

104
2e).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

"DETECCION DE ANTIGENOS EN
SUERO Y ORINA DE INDIVIDUOS
ONCOCERCOSOS POR UN
ENSAYO INMUNOENZIMATICO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUIS LEONCIO RENDON GONZALEZ



258656

MEXICO, D.F.

1998

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

TESIS
DETECCION DE ANTÍGENOS EN SUERO
Y ORINA DE INDIVIDUOS ONCOCERCOSOS POR UN
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO
PRESENTA

Luis Leoncio Rendón González

MEXICO, D.F.

1998

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Acosta Segura Magdalena
Vocal	Prof. Velasco Castrejón Oscar
Secretario	Prof. De León Chapa Saturnino
1er. Suplente	Prof. Gutiérrez Ramos Abel
2do Suplente	Prof. Becerril Flores Marco Antonio

Trabajo Realizado en:

Centro de Investigaciones y Estudios del Sureste, San Cristóbal de las Casas, Chiapas

Asesor:

QFB. Magdalena Acosta Segura

Sustentante:

Luis Leoncio Rendón González.

INDICE

Indice	3
--------------	---

INTRODUCCION

Introducción.....	6
-------------------	---

CAPITULO I

Generalidades sobre la parasitosis

1.1.- Clasificación del parásito y antecedentes históricos	8
--	---

1.2.- Ciclo biológico y morfología de <i>O. volvulus</i>	9
--	---

1.3.- Ciclo vital del vector.....	11
-----------------------------------	----

1.4.- Epidemiología y distribución geográfica

de la oncocercosis	15
--------------------------	----

1.5.- Patología y patogénesis de la oncocercosis	20
--	----

1.6.- La respuesta inmunogénica.....	25
--------------------------------------	----

1.7.- Métodos de diagnóstico	28
------------------------------------	----

1.8.- El ensayo inmunoenzimático EIA

("Enzimatic Immuno Assay").....	29
---------------------------------	----

<u>Hipótesis</u>	30
------------------------	----

El ELISA modificado de doble anticuerpo.....	31
--	----

Diagrama de trabajo	32
---------------------------	----

CAPITULO II

Material y Métodos.

2.1.- Muestras de sueros y de orinas de individuos

oncocercosos.	33
--------------------	----

2.2.- Cuenta de microfilarias en biopsias de piel.	34
---	----

2.3.- Obtención de los antígenos purificados de <i>O. volvulus</i>	34
---	----

2.4.- Obtención de los anticuerpos.....	37
2.5.- Preparación de los conjugados	39
2.6.- Estandarización del ELISA indirecto.....	40
2.7.- Estandarización del ELISA modificado de doble anticuerpo, para detectar antígenos de <i>O. volvulus</i>	43
2.8.- Curvas estándar para la detección de antígeno de <i>O. volvulus</i> en suero y en orina, por ELISA modificado de doble anticuerpo	45
2.9.- Detección de los antígenos de <i>O. volvulus</i> en sueros y orinas de los oncocercosos.....	46
2.10.- Cálculo de sensibilidad y análisis estadístico.....	46
<u>CAPITULO III</u>	
Resultados	
3.1.- Resultados de la cuenta de microfilarias en las biopsias de piel de los individuos oncocercosos.....	53
3.2.- Curvas estándar	54
3.3.- Detección de antígenos de <i>O. volvulus</i> en muestras de suero y de orina de oncocercosos.....	55
3.4.- Resultados del cálculo de sensibilidad y análisis estadístico:.....	57
<u>DISCUSION</u>	63
<u>CONCLUSIONES</u>	67

APENDICE

Preparación de anticuerpos: esquemas de inmunización.....	68
Purificación de anticuerpos.....	70
Amortiguadores.....	71
<u>REFERENCIAS</u>	74

INTRODUCCION

INTRODUCCION:

La oncocercosis presenta dos problemas a resolver: la detección de los individuos parasitados y el desarrollo de medicamentos eficaces para el control y erradicación de la enfermedad [24,27].

En la última década se experimentó con un nuevo medicamento larvicida denominado Ivermectina, que es una lactona macrocíclica semisintética la cual tiene menos efectos adversos que la dietilcarbamacina (DEC), el medicamento tradicional [13,60]. En México y Centro América se han completado las cuatro fases de los estudios farmacológicos de la Ivermectina [13,64] y actualmente se administra gratuitamente con el nombre de Mectizan® ya que la compañía que lo desarrolló y lo produce, lo dona para su distribución a nivel mundial a los programas para el control de la oncocercosis, por medio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [51]. Los resultados demuestran la eficacia de la Ivermectina para aliviar los síntomas [13,51,52] y una disminución del 60% en la tasa de incidencia de la oncocercosis hacen pensar que será posible la erradicación de la enfermedad en la próxima década [50].

El diagnóstico de la oncocercosis se hace mediante biopsias de piel en donde se buscan las microfilarias [34,63]. Una prueba diagnóstica menos traumática, podría ser la detección de anticuerpos, pero se tiene el problema de la falta de especificidad y además no evalúa el estado actual de la parasitosis.

Por lo tanto, la otra posibilidad es la identificación de antígenos del parásito en la sangre o en la orina de los oncocercosos, aquí el principal problema es obtener un antígeno específico que no cruce con otros parásitos y se pueda preparar en cantidades suficientes para producir el anticuerpo específico.

Gómez-Priego reportó la detección de anticuerpos anti *O. volvulus* en suero de oncocercosos con la prueba de Dig-Elisa, que se realiza en placas con agar que contiene el antígeno del parásito obtenido de nódulos preservados en glicerina [25,26]. Schlie y Rivas detectaron antígeno de *O. volvulus* en el suero y la orina de oncocercosos por la técnica ELISA indirecta. Para preparar los anticuerpos que usaron en la prueba, obtuvieron también el antígeno a partir de nódulos preservados en glicerina [54]. Estos trabajos dieron la pauta para utilizar esta fuente de antígeno y preparar los anticuerpos policlonales que se utilizaron en el presente trabajo para la estandarización de un ensayo inmunoenzimático modificado de doble anticuerpo, que puede detectar cuantitativamente el antígeno de *O. volvulus* en suero y orina. Como perspectiva al futuro, el método se podrá optimizar utilizando antígenos más específicos como son los antígenos de DNA recombinante para la obtención posterior de anticuerpos monoclonales [8].

CAPITULO I
Generalidades sobre la parasitosis

CAPITULO I

Generalidades sobre la parasitosis.

1.1.- Clasificación del parásito y antecedentes históricos:

O. volvulus pertenece a la clase *Nematoda*, superfamilia *Filaroidea*, familia *Dipetalonemetidae*, subfamilia *Dipetalonematinae*, género *Onchocerca*, especie *volvulus* [67]. En su ciclo biológico tiene como huésped intermediario y vector de la enfermedad una mosca, artrópodo perteneciente a la clase *Insecta*, orden *Diptera*, suborden *Orthorhapha*, serie *Nematocera*, familia *Simuliidae*, género *Simulium*. En México las especies vectoras son tres: *ochraceum*, *metallicum* y *callidum* [4,36].

La oncocercosis se conoce desde 1893 cuando L. Leuckart, como resultado de sus investigaciones encontró al parásito en nódulos extirpados de africanos de la Costa de Oro, además de describirlo lo denominó *Filaria volvulus*, posteriormente en 1909 Raillet y Henry lo nombraron *Onchocerca volvulus* [19,59].

En América el médico guatemalteco Roberto Robles, en 1915, describió el cuadro clínico de la oncocercosis, reportó al agente etiológico como una filaria y propuso que el simúlido era el vector de la enfermedad. [13,19].

Hay varias teorías sobre el origen de la oncocercosis en América; se ha propuesto que llegó con la colonización europea, Martínez Gracida en 1880 refirió la presencia de ciegos en Yajani distrito de Villa Alta, Oaxaca, donde se habían establecido soldados franceses que probablemente tenían la enfermedad, también se ha observado que la parasitosis coincide con los lugares donde se asentaron esclavos negros provenientes de Africa [19,53].

Sin embargo, se ha argumentado la posibilidad de que la enfermedad ya existía antes de la colonización europea, ya que en Monte Albán, Oaxaca, se descubrieron tres cráneos prehispánicos con lesiones similares a las que se observan cuando se implantan nódulos oncocercosos [19,20]. En los censos de la colonia de 1521 enviados a Felipe II, se mencionó una enfermedad semejante a la oncocercosis, la reseña decía: "hay bolas en la cabeza, ojos arrugados y van perdiendo la noción de ver", la descripción de la enfermedad en esta época temprana de la colonización sugiere para algunos autores la presencia de la parasitosis antes de la llegada de los Españoles [20,53].

Las investigaciones para caracterizar los linajes genómicos de las subespecies de *O. volvulus* con marcadores moleculares y su relación con la ubicación geográfica seguramente podrá aclarar el origen de la oncocercosis en América [57].

1.2.- Ciclo biológico y morfología de *O. volvulus*.

La infección en el humano se inicia por la picadura de la hembra del *Simulium* (mosca negra), que inocular la larva infecciosa en la piel, ésta evoluciona a gusano adulto en la etapa prepatente, período estimado de 15 a 18 meses, en este lapso ocurren dos mudas hasta que alcanza la madurez en 12 meses (con variaciones de 10 a 20 meses) [6,27] (fig. 1.1).

El gusano adulto se enrolla y forma nódulos, en los que se alojan dos a tres hembras y uno o dos machos. La hembra grávida, libera microfilarias en grandes cantidades que migran del nódulo a través de los tejidos del hospedero y se concentran en la dermis [34,35]. Las microfilarias se detectan en la piel después del período prepatente [45], la transmisión se inicia cuando la hembra

del simúlido se alimenta de la sangre de un sujeto infectado, la proboscis corta de la mosca causa una herida superficial que sangra, la sangre se mezcla con las microfilarias que se encuentran en la dermis y la mosca las ingiere [27,34].

La mayoría de las microfilarias que llegan a la mosca, son destruidas por su aparato bucofaríngeo, algunas llegan al estómago y al intestino medio donde mueren y se desintegran; pero una pequeña proporción de las microfilarias sobrevive y migra del aparato digestivo hacia el tórax, donde permanecen aproximadamente 120 horas, allí transcurren los estadios L1, L2 y L3 (con los cambios de formas: pre-salchichoide, salchichoide y preinfectante, respectivamente). La forma L3 migra a la cabeza del insecto, donde termina su desarrollo y madura a la forma infecciosa, la cual invade a otros hospederos en las siguientes picaduras del insecto, en esta evolución las microfilarias alcanzan tres veces el tamaño que tenían al llegar al insecto [5,7,27].

El nemátodo adulto y la microfilaria se caracterizan por su extremo caudal (fig. 1a) [18]: La hembra adulto tiene una longitud de 23 a 70 cm y 275 a 325 μm de diámetro, en la cutícula presenta anillación a intervalos regulares, el anillo nervioso mide 170 μm en la vulva y 940 μm en el extremo anterior, el ano se encuentra en el extremo caudal a 210 μm de la punta posterior del gusano (fig.1a). El sistema reproductivo consiste de: vagina, un útero en par, receptáculos seminales, oviductos y ovarios [18,27,63].

El macho adulto mide de 3 a 6 cm de largo y 130 a 150 μm de diámetro, en los nódulos oncocercosos el macho se encuentra enrollado alrededor del extremo cefálico de la hembra, las anillaciones del macho están espaciadas cada 5 μm y son poco visibles en relación a las de la hembra, el anillo nervioso se encuentra a 140 μm del extremo anterior y el ano se encuentra a 65 μm de la

punta posterior que es curva. El sistema reproductivo consiste de: testículos, un vaso eferente, un ducto eyaculador y dos espículas copuladoras que se proyectan fuera del ano (fig. 1b)[18,27,63].

La microfilaria de *O. volvulus* no tiene vaina, mide 210 a 320 μm de largo y 6 a 9 μm de diámetro, presenta movimientos rápidos de enrollamiento y desenrollamiento, las características morfológicas de la microfilaria tefida (fig. 1b) ayudan a diferenciarla de otras especies de filarias. El espacio cefálico es de 7 a 13 μm entre el extremo anterior y el primer núcleo, el espacio caudal es de 9 a 15 μm entre el núcleo terminal y el extremo posterior, en el núcleo terminal hay una elongación y una cola en punta [18,27,35,63].

La larva infecciosa (forma L3) mide de largo de 440 a 700 μm (media 600) y 19 a 28 μm de diámetro. Las características más útiles para la distinción de la larva de *O. volvulus* son la longitud, la posición del ano que en promedio se encuentra a 31 μm del extremo caudal y la morfología de la extremidad caudal, que se estrecha después del ano y termina con una punta redondeada [6,18,63].

