cifras que indican que tanto la sensibilidad como la especificidad diagnóstica estas muy por debajo de los encontrados para los antígenos larvales y es de llamar la atención que esto mismo se refleja en la predicción para la enfermedad, ya que para el antígeno completo de adulto por cada prueba positiva que encontremos, solamente un 88.39% estaría indicando enfermedad, o sea que habrá un mayor número de falsas positivas (34.39%). Con los antígenos de excreciones y secreciones de adulto el problema se acentúa ya que para cada prueba positiva solo encontramos un 78.11% y la posibilidad de falsos negativos que es del 43.20%, nos está indicando enfermedad en el total de los casos estudiados.

TABLA No 3

ANTIGENO COMPLETO DE ADULTO				
H E M A G L U T I N A C I O N				
A S C A R I A S I S		Positivo	Negativo	TOTAL
	CPS +	16	26	42
	CPS -	5	12	17
TOTAL	21	38	59	

Sensibilidad = 38.2 %  
 Especificidad = 70.59 %

TABLA No 4

ANTIGENO EXCRECIONES Y SECRECIONES DE ADULTO				
H E M A G L U T I N A C I O N				
A S C A R I A S I S		Positivo	Negativo	TOTAL
	CPS +	3	39	42
	CPS -	2	15	17
TOTAL	5	54	59	

Sensibilidad = 7.14%  
 Especificidad = 88.24%



TABLA 5

ACTIVIDAD SEROLOGICA EN HEMAGLUTINACION INDIRECTA CONTRA DIVEROS EXTRACTOS DE <i>A. lumbricoides suum</i>				
SUEROS DE PACIENTES	ANTIGENOS			
	% SL	% CL	% ESA	% CA
INFECTADOS N= 42	34 (80.95)	22 (52.38)	3 (7.14)	3 (7.14)
PARENTEMENTE SANOS N=17	0 (0)	2 (11.76)	3 (7.14)	2 (11.76)

Resultados de la reactividad cruzada

Para la determinación de seropositividad cruzada con la prueba de hemaglutinación indirecta contra los diversos extractos antigénicos de *A. lumbricoides*, se utilizaron 33 sueros de individuos infectados con diferentes helmintos tisulares que fueron los siguientes:

<i>Trichinella spiralis</i>	(16 sueros)
<i>Toxocara canis</i>	(14 sueros)
<i>Fasciola hepatica</i>	( 3 sueros)

Los porcentajes dados para cada uno de los sueros, representan, las reacciones cruzadas encontradas en relación con el tipo de extracto antigénico de *A. lumbricoides* utilizado en la

prueba; así observamos que los antígenos larvales presentaron menos reacciones cruzadas que lo observado con los antígenos de gusanos adultos; es importante señalar que los sueros positivos a *Trichinella spiralis* no reconocieron a los antígenos de *A.lumbricoides suum*. También es importante señalar que el antígeno SL no presentó reacciones cruzadas con los sueros de pacientes infectados con otros helmintos tisulares. (Tabla 6).

TABLA 6

REACCIONES CRUZADAS CONTRA ANTIGENOS DE <i>A. lumbricoides suum</i>				
SUEROS DE PACIENTES	ANTIGENOS			
	% SL	% CL	% ESA	% CA
SANOS N= 17	0 (0)	2 (11.76)	3 (17.64)	2 (11.76)
INFECTADOS Ts N=16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
INFECTADOS Tc (n=14)	0 (0)*	3 (21.42)	5 (35.71)*	3 (21.42)
INFECTADOS Fh (n=3)	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)

Ts= *Trichinella spiralis* Tc= *Toxocara canis* Fh= *Fasciola hepatica*.

Los resultados se sometieron a la prueba estadística de CHI CUADRADA, para determinar su significancia estadística en éste trabajo, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: La prueba se realizó con los sueros control negativo, contra los sueros infectados con otros helmintos tisulares. Se le dió un grado de libertad. Se encontró que para los antígenos larvales hay significancia estadística para su uso diagnóstico, éste no es el caso para los antígenos del gusano adulto ya que su comportamiento es diferente. Es importante destacar que el antígeno SL fue el que presentó los mejores resultados. Estos resultados estan de acuerdo

a los obtenidos en relación a sensibilidad y especificidad (Tabla 7).