1.3.- Ciclo vital del vector.

Los simúlidos ovipositan en ríos y riachuelos, la hembra grávida deposita los huevos en la superficie del agua sobre ramas, rocas, vegetales y restos que flotan.

El simúlido requiere de corrientes de agua con una velocidad adecuada para su aeración (60 a 250 cm/seg), un aporte adecuado de alimento y estructuras de sostén en profundidades no mayores de 14 cm de la superficie. Los huevos tardan dos días en liberar las larvas que migran corriente abajo para formar la pupa en 8 a 10 días, la pupa se fija a alguna estructura en la corriente y

adultas son hematófagas y requieren ingerir sangre para la iniciación del ciclo gonadotrófico, el macho no presenta este ciclo y no es transmisor de la infección pues no se alimenta de sangre, sólo requiere de nutrimentos que obtiene de la vegetación [6,18,35].

La hembra del simúlido generalmente tiene un área de vuelo de pocos kilómetros alrededor de los *habitats* larvales y pupales (denominados sitios de apareamiento), pero la frecuencia de su picadura es intensa en la vecindad inmediata. Sin embargo hay evidencia que las moscas pueden recorrer cientos de kilómetros en la dirección de los vientos dominantes [27].

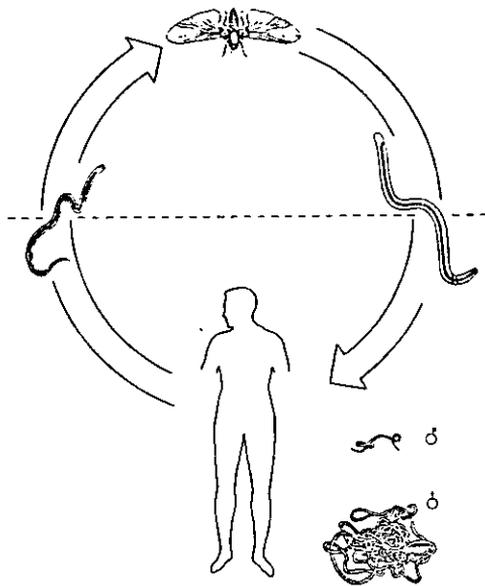


Fig. 1.1. Ciclo biológico de *Onchocerca volvulus* [27].

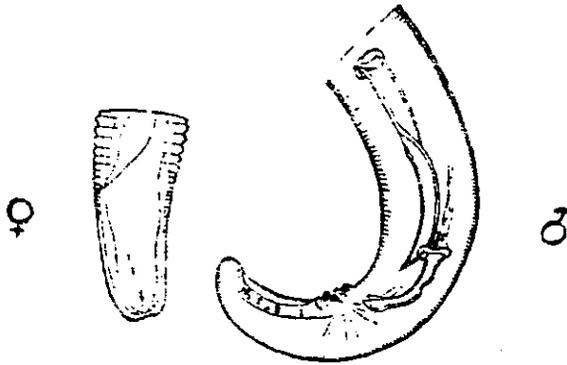
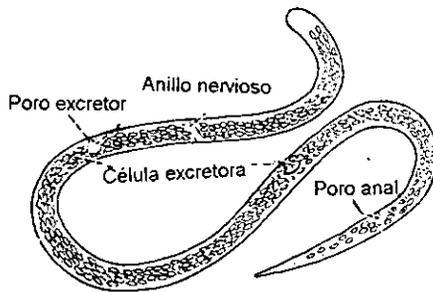


Fig. 1a.- Morfología de *Onchocerca volvulus*, extremos caudales de la hembra y del macho [35]



Dimensiones de la microfilaria:

largo: 210 a 320 μm

diámetro: 6 a 9 μm

Fig. 1b.- Morfología de la microfilaria teñida de *Onchocerca volvulus* [18].

1.4.- Epidemiología y distribución geográfica de la oncocercosis.

De acuerdo a la OMS hay 120 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad, 18 millones están infectadas y existen 270,000 ciegos por la oncocercosis en todo el mundo. La enfermedad se distribuye en los siguientes porcentajes: el 96 % se encuentra en 28 países de África, donde la oncocercosis es la segunda causa de ceguera [70,71], el 4 % restante se encuentra en el Yemen, en la península Arábiga y en seis países de América donde se reportan 1,400 ciegos [48,70] (tabla 1.1). En América, en 1990 se reportaron 105,600 casos en los seis países afectados, con una población de 5.2 millones de personas en riesgo [50].

En México la oncocercosis tiene como vectores principalmente a *S. ochraceum* y *S. metallicum*, estas especies se aparean en corrientes de poco caudal y el *hábitat* en que se observa la transmisión de la enfermedad se localiza en una altitud entre 500 a 1,500 m sobre el nivel del mar. *S. callidum* es un vector menos importante, que se reproduce indistintamente en ríos grandes o en arroyos pequeños y vive en áreas con una altitud de los 500 m hasta los 2,000 m [4]. En nuestro país existen tres áreas endémicas denominadas: foco Oaxaca, foco Chamula, y foco del Soconusco [fig. 1.3].

Foco Oaxaca: (Del alto Papaloapan).- Se ubica entre las latitudes 17°15' y 17°48' norte y las longitudes 96°12' y 96°40' oeste, abarca una superficie aproximada de 1,400 km² y una población de 125,000 habitantes con 3.2 % de infectados.

Foco Chamula (Del norte de Chiapas).- Se localiza a 60 kms. de la capital del estado, Tuxtla Gutiérrez, entre las latitudes de 16°52' y 17°07' norte y las

longitudes 92°29' y 92 °40' oeste, abarca una superficie de 1,197 km², y una población aproximada de 60,000 habitantes donde el 0.3 % padece oncocercosis.

En este foco no hay transmisión de la enfermedad, porque la altitud de 2,200 m sobre el nivel del mar no es adecuada para la proliferación del vector, la enfermedad se presenta en indígenas y sus familias que viajan periódicamente al Soconusco para trabajar en la pizca del café y otras labores agrícolas, donde adquieren la infección.

Foco Soconusco (del sur de Chiapas).- Se localiza a ambos lados de la sierra madre del sur en la costa del Pacífico en el Soconusco de donde pasa a Guatemala, se ubica entre las latitudes 15°41' y 15°57' norte y las longitudes 90°05' y 93°07' oeste, abarca una superficie de 12,992 km² con 500,000 habitantes de los cuales el 28 % está infectado [4,7,13,36,48].

En estos focos se suministra semestralmente la Ivermectina desde 1990, lo que ha reducido 60 % el número de caso nuevos pasando de 2,399 a 963, con una disminución de la tasa de incidencia de 17 a 13 casos por 100,000 habitantes. Desde hace 11 años no se han registrado casos de ceguera en ninguno de los tres focos oncocercosos [50].

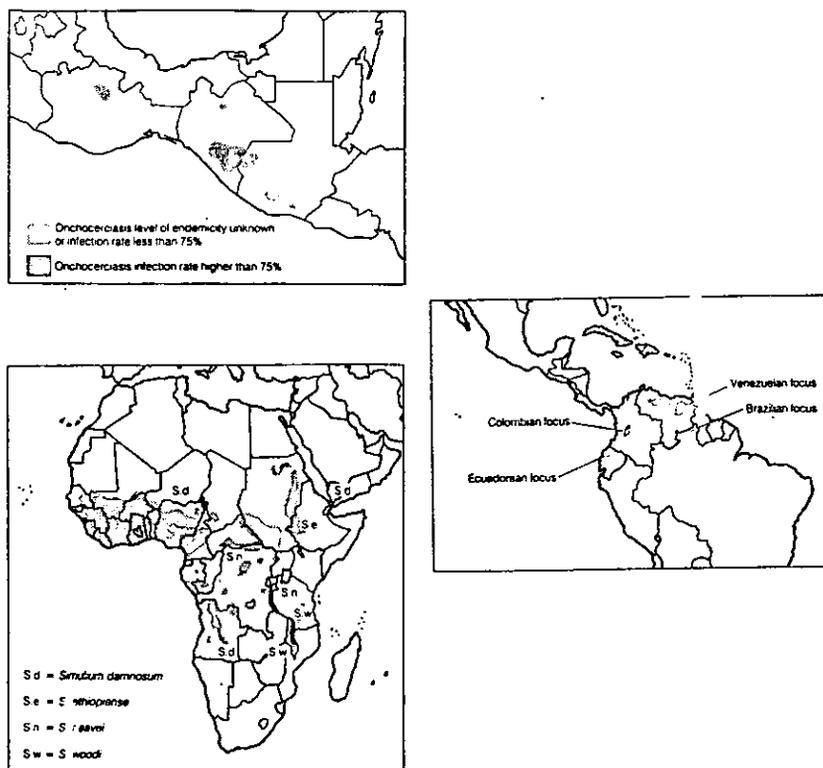


Fig. 1.3.- Distribución Geográfica de la Onchocercosis [34].

La oncocercosis en el mundo.

	Población infectada	Ciegos.
Africa	17,8 millones	261,884
América y Asia menor	200,000	8,116
Total	18.0 millones	270,000

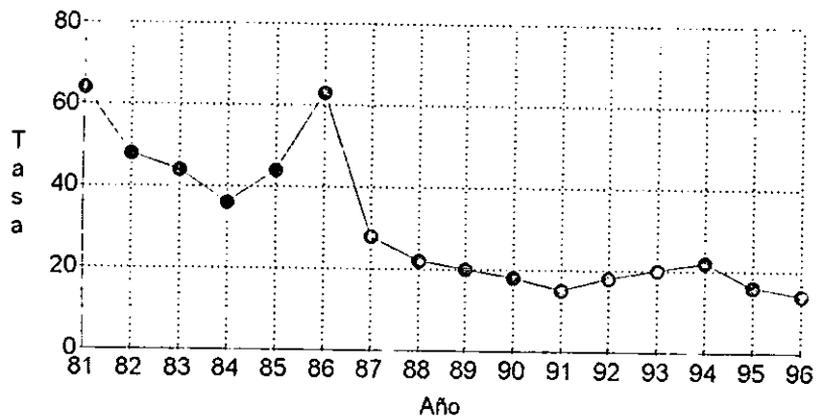
Datos de la OMS 1997 [70,71].

La oncocercosis en México.

	Area	Población infectada	Ciegos
Chiapas	14,139 km ²	16,218	49
Oaxaca	4,250 km ²	1,524	56
Total	18,389 km²	17,742	105

Datos del Programa de control de la oncocercosis, Dirección General de Medicina Preventiva, Secretaría de Salud, México 1990.

Tabla 1.1 Epidemiología de la oncocercosis.



Gráfica 1.1.- Incidencia de la oncocercosis, México 1981-1996 tasa por 100,000 habitantes [50].

1.5.- Patología y patogénesis de la oncocercosis.

La patología de la oncocercosis se explica con base en los mecanismos de invasión a los tejidos en el huésped, la filaria cuando llega a adulto se implanta en zonas específicas del cuerpo y forma nódulos, en estos nódulos la hembra se aparea con el macho y genera un número muy grande de larvas, las cuales invaden el espacio intersticial y a través de los vasos linfáticos invaden el tejido conectivo, el tropismo hacia la piel y el ojo es importante por el daño que producen. La oncocercosis se considera como una enfermedad mediada por la respuesta inmune, en la que principalmente la reacción inflamatoria crónica contra las microfilarias, los efectos mecánicos y los procesos degenerativos causados por las larvas originan los diversos cuadros clínicos de la oncocercosis [24,40].

Las observaciones con técnicas histoquímicas muestran depósitos perivasculares constituidos por complejos inmunes [23], Sysley y colaboradores encontraron correlación entre los complejos Ag-Ac circulantes y la unión a C1q, con las complicaciones de la enfermedad [58], Gallin y colaboradores indujeron keratitis intersticial en conejillos de indias con antígeno de *O. volvulus*, que forma depósitos de complejos Ag-Ac [21], lo anterior sugiere la hipótesis de que los complejos Ag-Ac y la activación del complemento por la vía clásica producen una respuesta de inflamación aguda que daña los tejidos y juega un papel importante en la patogénesis [23].

La respuesta de IgE es un factor importante en la patogénesis de la oncocercosis, se implica en daño a los tejidos por una reacción inflamatoria mediada por la respuesta de hipersensibilidad inmediata de tipo I, inducción de la degranulación de eosinófilos y la formación de complejos Ag-Ac [23], los

productos de linfocitos activados, autoanticuerpos y células T citotóxicas también tienen un papel en la patogénesis de algunas lesiones [21, 23]. Se ha establecido que las manifestaciones clínicas dependen de otros factores, como son la duración e intensidad de la exposición a las picaduras, la localización geográfica y del complejo simúlido-parásito [27]. Hasta hoy no se han realizados estudios epidemiológicos que determinen todos los factores que intervienen en la incidencia de cada cuadro clínico que se conoce en la oncocercosis [27].

En zonas de baja transmisión hay oncocercosis sin manifestaciones clínicas, muchas otras zonas oncocercosas han permanecido sin ser descubiertas, hasta que intencionalmente por los criterios epidemiológicos, clínicos y geográficos, se hacen biopsias de piel en los habitantes y se demuestra la presencia de las larvas de *O. volvulus* [17,48].

La descripción de la patología inicial y los cambios asociados con la infección es incompleta aún, particularmente en las lesiones oculares, ya que el material patológico es escaso y frecuentemente se obtiene en etapas terminales de la enfermedad [27].

La dermatitis es la primera manifestación de la parasitosis, se inicia como prurito ("gale filarienne" o "prurito filarial"), cuando hay un número bajo de microfilarias en piel puede persistir como único síntoma [27,40], presenta numerosas vesículas pequeñas, circulares, elevadas, de 1 a 3 mm de diámetro, rojizas, con un fondo de piel blanca, están confinadas a un cuarto anatómico del cuerpo como son la espalda y los glúteos y se distribuyen con forma de alas de mariposa [27].

Las oncodermatitis se clasifican por su extensión en: leve, moderada y severa. Por el tiempo de evolución se clasifican como aguda, si es reciente y

crónica cuando el tiempo de progresión es de varios años [24]. Las dermatitis agudas generalmente son asimétricas y afectan a niños o jóvenes y con el tiempo progresan a un engrosamiento de la dermis que adquiere un aspecto de "piel de naranja", cuando hay edema se le llama "erisipela de la costa". Las dermatitis crónicas de varios años, se asocian con visión deteriorada y hay engrosamiento cutáneo [23,63].

Cuando las infecciones son masivas, con alto número de microfilarias, hay un arrugamiento prematuro de la piel que evoluciona a piel floja y redundante, rasgo conocido como "piel de pescado" o "lagartija", si hay hidrocele causa en el rostro la "cara leonina o de perro" [34].

El examen histopatológico de la piel muestra destrucción progresiva del tejido, la atrofia pronunciada se ve en un 13 % de los individuos, en las etapas avanzadas de la enfermedad es característico encontrar atrofia de la epidermis y el 20 % de los pacientes también presenta despigmentación, por pérdida de las fibras dérmicas ya que sobre la dermis sólo permanecen capas delgadas de epidermis y queratina [27,34].

En Guatemala se describió que algunos casos del "mal morado" tienen un cuadro similar al "sowda" de los habitantes del Yemen [62], en el que por efecto de una respuesta inmune con formación de un título alto de anticuerpos y escasas microfilarias en la piel; ésta presenta hiperpigmentación, se engruesa, se cubre de pápulas, los ganglios se agrandan, la reacción de Mazzoti es positiva y por lo tanto representa un cuadro diferente de la oncocodermatitis clásica [9,34].

El gusano adulto forma nódulos subcutáneos (oncocercomata), que están compuestos de tejido hialinizado y vascularizado que rodea al gusano adulto, tienen cantidades variables de elementos de inflamación crónica; fibrina, células

plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células gigantes y cuerpos de Rusell. Los nódulos viejos contienen sólo material necrótico con remanentes del gusano adulto que se destruye y después de varios años llegan a calcificarse [27,34].

Los nódulos varían de tamaño, de unos milímetros de diámetro a varios centímetros, son firmes a la palpación, tienen una movilidad variable que depende del grado de adherencia a las estructuras óseas, se requiere experiencia clínica para diferenciarlos de otras estructuras, por ejemplo los ganglios linfáticos, lipomas, granulomas, cisticerco, angiofibroma, neurofibroma y otros tumores subcutáneos, hay nódulos jóvenes que pueden ser suaves y difíciles de distinguir, debido a la falta de tejido fibroso circundante, los nódulos viejos pueden ser flácidos como resultado de la necrosis y licuefacción del gusano [28].

La distribución de los nódulos tiene diferentes localizaciones anatómicas, según el área geográfica [24,27], en México y América Central muestra los siguientes porcentajes: 55 % en la cabeza, 11 % en el tórax, 28 % en caderas y el 4 % en las extremidades inferiores [24].

Los ganglios linfáticos presentan áreas linfoides alteradas, con histiocitosis e infiltraciones de células inflamatorias, hay linfadenitis, con formación de hernias colgantes inguinales o femorales ("hanging groin"), en casos extremos si hay obstrucción linfática se puede desarrollar elefantiasis como en otras filarías, pero es poco frecuente en la oncocercosis [46]. En nuestro medio es raro encontrar adenopatías desde que se implantó la campaña de desnodulización [13,36,63].

La forma denominada "mal morado" presenta nódulos linfáticos con hiperplasia folicular, lo que sugiere una reacción semejante al "sowda" en la que intervienen componentes inmunológicos diferentes [27,40,63].

El daño visual es una complicación importante de la oncocercosis y causa ceguera como secuela de la infección crónica [65]. En las personas jóvenes se presenta inicialmente conjuntivitis con fotofobia, en la conjuntiva hay infiltrado de células plasmáticas, eosinófilos y células cebadas con hiperhemia, dilatación de los vasos y en algunos casos engrosamiento y fibrosis perivasculares [23,27,34].

La queratitis punteada es una patología de la córnea y en la oncocercosis se observan rasgos característicos: hay infiltrado inflamatorio agudo que rodea la microfilaria moribunda, las manifestaciones de opacidad, como nieve, son frecuentes en pacientes jóvenes y se encuentran en el 10 al 15 %. Si se elimina el parásito desaparecen sin dejar secuela, la queratitis esclerosante se presenta en el 1 al 5 % y si no se trata progresa hasta la ceguera, inicia en el limbo, se extiende al interior y causa daño irreversible de la visión [27,34].

En los oncocercosos de América Central la causa más frecuente de ceguera son las lesiones corioretinianas [34,37], la uveítis y el glaucoma secundario son causa importante de daño a la visión [27]. La lesión del nervio óptico produce la constricción de los campos visuales y atrofia óptica, los cambios en el disco óptico se relacionan con la infección de *O. volvulus* en el 2 % de las personas infectadas, la terapia con dietilcarbamacina y la suramina precipitan el daño al nervio óptico [23,27].

Las personas con infección masiva presentan debilitamiento del estado general, pérdida del tejido adiposo y masa muscular, hay un aumento en el riesgo de contraer infecciones como tuberculosis y lepra. En las autopsias se han

encontrado microfilarias en la mayoría de los órganos, sin embargo no hay evidencia convincente de que la disfunción de estos órganos sea una consecuencia de la infestación masiva por las microfilarias [27].

Se puede presentar poliartritis que asemeja artritis reumatoide, con dolor general en las articulaciones y hay microfilarias en el liquido sinovial. El tratamiento con DEC elimina las microfilarias de las articulaciones y desaparece el cuadro clínico [23,34].

1.6.- La respuesta inmunogénica.

En la respuesta inmunogénica humoral intervienen diferentes antígenos: de superficie, de excreción-secreción, somáticos y derivados de la actividad metabólica del parásito. La respuesta contra estos antígenos como la formación de complejos Ag-Ac que se depositan en los espacios perivascuales, se unen a C1q y activan el complemento por la vía clásica y la reacción de hipersensibilidad inmediata tipo I, contribuyen a la reacción inflamatoria crónica que causa efectos patogénicos de daño a los tejidos [27,34,58,61].

En pacientes con filariasis generalmente hay hiperglobulinemia, con niveles elevados de anticuerpos específicos, los niveles son significativamente más altos en sujetos infectados que los que se encuentran en etapa prepatente [16], en tanto si hay alto número de microfilarias en la sangre puede haber un déficit en la producción de anticuerpos [42].

En Venezuela se hizo un estudio inmunológico con dos grupos de oncocercosos sin manifestaciones clínicas severas, uno con tratamiento con DEC y otro sin tratamiento, los resultados fueron comparados con sujetos sanos; en los sujetos sin tratamiento se encontraron niveles bajos de IgA y C'3 y no se observó cambio significativo en los niveles de inmunoglobulinas. En los pacientes con

tratamiento se observó un aumento de los niveles de IgG e IgM, con niveles de IgA y C'3 aún más bajos, también se observó eosinofilia en todos los grupos. Los investigadores concluyeron que estos cambios corresponden a una reacción inmune humoral contra antígenos que liberan los parásitos por efecto del tratamiento con la DEC. [34].

El nivel de IgE en suero de oncocercosos con infección crónica está aumentado dos a tres veces con respecto a sujetos normales [9,42] y se encuentra asociado con un número alto de basófilos y células cebadas [58,69], sin embargo en los pacientes con infección crónica es baja la frecuencia de reacciones de hipersensibilidad inmediata de tipo I, esta paradoja se explica por estudios que demuestran que en los sueros de los individuos parasitados también contienen altos niveles de anticuerpos IgG bloqueadores [42], por lo tanto, existe una supresión de la reacción de hipersensibilidad inmediata tipo I, lo que beneficia al enfermo. Estos mecanismos de supresión humoral también podrían tener su origen en el fenómeno de inducción de tolerancia por exposición a los antígenos durante el desarrollo intrauterino [34,42].

Así, esto explica que la "eosinofilia pulmonar tropical" que es una patología relacionada con una respuesta inmune severa, que se observa en parasitosis por otros nemátodos, es rara en la oncocercosis y sólo ha sido descrita en algunas zonas de África [34,42].

En zonas endémicas existe una población asintomática con resistencia y reacción inmune al parásito, algunos de estos individuos no están infectados y otros cursan con infección subclínica [42].

Los estudios histológicos de los nódulos muestran que los eosinófilos y neutrófilos están situados alrededor del parásito mientras que los linfocitos,

monocitos y células plasmáticas, están dispersos irregularmente en el seno del nódulo y en la cercanía de las filarias adultas, lo que sugiere una respuesta inmune celular alterada [42,43,46].

En la oncocercosis los ensayos *in vitro* de la respuesta de linfocitos al antígeno del parásito esta disminuida en forma específica y es más baja si hay microfilarias en sangre, los pacientes con infestación masiva muestran una respuesta muy baja que ya no es específica, pacientes que han presentado "eosinofilia pulmonar tropical" muestran un esquema diferente con una respuesta celular aumentada a los antígenos de *O. volvulus* [27,34,46].

En modelos animales de filariasis crónica hay una reacción de los linfocitos a los antígenos de *O. volvulus* que muestra disminución a la respuesta celular antígeno-específica que se atribuye a una regulación de baja respuesta mediada por linfocitos moduladores y disminución de IL2 [21], los mecanismos que modulan una respuesta baja se desarrollan después de la respuesta inmune de la infección temprana [22,40], las pruebas cutáneas en modelos animales confirman esta disminución de la respuesta celular antígeno-específica, desafortunadamente los estudios similares realizados en humanos no muestran este fenómeno [34]. Sin embargo los estudios *in vitro* de la respuesta celular con linfocitos de oncocercosos muestran un estado de respuesta baja que no es específico [37].

La incidencia de lepra lepromatosa es dos veces mayor en zonas endémicas a la oncocercosis y hasta ahora no se ha logrado establecer si esto obedece a la disminución de la respuesta inmune por un efecto de regulación de baja respuesta causado por la infección por *O. volvulus* [34].

1.7.- Métodos de diagnóstico.

La oncocercosis tiene características que dificultan el diagnóstico, las más importantes son: su presencia en zonas de poblaciones marginadas en las cuales no hay acceso a servicios de diagnóstico de alta tecnología, los antígenos de *O. volvulus* dan reacción cruzada con otros nemátodos que coexisten en la misma zona geográfica y la dificultad para contar con fuentes de antígeno [49,63].

Así al igual que en otras parasitosis tropicales, el diagnóstico es directo mediante la detección cualitativa y/o cuantitativa de las microfilarias en biopsia de piel, también pueden hacerse por la detección de microfilarias en la cámara anterior del ojo [27], en sangre, especialmente después de quimioterapia con citrato de dietilcarbamacina, así como en orina y en líquido sinovial [7,18,34,63]. La detección de *O. volvulus* adulto puede lograrse mediante la disección de los nódulos del tejido subcutáneo y cuando están localizados en tejidos profundos se detectan por ultrasonografía, pero en general si se encuentran en los órganos solo se detectan en la necropsia [24].