TABLA 7

CHI CUADRADA DE LOS DIVERSOS GRUPOS CONTRA LOS EXTRACTOS ANTIGENICOS DE <i>A.lumbricoides suum.</i>				
SUEROS DE PACIENTES	ANTIGENOS			
	SL	CL	ESA	CA
SANOS N= 17	0.001	0.005	1	0.5
INFECTADOS Ts N=16	0.001	0.01	1	1
INFECTADOS Tc N=14	0.05	0.05	1	0.99
INFECTADOS Fh N=3	0.025	0.1	1	0.75

Ts= *Trichinella spiralis* Tc= *Toxocara canis* Fh= *Fasciola hepatica*.

\* significancia estadística.

De acuerdo al método del valor predictivo, los resultados encontrados cuando se prueba una técnica serológica en una población escogida, con las características descrita para los sueros problema, contra los sueros de individuos que tienen la misma predisposición a padecer la enfermedad pero que no la presentan en ese momento; con este método estadístico además de la sensibilidad y especificidad, se estima la posibilidad de enfermedad considerando el resultado de la prueba, de tal manera que esto último es de vital importancia cuando se trata de

establecer un diagnóstico. Es decir que mientras la sensibilidad es cualidad de una técnica; la especificidad es cualidad de la respuesta inmunogéna del huésped, los valores de predicción son determinados por la ejecución de la prueba y la prevalencia de la enfermedad en la población de pacientes en estudio; en éste caso se observó que el antígeno de superficie de larvas, da datos del 80.95% de sensibilidad, lo cual significa que con esta técnica y el antígeno SL los resultados son altamente confiables; si el estudio se desea hacer en población abierta utilizando este antígeno, pues el valor predictivo para casos positivos es del 100% y para casos negativos del 68%, lo cual nos da una gran confiabilidad diagnóstica, y significativamente diferente que con el resto de los antígenos probados. (tabla 8).

TABLA 8

POBLACION DE PREVALENCIA ALTA				
ANTIGENOS	% SENSIBILIDAD	% ESPECIFICIDAD	% VALOR DE PREDICION POSITVA	% VALOR DE PREDICION NEGATIVO
SUPERFICIE DE LARVAS	80.95	100	100	8
COMPLETO DE LARVAS	52.38	88.24	96.31	22.16
COMPLETO DE ADULTOS	38.0	70.58	88.0	34.39
EXCRESIONES Y SECRESIONES DE ADULTO	7.14	88.24	78.11	43.20

## VI.-DISCUSION.

Cada vez quedan más lejos los conceptos que afirmaban, que la cutícula de los nemátodos es una estructura inerte, cuya función es solo la de un exoesqueleto (Lumsden 1975) y cada día son más los trabajos que apoyan que se trata de una estructura dinámica de esta superficie (Maizels 1984, Philipp 1984) que mantiene una interacción estrecha con los mecanismos inmunitarios del huésped (Almond and Parkhouse 1986). Los antígenos larvarios de superficie y somático completo, presentan diferencias marcadas de sensibilidad y especificidad, al ser utilizados en éste trabajo, esto posiblemente se deba a que los antígenos desprendidos de la superficie de la larva, tienen componentes estructurales que funcionan como epítopes específicos para la activación de la respuesta inmune durante la fase migratoria del parásito en el huésped.

Esta podría ser una de las causas por la que los antígenos de gusanos adultos, en ésta prueba demostraron una alta sensibilidad pero muy pobre especificidad, durante el corrimiento de la prueba; los trabajos de Smith, 1983, demostraron que a medida que se va desarrollando la etapa adulta de un parásito, es mayor la cantidad de componentes antigénicos que presentan, esto hace que los antígenos de los mismos, no sean los adecuados para el serodiagnóstico en humanos.

Dentro de una población con prevalencia alta para una parasitosis, se observan diferencias clínicas, las cuales dependen de la respuesta a la infección de las personas en cada estadio del parásito, por esta razón, el diagnóstico sintomático de las parasitosis tisulares se efectuó con base en el criterio clínico, parasitológico o inmunológico. De acuerdo a la OMS 1975, las pruebas de inmunodiagnóstico, deben ser cuantitativas con respecto a sensibilidad y especificidad, para poder definir los riesgos a los que está sometido el paciente durante las diferentes etapas migratorias del parásito. Los antígenos que se probaron en pacientes con alta incidencia de ascariosis, el valor de predicción calculado para la prueba de hemaglutinación indirecta con los diferentes antígenos de **A. lumbricoides suum**, tanto para un resultado positivo como para un negativo, puede considerarse bueno sobre todo el obtenido para el antígeno de superficie de larvas, cuyo valor de predicción para casos positivos fue 100%, de acuerdo a la técnica matemática de predicción de Galem 1983, Voller y Savigny 1981.

La inespecificidad de los estudios aplicados al serodiagnóstico de la ascariosis, son atribuidas a la gran cantidad de reacciones cruzadas, Voller, 1981, dice que este término frecuentemente se ha utilizado como sinónimo de sensibilidad en la valoración de la utilidad de las pruebas para inmunodiagnóstico y señala que la reactividad cruzada está influenciada por la sensibilidad del ensayo, la cual puede variar independientemente de éste, ya que es una función

dependiente de la especificidad del antígeno. Los resultados obtenidos en este estudio confirman ese concepto ya que la reactividad cruzada que se presentó en la prueba de inmunodiagnóstico de la ascariosis para cada uno de los antígenos larvales utilizados, fueron cifras muy diferentes a las encontradas en relación con los antígenos de adulto, los cuales demostraron no sólo reacciones cruzadas entre estadios sino también entre especies. Es importante hacer mención que se presentaron reacciones cruzadas con sueros positivos a **T. spiralis** lo cual difiere de los resultados encontrados por Smith y col. 1983. Algunos autores como Forsyth en 1981, demostraron con antígenos de superficie de microfilarias de **Onchocerca gibsoni**, que los de mayor peso molecular, eran los que presentaban mayores reacciones cruzadas, cuando se probaron con sueros de pacientes con infecciones de otras filarias, e incluso por tremátodos. También demostraron que proteínas más pequeñas podían no solo ser especie específica sino también estadio específico. Resultados parecidos encontró Philip, 1984, al buscar proteínas potencialmente diagnósticas en el gusano adulto de **Onchocerca volvulus**, marcado en su superficie con <sup>125</sup>I, y separadas por cromatografía de columna los diferentes componentes de su antígeno de superficie, identificaron una proteína de 20 kDa, que tenía especificidad del 98% a la prueba y sensibilidad del 92%, estos sueros de pacientes de dos poblaciones diferentes.

Nuestros resultados establecen que los antígenos larvarios de **A. lumbricoides suum**, a diferencia de los antígenos del gusano



adulto son de gran utilidad para el diagnóstico serológico de la infección; ésto probablemente se deba a que fueron obtenidos de larvas L3, el cual es uno de los estadios que se encuentra en contacto con uno de los órganos blanco del huésped, el pulmón.

En cuanto a las reacciones cruzadas observadas con los antígenos larvales, llama la atención que con el antígeno completo de larvas, los resultados también coinciden con los de sensibilidad encontrados para el antígeno superficie de larvas, esto concuerda con lo estipulado por Aljebooriand Ivey, 1970, quien dice que para tener altos títulos de especificidad en una prueba serodiagnóstica como la hemaglutinación indirecta, basta con utilizar los antígenos involucrados en la etapa de desarrollo del parásito. Son importantes los trabajos realizados en este mismo rubro por Maizels, 1984, con antígenos de *Toxocara canis*, en los que demuestra, que la especificidad a un antígeno del parásito con la técnica de ELISA la cual es más sensible que la hemaglutinación indirecta, no es solamente determinada por la prueba en sí, sino también por el antígeno, que debe ser especie-estadio-específico, y entre más purificado sea éste, mayor será la especificidad de la prueba, ya que la sensibilidad y especificidad dependen en gran medida del sistema antígeno-anticuerpo utilizado.