El diagnóstico también puede ser indirecto basado en las características clínico patológicas de la prueba de Mazzotti que consiste en administrar 50 mg de dietilcarbamacina y observar en las siguientes 24 horas la aparición de signos y síntomas característicos: prurito y eritema, seguidos de la formación de placas erisipeloides y edema, hiperhemia conjuntival y fotofobia, puede haber inflamación de ganglios y hay malestar general con cefalea, dolor muscular, artralgias y fiebre, estos signos se atribuyen a un respuesta de hipersensibilidad inmediata tipo I causada por la reacción a los antígenos que se liberan de los parásitos por efecto de la DEC [63]. Se pueden detectar zonas de endemia por

datos clínicos epidemiológicos [29] y entomológicos, en los que se investiga la presencia del parásito en el vector [51,52].

El diagnóstico por pruebas inmunológicas es importante; se ha intentado por las técnicas de precipitación, fijación del complemento, aglutinación, floculación y el marcaje para detectar complejos inmunes, como el ensayo inmuno enzimático [67], el radioinmunoensayo y la inmunofluorescencia [6,24,63]. Hasta ahora el problema de la reacción cruzada es un obstáculo que no permite substituir las pruebas parasitológicas tradicionales.

La detección de antígeno de *O. volvulus* se ha hecho por el método de Ouchterlony con anticuerpos específicos pero esta técnica tiene poca sensibilidad [14,67]. Actualmente el ensayo inmuno enzimático y el radioinmunoensayo, son las pruebas en uso por su alta sensibilidad [24,66]. Una perspectiva es el desarrollo de pruebas específicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) [1,72] y la obtención de antígenos recombinantes específicos de *O. volvulus* para la obtención de anticuerpos monoclonales [1,8,57].

1.8.- El ensayo inmunoenzimático EIA ("Enzimatic Immuno Assay").

Las pruebas inmunoenzimáticas combinan las ventajas de la alta sensibilidad del radioinmunoensayo, con la especificidad de la inmunofluorescencia, además requieren equipo y reactivos accesibles y que no emplean marcaje con radioisótopos, su costo es bajo y los reactivos son estables [66, 68], además el EIA podría adaptarse para realizarse en el campo como pueden ser el ELISA en papel filtro como fase sólida o el "Dot-ELISA" en membrana [1,32].

Hipótesis: Es posible hacer el diagnóstico de la oncocercosis mediante la identificación de antígenos del parásito, empleando el inmunoensayo enzimático modificado de doble anticuerpo utilizando anticuerpos policlonales. Se espera que esta técnica tenga una gran sensibilidad, tanto en muestras de orina o de suero, de esta manera se evitaría molestar al paciente con biopsias de piel.

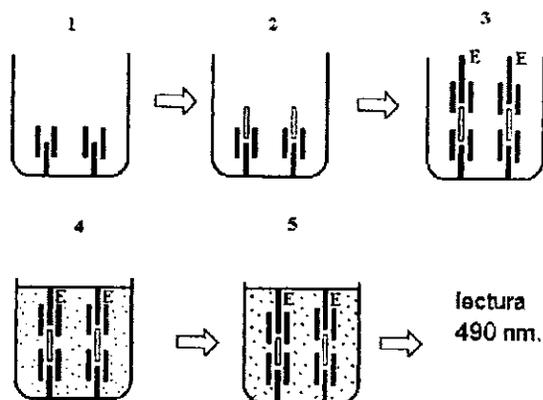


Fig 4).- ELISA modificado de doble anticuerpo [1,66,38].

- 1.- Adsorber¹ a la fase sólida el anticuerpo específico anti *O. volvulus*, disuelto en el amortiguador de cubrimiento, carbonatos 0.06 M pH 9.6, incubar² toda la noche a 4°C, lavar tres veces con PBS-Tween 20.
- 2.- Agregar el espécimen (suero u orina) diluido 1:2 con PBS-Tween20³, en este paso los antígenos de *O. volvulus* interacciona con los anticuerpos, incubar 2 h a 37°C Lavar tres veces con PBS-Tween 20.
- 3.- Agregar el anticuerpo anti *O. volvulus* conjugado a peroxidasa, incubar 30 minutos a 37°C lavar tres veces con PBS-Tween20.
- 4.- Agregar el sustrato de la peroxidasa: orto-fenilen-diamina 3.8 M, incubar en la obscuridad 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Parar la reacción con 25 μ L de ácido sulfúrico 1N.
- 6.- Leer el color a 490 nm en un microlector para ELISA.

¹ Todos los reactivos se agregan en volúmenes de 200 μ L, en los lavados se llena el pozo.

² Todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda y con tapa.

³ No se utilizó bloqueo, por lo que se requiere diluir en PBS Tween20 para evitar la adsorción no específica de proteínas

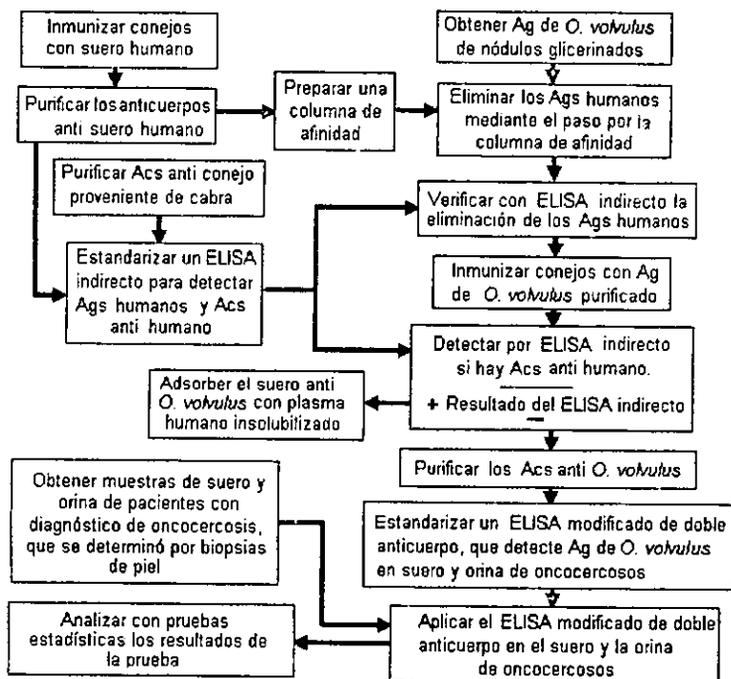


DIAGRAMA DE TRABAJO.

El objetivo del trabajo fue estandarizar un ELISA modificado de doble anticuerpo para detectar antígeno de *O. volvulus* en suero y orina de oncocercosis.

Los objetivos particulares fueron cuatro:

- 1.- Preparar Ags de *O. volvulus* libre de componentes humanos: Se extrajeron los antígenos de nódulos glicerizados y se pasaron por una columna de afinidad con Acs anti suero humano, se estandarizó un ELISA indirecto para detectar Ags humanos y demostrar la eficiencia de la columna.
- 2.- Preparar anticuerpos anti *O. volvulus* por inmunización de conejos con los Ags purificados: para evitar reacción cruzada contra antígenos humanos, se aplicó al suero anti *O. volvulus* un ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti suero humano, la prueba fue positiva, por lo tanto se adsorbió el suero con plasma humano insolubilizado.
- 3.- Obtener muestras de suero y orina de pacientes con diagnóstico de oncocercosis, que se determinó por biopsias de piel.
- 4.- Estandarizar un ELISA modificado de doble anticuerpo y aplicar la prueba al suero y la orina de oncocercosis y analizar con pruebas estadísticas los resultados.

CAPITULO II
Material y métodos

CAPITULO II

Material y métodos.

2.1.- Muestras de sueros y orinas de individuos oncocercosos.

Se colectaron sueros y orinas de 25 hombres adultos, con diagnóstico de oncocercosis que se determinó por biopsia de piel, los enfermos residen en comunidades de los municipios de Motozintla y Acacoyagua, Chiapas. Los sueros se transportaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C .

De cada paciente se obtuvieron 10.0 mL de orina que se centrifugaron a $4,000 \times g$ para eliminar células y material no disuelto, luego se trataron según Schlie y Rivas [53]: a cada sobrenadante se le agregaron 20.0 mL de etanol al 96%, esta mezcla se incubó a 4°C toda la noche para precipitar las proteínas, se centrifugaron a $4,000 \times g$, durante 30 minutos, el sedimento de proteínas se resuspendió en 1.0 mL de PBS 0.15 M, pH 7.4 y se almacenó a -70°C .

Las muestras control negativo se colectaron de 10 individuos sanos, que no habían estado en zonas endémicas de oncocercosis y se procesaron en la misma forma descrita. También se colectó suero y orina de 10 individuos que no habían estado en zonas endémicas de oncocercosis y en los que se demostró en el examen coproparasitológico por el método de Faust [18], la presencia de huevecillos de *Ascaris lumbricoides* (4 individuos), *Ancylostoma spp.* (3 individuos) y *Trichuris trichiura* (3 individuos), estas muestras se utilizaron como controles de reacción cruzada.

2.2.- Cuenta de microfilarias en biopsias de piel.

Con un esclero-corneo-tomo esterilizado, se cortaron por duplicado biopsias de piel de la región escapular, deltoide y la parte superior de las caderas, cada fragmento de piel se pesó y después cada uno se colocó en un pozo con fondo plano de una placa para microtitulación¹, se añadieron 200.0 µL de solución salina a cada pozo, las placas se incubaron 2 h a 37°C, por medio del microscopio (aumento 100x) se contó el número de microfilarias en cada pozo y se calculó la media aritmética de microfilarias por mg de piel en cada paciente [54].

2.3.- Obtención de los antígenos purificados de *O. volvulus*.

Los antígenos se obtuvieron a partir de nódulos conservados en solución salina glicerizada al 66%. Estos fueron extirpados durante la campaña de desnodulización de la Secretaría de Salud en el estado de Chiapas. La solución salina glicerizada se eliminó mediante lavados con agua destilada y posteriormente con solución salina, que se eliminó colocándolos entre papel filtro y por último se determinó su peso húmedo.

Las filarias se obtuvieron por digestión enzimática de los nódulos según la técnica de Schulz-Key [55,56]: Los nódulos lavados, 212 piezas con peso húmedo total de 63.880 g, se colocaron por pares en 5.0 mL de PBS 0.15 M, pH 7.2, con 50.0 mg/mL de colagenasa tipo IV de *C. histolyticum*²; contenidos en tubos cónicos con capacidad de 15 mL, los que posteriormente se taparon y se colocaron en un agitador rotatorio durante un período de 12 a 18 horas a temperatura de 4°C. Cuando se observó la digestión del tejido y se visualizaron

1 Placa de poliestireno: Immulon I, Nunc, Denmark

2 Sigma C5138, 175 unidades de actividad enzimática por mg

los gusanos, se procedió a disecar los nódulos manualmente para extraer los parásitos y liberarlos de los restos de tejido del nódulo, se colocaron inmediatamente en PBS 0.15 M, pH 7.2 en baño de hielo, se lavaron tres veces con el mismo amortiguador, se secaron sobre papel filtro y se determinó su peso húmedo [55,56].

La extracción de los antígenos somáticos de *O. volvulus* se realizó por el método de Cabrera y Parkhouse [10]: Se dividieron 6.12 gm de gusanos en dos porciones iguales y cada una se suspendió en 10.0 mL de PBS 0.15 M, pH 7.2, adicionado de inhibidores de enzimas proteolíticas en las siguientes concentraciones: L-1-tosilamida-2-feniletíl-clorometil cetona¹ 1.4×10^{-1} mM, N- α -p-tosil-L-lisina-clorometil cetona² 1.3×10^{-1} mM, fenil-metil-sulfuril-fluoruro³ 1mM, etilen-diamino-tetracetato de sodio⁴ 2.5 mM. Las suspensiones se colocaron en el vaso de un homogenizador de cuchillas y se les aplicó tres ciclos de 10 min a 35,000 rpm, bajo luz ultravioleta y en baño de hielo, el material se centrifugó a 20,000 x g durante 90 minutos a 4° C, el sobrenadante se concentró por ultrafiltración en membrana de Amicon PM10 y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry [33].