Estudios realizados por Kennedy, 1989, demostraron que probablemente el cruzamiento entre los diferentes antígenos de nemátodos, que filógenéticamente están relacionados, como *A. lumbricoides lumbricoides*, *A. lumbricoides suum* y *T. canis* se

debe a que comparten una proteína común de 14,000 daltons, que es reconocida por los antígenos de superficie y de excreciones y secreciones de los tres parásitos.

Durante el desarrollo experimental de este trabajo, se tuvo la oportunidad de efectuar dos ensayos con éstos mismos antígenos, el criterio de positividad fue del laboratorio de Inmunoparasitología del Depto. de Microbiología y Parasitología de la Fac. de Medicina de la UNAM. Dos niños del servicio de infectología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", que presentaban un cuadro clínico neumónico, con presencia de eosinofilia alta en sangre periférica y cultivos negativos a los gérmenes que habitualmente provocan estos cuadros neumónicos. A los pacientes se les había realizado CPS en serie, con resultados negativos a *A.lumbricoides*, no presentaban antecedentes de asma bronquial y el cuadro no cedía con el uso de antibióticos. Se les tomó una muestra de sangre y el suero fue procesado contra los diferentes antígenos de *A.lumbricoides*, el resultado mostró sensibilidad y especificidad muy marcada a los antígenos larvales fue positivo 1:16 para el antígeno completo de larvas. El antígeno que mostró su gran utilidad en la prueba fue el de superficie de larvas, ya que dió positivo hasta título de 1:1024. Dieron resultados negativos a los antígenos de algunos helmintos tisulares como *Trichinella spiralis*, *Toxocara canis* y *Fasciola hepatica*, así como también a los antígenos del gusano adulto. A estos niños se les dió tratamiento conservador a base de antihistamínicos, cediendo su cuadro clínico en 7 días, sin

antibióticos de ninguna especie. Se les cito a la semana y 2 meses después se les practicaron coproparasitoscópicos en serie, encontrándose positivo a *A. lumbricooides*.

La oportunidad de utilizar los antígenos en estos dos casos aportan evidencias directas de la utilidad del inmunodiagnóstico en la ascariosis pulmonar. Resulta pues difícil pensar que éstos resultados reflejen simplemente reacción de falsas positivas.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## CONCLUSIONES

1.- Los antígenos que demostraron mejor reactividad para la prueba fueron los larvales. De estos el antígeno de superficie de larvas es el que demostró gran utilidad para el diagnóstico serológico.

2.- Los antígenos de gusanos adultos son más fáciles de obtener, pero queda demostrado una vez más su escasa especificidad en serología.

3.- Queda demostrado que para hacer estudios seroepidemiológicos, serían de gran utilidad los antígenos larvales pues ellos son más especie específicos y darán un bajo porcentaje de falsas positivas, en poblaciones de alta incidencia.

4.- La técnica serológica utilizada, (Hemaglutinación Indirecta), puede ser de gran apoyo en un estudio epidemiológico, ya que demostramos que utilizando el antígeno apropiado nos permite obtener alta sensibilidad, además de su bajo costo, y su fácil metodología.

5.- Este antígeno larval de superficie puede tener gran utilidad para el diagnóstico en áreas clínicas como la alergología y la neumología para el diagnóstico de cuadros de asma bronquial y neumonías, por ascariosis.

## REFERENCIAS

**Ambroise TP.** Immunoparasitología origen, estado actual y perspectivas. Bol Sanit Panam 1986;101(3):

**Almond NM.** and Parkhouse RME. Immunoglobulin class specific response to biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis*. Parasite Immunology 1986,8,391-406.

**Almond NM, Mc Claren DS and Parkhouse RME.** A comparison of the surface and secretion of *T. pseudoespiralis* and *T. spiralis*. Parasitol 1986; 93: 163-173.