Los componentes humanos presentes en el extracto de antígenos de *O. volvulus* se eliminaron por cromatografía de afinidad: primeramente 54.0 mg de proteína de antígenos disueltos en 75.0 mL de PBS 0.015 M, pH 7.2 se dializaron contra el mismo amortiguador y se concentraron por ultrafiltración en membrana Amicon PM10, para obtener 17 fracciones con una concentración de

1 TPCK CT4376 Sigma

2 TLCK CT7254 Sigma

3 PMSF CP7626 Sigma

4 EDTA CED4S Sigma

proteína de 3.0 mg/2.0 mL, la que se determinó por DO a 280 nm, la primera fracción se pasó cuatro veces y las siguientes fracciones se pasaron tres veces por una columna de afinidad de AH-Sepharosa-4B¹ acoplada con anticuerpos anti-humano, la columna se preparó con una modificación² del método reportado por Des Moutis, I. [14]: Se prepararon 2.2 g de la resina en 70.0 mL de NaCl 0.5 M, según las instrucciones del fabricante, se agregaron 70.0 mL de glutaraldehído al 5.0 % y la mezcla se agitó 1 h, después se lavó la resina con NaCl 0.134 M y se ajustó el volumen a 15.0 mL, se agregaron 150.0 mg de proteína de anticuerpos anti-humano en 10.0 mL de NaCl 0.134 M. El acoplamiento final fue de 8.7 mg de proteína por mL de resina, la Sepharosa con los anticuerpos acoplados se empacó en una columna³ de 20.0 cm de altura, la cama de resina fue de 1.5 cm de diámetro por 6.5 cm de altura, los grupos activos residuales de glutaraldehído se neutralizaron por el paso de 30.0 mL de una solución de 2-amino-etanol 1 M, pH 8.0.

Después la columna se equilibró con PBS 0.015 M, pH 7.2, se pasaron las fracciones que contenían 3.0 mg de proteína de los antígenos de *O. volvulus* en 2.0 mL de PBS 0.015 M, pH 7.2 y se eluyó con el mismo amortiguador a un flujo de 0.18 mL/min, se colectaron las fracciones que presentaron una DO mayor de 0.05 a 280 nm, después de cada pase la columna se lavó con amortiguador de glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8, seguido de ácido acético 1 M y por último se equilibró con PBS 0.015 M, pH 7.2, las fracciones de antígenos que eluyeron se concentraron por ultrafiltración en membrana de Amicon PM10 y se pasaron otra

1 Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden

2 Comunicación personal de la Biot. María Adelina Schlie Guzmán

3 Bio Rad™

vez por la columna. Se comprobó que el eluido no contenía antígenos humanos por ELISA indirecto (secc. 2.6), el resultado dió una DO de 0.22 a 490 nm que fue menor al nivel de corte de 0.27, finalmente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry [33].

2.4.- Obtención de los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-humano se obtuvieron por inmunización de cuatro conejos, los anticuerpos anti *O. volvulus* se prepararon por inmunización de dos conejos con antígenos libres de componentes humanos (ver apéndice) y se purificaron anticuerpos anti inmunoglobulinas de conejo obtenidos en cabra¹.

La purificación de los anticuerpos se realizó por tres precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio saturado a concentración final del 50 %, diálisis y después por cromatografía en columna de resina de intercambio aniónico DEAE² (ver apéndice).

El suero anti *O. volvulus* se probó en ELISA indirecto (secc. 2.6) para detectar la presencia de anticuerpos anti componentes humanos: la prueba dió una DO promedio de 1.15 a 490 nm contra un corte del ELISA indirecto estandarizado de 0.27 (ver secc. 2.6), lo que demostró que el suero contenía anticuerpos anti-humano, por lo que se procedió a absorberlo con plasma humano insolubilizado.

Para obtener el plasma humano insolubilizado³ se mezclaron 200.0 mL de plasma humano con 300.0 mL de una solución acuosa de glutaraldehído al 25 % p/v y se dejó reposar 24 horas a 4 °C, el gel formado se cortó con una

1 anticuerpos liofilizados, donados por la Biol. María Adelina Schlie Guzmán

2 Whatman 50-DE

3 comunicación personal Biol. María Adelina Schlie Guzmán

espátula hasta obtener trozos finos y se suspendieron en 100.0 mL de PBS 0.2 M, pH 7.2, la suspensión se dividió en alícuotas de 50.0 mL que se pasaron al vaso de un homogenizador de cuchillas y se les aplicaron tres ciclos a 3,000 rpm en baño de hielo, durante 20 segundos, bajo luz ultravioleta. El plasma insolubilizado homogeneizado se lavó exhaustivamente con PBS 0.2 M, pH 7.2, después de cada lavado se centrifugó a 1,000 x g durante 15 minutos. Se lavó las veces necesarias hasta que se comprobó que no había proteínas en los sobrenadantes, por DO a 280 nm.

Posteriormente el suero anti *O. volvulus* se dividió en alícuotas de 70.0 mL, se adicionó a cada una 25.0 mL de plasma humano insolubilizado, la mezcla se dejó en agitador rotatorio durante 10 minutos a temperatura ambiente y se separó el suero por centrifugación a 2,000 x g durante 15 minutos.

Después de tres adsorciones, el sobrenadante se separó y dializó en PBS 0.2 M, pH 7.2, para eliminar contaminantes dializables del plasma insolubilizado, se verificó por ELISA indirecto (sección 2.6) que ya no contenía anticuerpos anti-humano y se procedió a purificar los anticuerpos.

2.5.- Preparación de los conjugados:

Se prepararon dos conjugados con peroxidasa de rábano tipo IV¹

Conjugado 1.- anticuerpos anti *O. volvulus*.

Conjugado 2.- anticuerpos anti inmunoglobulinas de conejo.

La conjugación de los anticuerpos con la peroxidasa de rábano [2,3] se realizó por el método de periodato (NaIO₄) [39,66].

1.- Se disolvieron 8.0 mg de peroxidasa de rábano tipo IV¹ en 2.0 mL de agua tridestilada, en seguida se agregaron 0.4 mL de periodato de sodio 0.1 M recién preparado y se agitó suavemente durante 20 minutos a temperatura ambiente.

2.- Se dializó la mezcla contra amortiguador de acetato de sodio 1 mM, pH 4.4 (ver apéndice), durante toda la noche a 4 °C.

3.- Se neutralizó el dializado con 40.0 µL de amortiguador de carbonatos 0.2 M, pH 9.5 y al mismo tiempo se agregaron los anticuerpos, 25.0 mg de proteínas², previamente dializados y disueltos en 2.0 mL de amortiguador de carbonatos 0.01 M, pH 9.5, la mezcla se colocó en un agitador rotatorio durante 2 horas a temperatura ambiente.

4.- Se añadieron 0.2 mL de solución de borohidruro de sodio recién preparada (4 mg/mL en agua destilada) y se dejó reposar 2 horas a 4 °C.

5.- Se separó el conjugado por cromatografía en una columna de Sephacryl G200³, preparada según las instrucciones del fabricante. Las dimensiones de la cama fueron de 2.4 cm de diámetro por 24.9 cm de altura, la columna se equilibró con amortiguador de boratos 0.01 M, pH 7.4, el conjugado

1 Sigma Cat.P8375

2 Se cuantificó por Lowry

3 Pharmacia Fine Ch.Co.

se eluyó con el mismo amortiguador, se determinó la DO de las fracciones eluidas a 280 nm y 403 nm, se colectaron y mezclaron las fracciones con DO igual o superior a 0.05 a 403 nm.

6.- Se agregó al volumen colectado (15 mL) una proporción igual de glicerina pura, se mezcló, se dividió en alícuotas de 1.0 mL y se almacenó a -20°C.

La dilución óptima de trabajo se tituló según se describe en las secciones 2.6 y 2.7.

2.6.- Estandarización del ELISA indirecto.

Esta prueba se estandarizó para hacer dos determinaciones:

1.- Determinar la eficiencia de la columna de afinidad para eliminar los antígenos de humano presentes en el extracto crudo de *O. volvulus*, en este caso el eluido concentrado se adsorbió a los pozos de una placa de microelisa (ver sección 2.3), después se siguió el ELISA indirecto estandarizado, con anticuerpos anti-humano y conjugado anti-conejo.

2.- Determinar la presencia de anticuerpos anti-humano, en el suero de conejo inmunizado con antígenos de *O. volvulus* y confirmar su eliminación por inmunoadsorción (ver sección 2.3), en este caso la prueba consistió en adsorber 10.0, 1.0 y 0.1 µg/mL de proteínas de suero de humano a una placa de microelisa, después se agregó el suero de conejo y se siguió el ELISA indirecto estandarizado con el conjugado anti-conejo.

Esta prueba estandarizada dió un punto de corte de 0.27 nm a DO de 490 nm que es válido para las dos variaciones descritas arriba, ver gráfica 2.5. Se estandarizó como se describe a continuación:

La concentración óptima de trabajo para el conjugado anti-conejo se determinó mediante una prueba de ELISA directo según un protocolo de tablero

de ajedrez [1,66]: diluciones de anticuerpos anti-humano obtenidos en conejo contra diluciones de conjugado, volúmenes de reactivos de 200.0 μL , la adsorción en las placas de microelisa¹ se hizo con diluciones en amortiguador de carbonatos 0.06 M, pH 9.6, las siguientes diluciones y los lavados se hicieron con PBS-Tween20, las placas se incubaron tapadas.

1.- Se adsorbieron anticuerpos anti-humano obtenidos en conejo en concentraciones de 100.0, 50.0, 5.0, 1.0 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, se incubó a 4°C toda la noche y se lavó tres veces.

2.- Se añadió el conjugado anti-conejo en diluciones con incrementos de dos desde 1:200 hasta 1:3,200, se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se lavó tres veces.

3.- Se añadió orto-fenilen-diamina 3.8 M (ver apéndice) a todos los pozos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la obscuridad.

4.- Se detuvo la reacción con 25.0 μL de ácido sulfúrico 1N y se leyó a 490 nm en un lector para microelisa², la prueba se realizó por cuadruplicado.

Se seleccionó para trabajar la dilución del conjugado que presentó una DO arriba de 1.0 a 490 nm, dilución 1:400, ver la gráfica 2.2.

La concentración óptima de los anticuerpos anti-humano, se estandarizó por ELISA indirecto según un protocolo de tablero de ajedrez: diluciones de suero humano contra diluciones de anticuerpo anti-humano, volúmenes de reactivos de 200.0 μL , la adsorción en las placas de microelisa¹ se hizo con diluciones en amortiguador de carbonatos 0.06 M, pH 9.6, las siguientes diluciones y los lavados se hicieron con PBS-Tween20, las placas se incubaron tapadas.

1 Dynatech Cat. M129A.

2 Dynatech, USA, MR-590.

- 1.- Se adsorbió suero humano diluido en incrementos de dos desde 10.0 hasta 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, se incubó toda la noche a 4°C y se lavó tres veces
- 2.- Se añadieron los anticuerpos anti-humano¹ diluidos en incrementos de dos desde 1:64 hasta 1:512, se incubó durante 30 minutos a 37°C y se lavó tres veces.
- 3.- Se añadió a todos los pozos el conjugado anti-conejo en la dilución de trabajo estandarizada previamente (1:400), se incubó durante 30 minutos a 37°C y se lavó tres veces.
- 4.- Se añadió orto-fenilén-diamina 3.8 M a todos los pozos, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.
- 5.- Se paró la reacción con 25.0 μL de ácido sulfúrico 1 N y se leyó a 490 nm en un lector para microelisa, la prueba se realizó por cuadruplicado.

Se seleccionó para trabajar la dilución de anticuerpos anti-humano que dió una DO a 490 nm igual o superior a 1.0, dilución 1:128, ver gráfica 2.3.

Por último, la curva estándar para el ELISA indirecto, que se muestra en la gráfica 2.5, se hizo según los pasos descritos arriba, con las siguientes concentraciones: el suero humano se adsorbió en diluciones en incrementos de dos desde 20.0 hasta 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, los anticuerpos anti-humano, el conjugado anti-conejo y los siguientes reactivos se añadieron a las concentraciones determinadas anteriormente en esta sección.

¹ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína de anticuerpos de conejo (Lowry)

2.7.- Estandarización del ELISA modificado de doble anticuerpo, para detectar antígenos de *O. volvulus*.

La concentración óptima de trabajo del conjugado anti *O. volvulus* se determinó por ELISA directo según un protocolo en tablero de ajedrez: diluciones de antígenos de *O. volvulus* contra diluciones del conjugado, volúmenes de reactivos de 200 μ L, la adsorción en las placas de microelisa se hizo con diluciones en amortiguador de carbonatos 0.06 M, pH 9.6, las siguientes diluciones y los lavados se hicieron con PBS-Tween20, las placas se incubaron tapadas.

1.- Se adsorbieron en una placa de microelisa, los antígenos de *O. volvulus* diluidos en incrementos de dos desde 17.5 hasta 0.027 μ g/mL de proteína, se incubó toda la noche a 4°C y se lavó tres veces.

2.- Se añadieron diluciones del conjugado anti *O. volvulus* en incrementos de dos desde 1:25 hasta 1:400, se incubó 30 minutos a 37 °C y se lavó tres veces.