**Beltrán HF, Gómez PA y Figueroa VV.** Preparación de antígenos mediante el método de Sacarosa acetona. Salud pública de México 1977; 3: 421-430.

**Brudastous AN, Cemelev VR, Kholnukhanedow SK and Krasnos LN.** The clinical pictures of the migration phase of ascaris in self infectivity. Medskaya Parazitol 1970; 40: 165-168.

**Cohen and Sadun EH.** Immunology of parasitic infections. Ed Blackwell Scientific Publications. Cap. Serodiagnostic of other Helminth infections. 1974. 152-155.

**Cheng TC.** Nematoda General Parasitology. Ed Academic Press. 1974. 586-622.

**Costello LCA.** Simplifid Isolation of ascaris eggs. Journal of Parasitology 1961; 47: 24.

**Dobson C, Rockell JH and Soulsby EJC.** Immunoglobulin E antibody in Guinea pigs, characterization of monomeric and polymeric components. J Immunol 1981; 107: 1431.

**Douvres TW, Tromba FG and Malakatis GM.** Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* developing to fourth stage in swine. J Parasitol 1969;55:689-712.

**Douvres TW and Tromba FG.** Comparative development of *Ascaris suum* in rabbits, ginea pings and swine in 11 days. Proc. Helminthal-Soc. Wash 1971;38: 246-252.

**Galen RS.** New Math in the laboratory. Predictive value theory. John Wiley and Son, New York 1983; 335-343.

**Hogartt-Scott RS.** The molecular weighth range of nematode alergens. Immunology 1967; 13: 535.

**Jeska EC.** Purification and Immunochemical analysis of genus specific cuticular antigens of *Toxocara canis*. J Parasitol 1969; 55: 465-471.

**Johannson SGO, Mellbin T, and Vahlquist B.** Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E. Lancet 1(7552): 1118.1968.

**Jourbet JR, Klerk HC and Malan C.** *Ascaris lumbricoides* and allergic asthma new perspective. Afr Med J 1979; 56: 599-602.

**Justus DE, Ivey MH.** Chitinase activity in developend stage af *Ascaris suun* and it inhibition by antibody submethod to. J Parasitol 55 (3):472-476.1969.

**Faust EC, Russell PF and Jung RC.** Parasitología Clínica. Ed Salvat. Cap. Helmintos e infecciones helmínticas. 1974. 335-343.

**Forsyth KP, Copeman DB, Anders RF, Mitchell GF.** The Major radioiodinated of *Onchocerca gibsoni* microphilariae are neithers species nor onchocerca specific. Acta Trop (Bazel) 1981; 38: 343-352.

**Gutiérrez QM.** Diagnóstico inmunológico de la cisticercosis. Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México. 1989. Consejo Nal. de Ciencia y Tecnología. Noriega Editores, Ed. Limusa. 175-178.

**Katz SP, Lammie PJ.** Effect of cycle phosphamide on the immune responsiveness of jirds infected with *Brugia pahangi*. Infect Immun 1984; 43 :753-755.

**Kennedy MW, Qureshi F, Fraser EM, Halwell-Elkins M, Elkins DB, Smith HV.** Antigenic relationships between the surface exposed secreted somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis*. Clin Exp Immunol 1989;75 (3): 493-500.

**Loury OH, Rosenbroug NJ and Farr AC.** Protein Measurement With Folin Phenol reagent. J Biol Chem 1952; 193: 265-275.

**Lumsden DL.** Surface ultraestructure and cytochemistry of parasitic helminths. Exp Parasitol 1975; 37: 267-339.

**Maizels RM, De Savigny D, Ogilvie BM.** Maizels RM, De Savigny D, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory antigens of *Toxocara canis*, infective larvae. Parasite Immunol 1984; 6 : 23-37.

**Maizels RM, Philip M, Dasgupta A, Partono F.** Human serum albumins is a major componenton the surface microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. Parasite Immunol 1984; 6: 185-190.