3.- Se añadió orto-fenilen-diamina 3.8 M a todos los pozos, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.

4.- Se paró la reacción con 25.0 μ L de ácido sulfúrico 1 N y se leyó a 490 nm en un lector para microelisa, la prueba se realizó por cuadruplicado.

Se seleccionó para trabajar la dilución del conjugado que presentó una DO arriba de 1.0 a 490 nm, dilución 1:50, ver gráfica 2.1.

La concentración óptima del primer anticuerpo, anti *O. volvulus*, se determinó por un ELISA indirecto en un protocolo en tablero de ajedrez: diluciones de los antígenos de *O. volvulus* contra diluciones del anticuerpos anti *O. volvulus*, volúmenes de reactivos de 200.0 μ L, la adsorción en las placas de microelisa se hizo con diluciones en amortiguador de carbonatos 0.06 M, pH 9.6,

las siguientes diluciones y los lavados se hicieron con PBS-Tween20, las placas se incubaron tapadas.

1.- Se adsorbieron los antígenos de *O. volvulus* diluidos en incrementos de dos desde 10.0 hasta 0.015 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas, se incubó toda la noche a 4°C y se lavó tres veces.

2.- Se añadieron los anticuerpos anti *O. volvulus* en concentraciones de 100.0, 50.0, 10.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, se incubó durante 2 horas a 37 °C y se lavó tres veces.

3.- Se añadió el conjugado anti-conejo diluido 1:400 (concentración de trabajo, secc. 2.6) en PBS Tween20, se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se lavó tres veces.

4.- Se añadió orto-fenilén-diamina 3.8 M a todos los pozos, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.

5.- Se paró la reacción con 25.0 μL de ácido sulfúrico 1N y se leyó a 490 nm en un lector para microelisa, la prueba se realizó por cuadruplicado.

Se seleccionó la concentración de trabajo para el primer anticuerpo de 10.0 $\mu\text{g/mL}$, gráfica 2.4.

2.8.- Curvas estándar para la detección de antígenos de *O. volvulus* en suero y en orina, por ELISA modificado de doble anticuerpo .

Se prepararon soluciones patrón con el suero y la orina control negativo de los individuos sanos que no habían estado en zonas endémicas de oncocercosis, primeramente se agregaron 225.0 µg de proteína de los antígenos purificados de *O. volvulus* a 5.0 mL de suero o de orina para tener una concentración de 45.0 µg/mL, posteriormente se diluyeron en incrementos de dos desde 45.0 hasta 0.011 µg/mL, cada disolución se procesó como muestra problema para la detección de los antígenos mediante ELISA de doble anticuerpo modificado, con volúmenes de reactivos de 200.0 µL, la adsorción en las placas de microelisa se hizo con amortiguador de carbonatos 0.06 M, pH 9.6, las siguientes diluciones y los lavados se hicieron con PBS-Tween20, las placas se incubaron tapadas.

1.- Se adsorbieron los anticuerpos anti *O. volvulus* en una placa de microelisa¹, a la concentración estandarizada de 0.01 mg/mL de proteína, se incubó a 4°C toda la noche y se lavó tres veces.

2.- Se añadió el suero o la orina patrón diluidos 1:2 con PBS-Tween20 y se incubó 1 hora a 37°C y se lavó tres veces.

3.- Se añadió el conjugado anti *O. volvulus* diluido 1:50, se incubó 30 minutos a 37°C y se lavó tres veces.

4.- Se añadió orto-fenilen-diamina 3.4 M a todos los pozos, se incubó 30 minutos en la obscuridad, a temperatura ambiente.

5.- La reacción se paró con 25.0 µL de ácido sulfúrico 1N y finalmente se determinó la adsorbancia a 490 nm en un lector para microelisa¹ [1,38,66].

¹ Dynatech cat. M129A.

2.9.- Detección de los antígenos de *O. volvulus* en sueros y orinas de los oncocercosos.

Se determinó la presencia de antígenos de *O. volvulus* en las muestras de sueros y de orinas según se describió en la sección anterior para las soluciones patrón, el método se esquematiza en la figura 4 del capítulo I, cada muestra se procesó por duplicado, la concentración de los antígenos en ng/mL de proteína que correspondió a cada DO promedio a 490 nm se determinó en las curvas estándar para suero y para orina (gráficas 3.1 y 3.2).

2.10.- Cálculo de sensibilidad y análisis estadístico.

La sensibilidad del ELISA modificado de doble anticuerpo para detectar antígenos de *O. volvulus* en suero y en orina, se calculó como sigue:

$$\frac{\text{Número de pacientes positivos en ELISA}}{\text{Número de pacientes positivos verdaderos}} \times 100$$

Cada una de las muestras de los oncocercosos se analizaron por duplicado; las titulaciones de los conjugados, los anticuerpos y las curvas estándar se hicieron por cuadruplicado. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos y un control positivo, en los que se basó el cálculo de las desviaciones estándar; el control positivo de los antígenos de *O. volvulus* que se utilizó fue una disolución con 5 µg/mL de proteína, que se determinó por el método de Lowry.

Se determinó el valor de la línea de corte de las pruebas mediante el cálculo de la media de los controles negativos, a la que se le sumó dos veces la desviación estándar de la prueba:

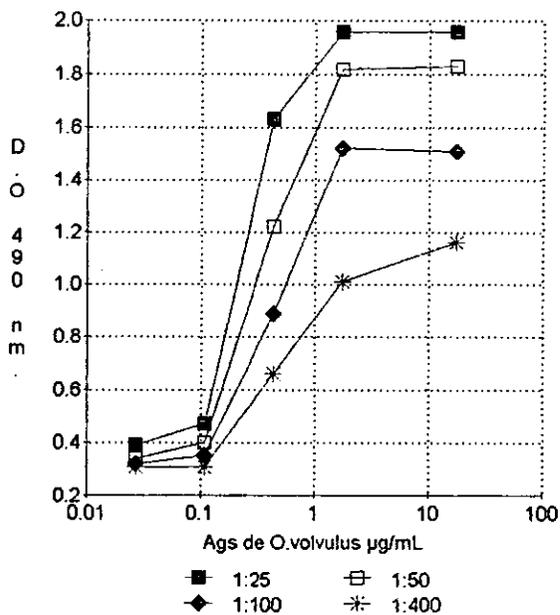
Línea de corte = media de los controles negativos + dos veces la desviación estándar.

Se determinó si existía diferencia significativa entre la media de las DO de los controles negativos de los individuos sanos y la media de las DO de los controles negativos de reacción cruzada, mediante un cálculo de significación con la prueba unilateral *t* de Student.

Se calculó el coeficiente de correlación *r* entre las DO observadas en las curvas estándar y las concentraciones de los antígenos expresados en dos formas: ng/mL y el logaritmo de los ng/mL, se calculó en un ensayo de hipótesis $\rho=0$ y la prueba unilateral de *t* de Student, la significación de los *r*.

Se calculó el coeficiente de correlación *r* entre las concentraciones de antígenos de *O. volvulus* detectados en los sueros y los números de microfilarias por mg de piel; entre la concentración de antígenos detectados en orina y los números de microfilarias por mg de piel y finalmente entre las concentraciones de los antígenos en orina y las concentraciones de los antígenos en suero. Se calculó en un ensayo de hipótesis $\rho=0$ y la prueba unilateral de *t* de Student. La significación de los *r*.

Para evaluar la relación de los resultados de los sueros con los de las orinas, puesto que en estas últimas fueron en su mayoría de cero, se determinó con una tabla de contingencia y la prueba de χ^2 , si había dependencia de los resultados en orina de los resultados en suero.



Gráfica 2.1

Titulación del conjugado anti *O. volvulus*.

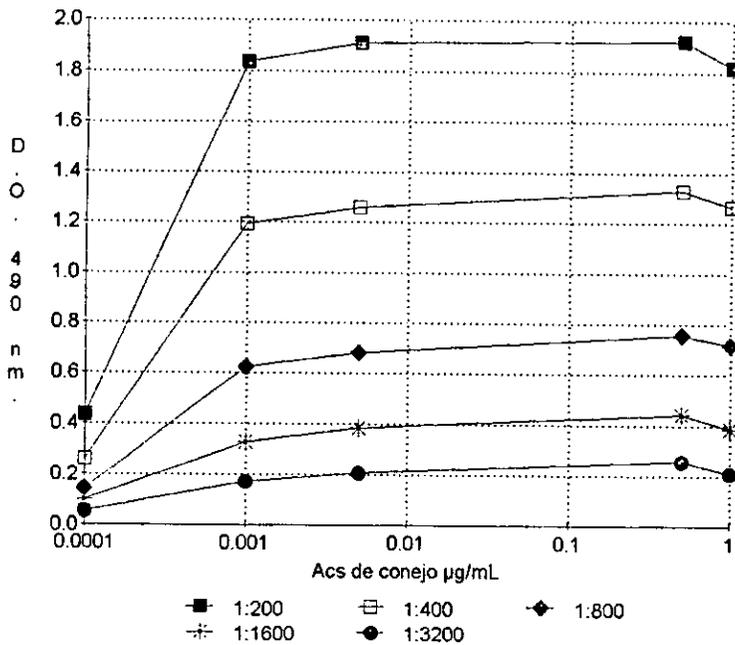
DO media de los controles = 0.035, desviación estándar = 0.195.

Línea de corte = (media + dos veces la desviación estándar) = 0.425.

Eje "X" en escala logarítmica, concentración de los antígenos de *O. volvulus* en incrementos de dos, desde 17.5 hasta 0.027 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

Diluciones del conjugado: 1:25, 1:50, 1:100 y 1:400.

Dilución seleccionada: 1: 50.



Gráfica 2.2

Titulación del conjugado anti-conejo.

DO media de los controles = 0.03, desviación estándar = 0.1735.

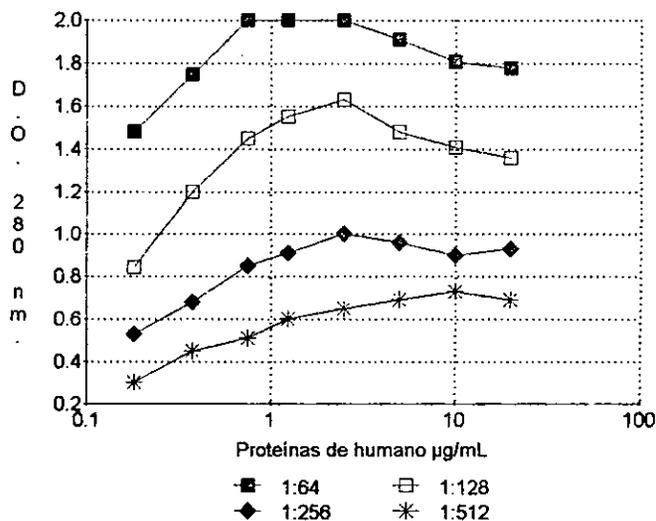
Línea de corte = (media + dos veces la desviación estándar) = 0.384.

Eje "X" en escala logarítmica, concentración de los anticuerpos de conejo.

100.0, 50.0, 5.0, 1.0 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

Conjugado anti-conejo diluido en incrementos de dos, desde 1:200 hasta 1:3,200.

Dilución seleccionada: 1: 400.



Gráfica 2.3

Titulación del anticuerpo anti-humano.

Prueba en tablero de ajedrez: ELISA indirecto.

Antígeno: suero humano diluido en incrementos de dos desde 10.0 hasta 0.18 µg/mL de proteínas.

Anticuerpo: anti-humano diluido en incrementos de dos, desde 1:64 hasta 1:512.

Conjugado anti-conejo 1:400 en PBS-tween20.

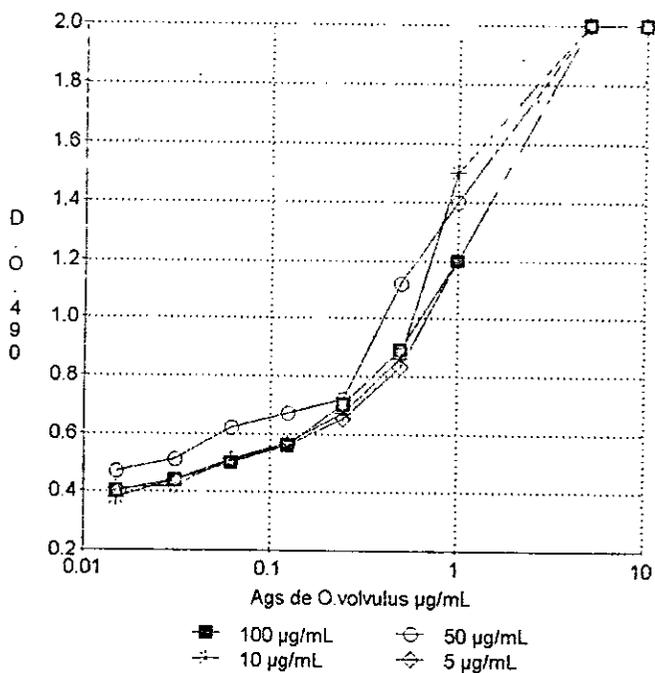
DO media de los controles = 0.039, desviación estándar = 0.164.

Línea de corte = (media + dos veces la desviación estándar) = 0.367.

Eje "X" en escala logarítmica, suero normal humano diluido en incrementos de dos desde 20.0 hasta 0.18 µg/mL de proteína.

Diluciones del anticuerpo anti-humano de: 1:64, 1:128, 1:256, 1:512.

Dilución del anticuerpo anti-humano seleccionada: 1:128.



Gráfica 2.4

Titulación del anticuerpo anti *O. volvulus*, como primer anticuerpo para la prueba de ELISA de doble anticuerpo modificada.

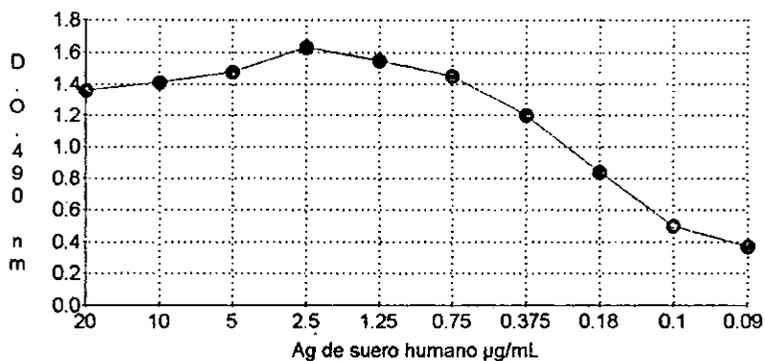
DO media de los controles = 0.08, desviación estándar = 0.2

Línea corte = (media + dos veces la desviación estándar) = 0.48

Eje "X" en escala logarítmica antígenos diluidos en incrementos de dos, desde 10.0 hasta 0.015 µg/mL de proteína.

Diluciones del anticuerpo anti *O. volvulus*: 100.0, 50.0, 10.0, 5.0 µg/mL de proteína.

Concentración de trabajo seleccionada 10.0 µg/mL (0.01 mg/L).



Gráfica 2.5, ELISA indirecto, curva estándar para detectar antígenos de suero humano o anticuerpo anti-humano.

Curva de respuesta a diferentes concentraciones de antígenos de humano en la prueba de ELISA indirecto.

DO media de los controles = 0.15, desviación estándar = 0.06

Línea de corte = (media + dos veces la desviación estándar) = 0.27

Antígeno humano diluido en incrementos de dos desde 20.0 hasta 0.092 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

CAPITULO III
Resultados

CAPITULO III

Resultados:

3.1.- Resultados de la cuenta de microfilarias en las biopsias de piel de los individuos oncocercosos.

Número de microfilarias por mg de piel	Número de pacientes
10 a 19	1
20 a 29	3
30 a 39	3
40 a 49	4
50 a 59	2
60 a 69	3
70 a 79	1
80 a 89	4
90 a 99	3
100 a 109	0
110 a 119	1
TOTAL	25

Tabla 3.1.- Distribución de frecuencia del número de microfilarias por mg de piel de los 25 pacientes estudiados.

3.2.- Curvas estándar.

Se prepararon dos curvas estándar con ELISA modificado de doble anticuerpo, para detectar los antígenos de *O. volvulus* en el suero y en la orina de oncocercosos, la curva con suero normal adicionado de antígeno puro se muestra en la gráfica 3.1, con una línea de corte de 0.36 y la curva con orina normal adicionada de antígeno se muestra en la gráfica 3.2, con una línea de corte de 0.012.

Se preparó una curva estándar con ELISA indirecto, que se aplicó con las variaciones descritas en la sección 2.6 para determinar antígenos de suero humano y anticuerpos anti-suero humano (preparados en conejo), la curva se muestra en la gráfica 2.5, esta curva dio una línea de corte de 0.27. Con esta curva se determinó la presencia de anticuerpos anti-humano en el suero anti *O. volvulus* y su eliminación por inmunoadsorción, ver secciones 2.4 y 2.6.

En este trabajo todos los ELISAs se procesaron sin bloqueo después de la adsorción en la fase sólida, las DOs medias que se observaron en los controles negativos fueron bajas y no se presentaron problemas de inespecificidad, lo que demostró que el Tween20 funcionó adecuadamente, también como agente bloqueador.

3.3.- Detección de antígenos de *O. volvulus* en muestras de suero y de orina de oncocercosos.

Los promedios de DO que resultaron del ELISA modificado de doble anticuerpo, aplicada a los sueros y las orinas de oncocercosos, se extrapolaron en las curvas estándar correspondientes para obtener la concentración de antígeno de *O. volvulus* en ng/mL de proteína.

Los resultados se muestran en la tabla 3.2 y la gráfica 3.3.

Número de microfilarias por mg de piel.	Detección de Ag en:	
	suero.	orina.
	+ / Núm. de pacientes	
10 a 19	0/1	0/1
20 a 29	2/3	0/3
30 a 39	3/3	0/3
40 a 49	4/4	2/4
50 a 59	2/2	0/2
60 a 69	3/3	0/3
70 a 79	1/1	0/1
80 a 89	4/4	1/4
90 a 99	3/3	1/3
100 a 109	0/0	0/0
110 a 119	1/1	0/1
TOTAL	23/25	4/25

Tabla 3.2.- Resultados de los sueros y las orinas en los que se detectaron antígenos de *O. volvulus* divididos por las frecuencias del número de microfilarias de los 25 pacientes.

3.4.- Resultados del cálculo de sensibilidad y análisis estadístico.

El cálculo de la sensibilidad para la prueba aplicada en suero fue de: $(23/25) \times 100 = 92.0 \%$ y en orina fue de: $(4/25) \times 100 = 16.0 \%$.

Los resultados del cálculo de las desviaciones estándar y línea de corte para los ELISAs realizados en este trabajo se dan en los pies de las gráficas y las secciones correspondientes.

Las diferencias entre la media de las DO de los controles negativos y la media DO de los controles negativos de reacción cruzada fueron de: 0.02 unidades de DO tanto en suero como en orina. Las diferencias entre las desviaciones estándar fueron de 0.01 para suero y no hubo diferencias para orina, el análisis de estos datos demostró que no hay significación entre las diferencias de los controles negativos y los controles negativos de reacción cruzada a un nivel $p < 0.001$ con la prueba unilateral t de Student.

El coeficiente de correlación r de la recta de regresión entre la concentración de antígenos de O. v. y la DO a 490 nm para las dos curvas estándar y el nivel de significación de los coeficientes de regresión por el ensayo de hipótesis de $\rho = 0$ con la prueba t de Student unilateral, donde se consideraron 11 grados de libertad, dió los siguientes resultados:

Para la curva estándar con orina adicionada de antígenos, se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.72$ (coeficiente de determinación $r^2=0.52$) con nivel de significación de $p < 0.005$ en la prueba de t de Student unilateral, lo que demuestra correlación significativa.

Para la curva estándar con suero adicionado de antígenos, se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.69$ (coeficiente de determinación $r^2=0.48$) con

nivel de significación de $p < 0.005$ en la prueba t de Student unilateral, lo que demuestra correlación significativa.

El coeficiente de correlación r de la recta de regresión entre el logaritmo de la concentración de los antígenos y la DO, así como el nivel de significación en un ensayo de hipótesis de $\rho = 0$ con la prueba de t de Student unilateral, donde se consideraron 11 grados de libertad, dió los siguientes resultados:

Para la curva estándar en suero, el coeficiente de correlación fue de: $r = 0.98$ (coeficiente de determinación $r^2=96$), el nivel de significación fue de: $p < 0.001$ en t de Student unilateral, lo que demuestra correlación significativa.

Para la curva estándar en orina, el coeficiente de correlación fue de: $r = 0.96$ (coeficiente de determinación $r^2=92$), el nivel de significación fue de: $p < 0.001$ en t de Student unilateral, lo que demuestra correlación significativa.

El coeficiente de correlación r de la recta de regresión entre la concentración de antígenos en suero y el número de microfilarias en piel en un ensayo de hipótesis de $\rho = 0$ con la prueba de t de Student unilateral, dió los siguientes resultados: coeficiente de correlación $r = 0.30$ (coeficiente de determinación $r^2=0.09$) con nivel de significación de $p < 0.2$ con la prueba de t de Student unilateral, con 23 grados de libertad, no hay correlación significativa.

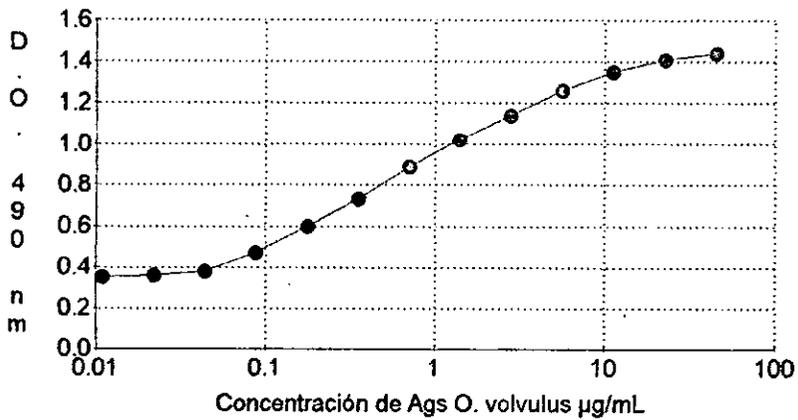
El coeficiente de correlación r de recta de regresión entre la concentración de antígenos en orina y el número de microfilarias por mg de piel, dió los siguientes resultados: coeficiente de correlación $r = 0.13$ (coeficiente de determinación $r^2= 0.017$) con nivel de significación de $p < 0.3$, con 23 grados de libertad, en una prueba de t de Student unilateral, no hay correlación significativa.

El coeficiente de correlación de las DO en orina y las DO en suero, dió un coeficiente de correlación $r = 0.495$ (coeficiente de determinación $r^2= 0.245$) con

nivel de significación de $p < 0.01$, con 23 grados de libertad, en la prueba de t de Student unilateral, lo que demuestra que las DO correlacionan significativamente [31].

Se evaluó el nivel de significación de la diferencia entre la DO media de los sueros y las orinas de oncocercosos que fueron positivos para la presencia de antígenos de *O. volvulus* y la DO media de los controles negativos, el cálculo con una prueba t de Student unilateral [31] demostró que las diferencias tienen un nivel de significación de $p < 0.001$.

Para evaluar los resultados de las concentraciones obtenidas en suero y orina, puesto que en la mayoría de las orinas, la concentración de antígenos fue de cero, se utilizó una tabla de contingencia y la prueba de χ^2 , los resultados demostraron que los niveles de antígeno en orina son independientes de los que se observaron en suero, a un nivel de significación de $p < 0.001$.



Gráfica 3.1

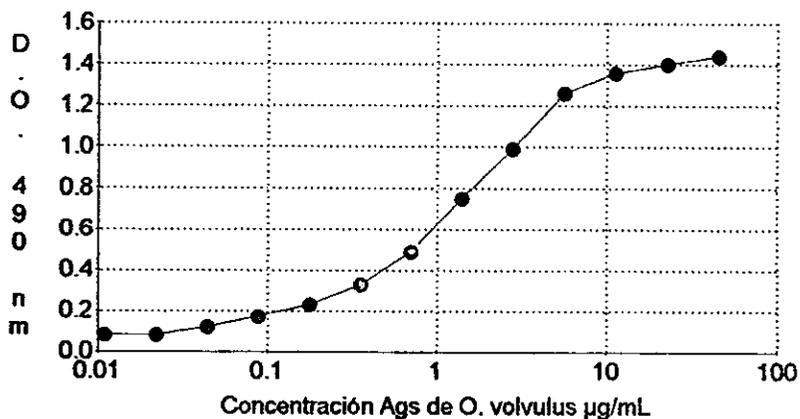
Curva estándar para el ELISA modificado de doble anticuerpo.

Con antígenos purificados de *O. volvulus* disueltos en suero normal humano.

DO media de los controles = 0.24, desviación estándar = 0.06.

Línea de corte = (media + 2 desviación estándar) = 0.36.