**Martínez LMC, Gómez PA, Gutiérrez QM.** Técnica rápida y simple para la obtención de larvas L3 de *Ascaris suum*. Memorias del VII Congreso Nacional de Parasitología, Puebla, México. 1986.

**Morrow RH.** Diagnostic measure us tropical diseases epidemiological perspectives report an of informal consultations of further developed diagnostic methods for tropical disease UND/WORD BANCK/WHO special programme for research and training in tropical disease. 1980. 39-43.

**Ouchterlony O.** Diffusion in gel methods for immunologycal analysis II in Progress in allergy (Ed. kollos P Waksman B H) Karger basel and New York. 1952.

**Parkhouse RME, Phillip M and Ogilve BM.** Characteritaton of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larval parasites. Immunology 1981; 3: 339-352.

**Phillip M, Parkhouse RME and Ogilve BM.** Changing proteins on the surface of parasitic nematodes. Nature London 1980; 287: 538-540.

**Phillip M, Taylor PM, Parkhouse RME and Ogilve B.** Immune response to stage specific surface antigens of the parasitic *Trichinella spiralis*. J Exp Med 1981; 154:210-215.

**Phillip M, Gómez PA, Parkhouse RME, Davies ML, Clark NWT, Ogilve BM and Beltrán HF.** Identification of an antigen of *Onchocerca volvulus* of possible diagnostic use. Parasitology 1984; 84:295-310.

**Sadun EH.** In Immunity to animal parasites. Ed Soulsby E JL. Acad Press. 1972. 97-129.

**Salazar SPM, Haro AI.** Helmintos intestinales. Manual de Técnicas Morfológicas de las Parasitosis. Ed. Fco. Méndez Cervantes, 1a.Ed. 1980

**Soria AC and Dusanic DC.** Inmunización a *Trypanosoma cruzi* con antígenos tratados con detergentes. Rev Ecuatoriana de Med y Ciencias Biológicas 1982; 18: 77-89.

**Soulsby EJC.** In section cell mediated immunity response in parasitic. Immunity to Animal Parasites. Ed Acad Press. 1972. 83-85.

**Soulsby EJC.** Reaction of the host to parasites. Ed Soulsby E J C. Germany. 1968. 211-215.

**Schmidt GD, and Roberts LS.** Fundamentos de Parasitologia. Ed C.E.C.S.A. Cap Phylum Nematoda. 1984. 415-455.

**Smith HB, Quinn R, Bruce RG and Girsgood WA.** Antigenic heterogeneity in some ascaroidea (nematoda) of medical importance analyses of adult nematodes. Acta Parasit Pol 1983; 48: 459-465.

**Smith HV, Herbert LV.** The immune response of pigs to infection with the stomach worm *Hyostromylus rubidus* I. antibody production in response to primary infection. Vet Parasit 1976; I : 327-335.

**Stites DP, Stobs SD.** Pruebas inmunológicas de laboratorio de inmunología básica y clínica. Ed Manual Moderno. México. 1988. 235-280.

**Stromberg BE.** The insolation and partial characterization of a protective antigen from developing larvae of *Ascaris suum*. Inter J Parasitol 1979; 9: 307-311.

**Tay J, Salazar SPM, De Haro I y Ruiz AL.** Frecuencia de las protozoosis en México. Sal Públ Méx 1978; 20: 297-337.

**Torres P and Barriga OO.** Intra and inter specific antigenic relationships among some ascaroidea. Acta Parasitic Pol 1975; 23: 441- 451.

**Uberlarker JE and Allison UF.** Scanning electron microscopy of denticles and eggs of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* in arceneaux cj. Ed Thirtieth annual proceeding of the electron microscopy Society of American Clartor's Public 1972.

**Voller A and Savigny D.** Diagnostic serology of tropical parasitic disease. J Immunol Meth 1981; 46: 1-29.

**Williams JE, Soulsby EJC.** Antigenic analysis of developed stage of *Ascaris suum*. Comparison of eggs larvae and adult. Exp Parasitol 1970; 27: 150-156.

**World Health Organization.** Memorandum. Parasites antigens. Bull WHO 1975; 52: 237-249.