Eje "X" en escala logarítmica, concentración de los antígenos de *O. volvulus* en incrementos de 2 desde 45.0 hasta 0.011 µg/mL de proteína.



Gráfica 3.2.

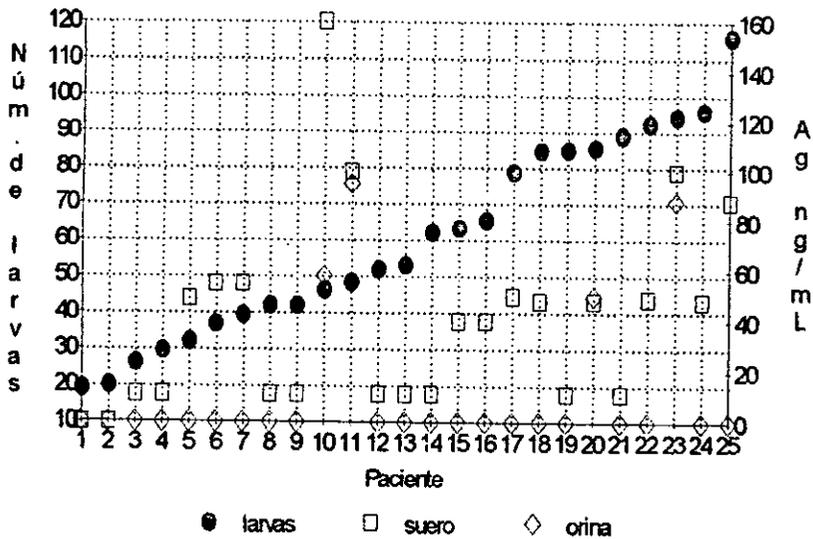
Curva estándar para el ELISA modificado de doble anticuerpo.

Con antígenos purificados de *O. volvulus* disueltos en orina normal.

DO media de los controles = 0.04, desviación estándar = 0.04.

Línea de corte = (media + 2 desviación estándar) = 0.12.

Eje "X" en escala logarítmica, concentración de antígenos de *O. volvulus* en incrementos de 2 desde 45.0 hasta 0.011 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.



Gráfica 3.3 Detección cuantitativa de antígeno de *O. volvulus* en suero y orina de pacientes oncocercosos.

Eje "Y" izquierdo: muestra el número de microfilarias por mg de piel.

Eje "Y" derecho: muestra los ng/mL proteína de Ags de *O. volvulus* detectados en el ELISA modificado de doble anticuerpo.

Se muestran los ng/mL de proteína de antígenos detectados en suero: cuadros, en orina: rombos y el número de larvas por mg de piel: círculos.

DISCUSSION

DISCUSION:

El propósito de este trabajo fue comprobar que con el ELISA modificado de doble anticuerpo se pueden detectar los antígenos de *O. volvulus* presentes en el suero y la orina de oncocercosos y contar así con una prueba para diagnosticar la parasitosis con ventajas sobre el método parasitológico tradicional.

Los antígenos de *O. volvulus* se obtuvieron a partir de nódulos glicerizados, ya que son un material accesible y la extracción es fácil. Estos antígenos fueron buenos inmunógenos en conejos, ya que se lograron títulos de 1:32 en Ouchterlony.

El método se aplicó en sueros y orinas de pacientes, en los que la oncocercosis se confirmó mediante el conteo de larvas en biopsias de piel, el número de microfilarias por mg de piel que se observó, correspondió a un nivel medio con respecto al que se observa en los oncocercosos [14]. La selección de los pacientes fue aleatoria y no se obtuvieron datos clínicos adicionales.

No se presentaron reacciones cruzadas con los sueros y orinas de individuos parasitados con nemátodos intestinales, el análisis estadístico de los resultados en las pruebas control negativo demostró que las diferencias entre las DO de los controles de reacción cruzada y las DO de los controles negativos no fueron significativas, $p < 0.001$. Esto es una ventaja sobre el diagnóstico serológico, en el cual se han reportado anticuerpos originados por nemátodos intestinales que dan reacción cruzada con los antígenos de *O. volvulus* [11,63.67].

En el caso de aplicar la prueba en muestras de pacientes de regiones donde son endémicas otras filariasis, se deberán utilizar anticuerpos anti *O. volvulus* más específicos, como pueden ser los anticuerpos monoclonales.

El ELISA modificado de doble anticuerpo aplicado a los sueros tuvo una sensibilidad del 92.0 % y en las orinas de solamente el 16.0 %. En un trabajo anterior con ELISA indirecto se reportó la detección de antígenos con una sensibilidad del 92.3 % en suero y del 85.9 % en orina [54], este último dato difiere de lo que se encontró en este trabajo, sin embargo, hay reportes de observaciones en otras parasitosis en las que tampoco se detectó antígeno en orina: pacientes infectados por *Schistosoma spp.* y de perros parasitados con *D. immitis* [11,30], estos resultados concuerdan con los hallazgos.

Las razones de la negatividad en las muestras de orina de pacientes parasitados pudiera deberse a que no están presentes los antígenos, o estos se encuentran en concentraciones muy bajas que escapan a la sensibilidad de la técnica, lo que podría deberse a la función depuradora del riñón, la cual solamente permite el paso a la orina de proteínas de bajo peso molecular.

La presencia de antígenos en la orina también puede depender de la integridad del aparato urinario, que se altera cuando hay cronicidad, o por una reacción inflamatoria que puede ocurrir por la reacción inmune contra el parásito.

También es posible que con antígenos de bajo peso molecular, pueda disminuir la sensibilidad de una prueba de dos sitios de unión a anticuerpo, como la que se desarrolló. Esto podría explicar la diferencia con el ELISA indirecto en el que anteriormente se encontró una sensibilidad mayor.

Otra posibilidad sería que las proteínas precipitadas de 10 mL de orina contenían una concentración muy baja de antígenos, por lo tanto es importante intentar la prueba con volúmenes más grandes.

Los cálculos de correlación entre la concentración de antígenos y el número de microfilarias por mg de piel fueron para el suero de: $r = 0.30$, $p < 0.2$ y para orina de: $r = 0.13$, $p < 0.3$; en ambos casos no tuvieron significación, estos resultados coinciden con trabajos en los que tampoco se encontró correlación entre el número de microfilarias y los antígenos detectados en suero [14,54] o en orina [30], sin embargo, se ha reportado que los niveles de los antígenos de *O. volvulus* en leche materna si correlacionan con el número de microfilarias por mg de piel [44].

En este trabajo se realizaron curvas estándar para evaluar la concentración de antígenos de *O. volvulus*, las DO que se obtuvieron se aproximan a las reportadas en pruebas semicuantitativas [14,54].

Las curvas estándar para la detección cuantitativa de antígenos de *O. volvulus* con un ELISA modificado de doble anticuerpo, demostraron que la correlación entre el logaritmo de la concentración de proteína de los antígenos y las DO fue: en suero $r = 0.98$, $p < 0.005$ y en orina $r = 0.96$, $p < 0.005$, por lo que el método es adecuado para la cuantificación de los antígenos de *O. volvulus* en suero.

La prueba presenta grandes ventajas sobre los métodos que requieren equipos costosos y personal especializado y sobre los métodos parasitológicos tradicionales por las molestias que se causan al paciente. El procedimiento se puede realizar en cualquier laboratorio, la prueba puede ser cuantitativa y prescindir del micro lector de ELISA. Las placas se pueden sensibilizar

previamente y conservarlas en refrigeración, lo que disminuye el tiempo de procesamiento. Se puede aumentar la sensibilidad si se amplifica la reacción inmuno-enzimática con un conjugado anti-conejo o el sistema avidina-biotina.

Una posibilidad muy importante, es que el método se puede simplificar adsorbiendo el antígeno en soportes sólidos como papel filtro o en membranas y así será factible realizar la prueba en el campo a un costo muy bajo, por personal técnico no especializado y con un resultado inmediato.

La técnica tiene un grado de dispersión pequeño como se observa en las desviaciones estándar que fueron menores de 0.06 unidades de DO y la especificidad fue satisfactoria como se demostró con los resultados de los controles de reacción cruzada, además, existe la posibilidad de que se pueda mejorar la sensibilidad en la detección de antígenos en la orina. Por lo tanto el método es una buena alternativa para substituir los métodos parasitológico tradicionales que causan mayor molestia al paciente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

La estandarización del ELISA modificado de doble anticuerpo para la detección de antígenos de *O. volvulus* y la aplicación de la prueba en los sueros y las orinas de 25 individuos con diagnóstico de oncocercosis, demostró que:

- 1.- Los niveles de antígeno en suero y en orina de oncocercosos no correlacionaron con el número de microfilarias en piel.
- 2.- Los nódulos preservados en glicerina fueron una fuente adecuada para la obtención de antígenos de *O. volvulus*, con los cuales se obtuvieron sueros con títulos de anticuerpos de 1:32 en conejos.
- 3.- El ELISA modificado de doble anticuerpo detectó antígenos en el suero de oncocercosos, con una sensibilidad del 92 % y además fue específico por lo que se propone como un método adecuado para el diagnóstico en lugar de realizar la cuenta de microfilarias en cortes de piel y así causar menos molestias al paciente.
- 4.- La técnica estudiada detectó antígenos en las proteínas precipitadas de 10 mL de orina de oncocercosos, con una baja sensibilidad del 16 %, que podría optimizarse.
- 5.- En este trabajo se observó que las concentraciones de antígenos en orina fueron independientes de las concentraciones en suero.
- 6.- La detección de los antígenos, mediante la técnica propuesta, demostró que no hubo reacción cruzada en los sueros control de individuos con parasitosis por nemátodos intestinales, ($p < 0.001$).

APENDICE

APENDICE:

Preparación de anticuerpos: esquemas de inmunización.

Obtención de suero anti humano en conejos:

Esquema de inmunización, vía intramuscular y cubcutánea [15].

Día	antígeno proteínas	diluyente / volumen	vía intramuscular y subcutánea
0	180.0 µg	ACF/1.0 mL	i.m. 1x muslo pata trasera
7	180.0 µg	ACF/1.0 mL	i.m. 1x muslo pata trasera
57	180.0 µg	ACF/1.0 mL	i.m. 5x dorso
71	250.0 µg	ACF/1.0 mL	i.m. 5x dorso
79	sangría	40.0 mL 2 días	punción cardiaca
87	500.0 µg	AIF/1.0 mL	s.c. 5x dorso
98	1.0 mg.	ss /1.0 mL	s.c. 5x dorso
102,105	sangría	40.0 mL 3 días	punción cardiaca
Antígeno: suero humano			

Abreviaturas:

ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
ss	Solución salina
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenosa
s.c.	Subcutánea

Preparación de anticuerpos anti *O. volvulus* (antígeno libre de componentes humanos) en conejos:

Esquema de inmunización [15].

Día	antígeno proteínas	diluyente / volumen	vía subcutánea
1	150.0 µg	ACF / 2.0 mL	s.c. 6X dorso
9	250.0 µg	AIF / 2.0 mL	s.c. 6X "
22	250.0 µg	ss / 1.0 mL	s.c. 5X "
37	250.0 µg	ss / 1.0 mL	s.c. 5X "
41	250.0 µg	ss / 1.0 mL	s.c. 3X "
57	250.0 µg	ss / 0.3 mL	s.c. 3X "
71	250.0 µg	ss / 0.3 mL	s.c. 3X "
79	250.0 µg	ss / 0.3 mL	s.c. 3X "
104	250.0 µg	ss / 0.3 mL	s.c. 5X "
107	250.0 µg	ss / 0.3 mL	s.c. 5X "
116	sangría	40.0 mL 3 días	arteria de la oreja

Antígeno: *Onchocerca volvulus* libre de componentes humanos

Purificación de los anticuerpos.

Los anticuerpos que se utilizaron en este trabajo se purificaron por precipitación con sulfato de amonio y después por cromatografía en resina de intercambio aniónico: primeramente se diluyó el suero¹ 1:2 en PBS pH 7.2, 0.1 M y se precipitaron las proteínas con sulfato de amonio saturado hasta una concentración final del 50%, tres veces, el último precipitado se disolvió en 20.0 mL de amortiguador de fosfatos (PB) 0.0175 M, pH 7.0, se dializó contra el mismo amortiguador hasta eliminar sulfatos y se pasó por una columna de resina de intercambio aniónico, DEAE², preparada según las instrucciones del fabricante. Las dimensiones de la cama de resina fueron de 2.4 cm de diámetro por 34.0 cm de altura, se equilibró con PB 0.0175 M, pH 7.0 a 22°C y se adicionaron los anticuerpos. La elución fue con el mismo amortiguador, a un flujo de 0.24 mL/min, las fracciones colectadas fueron de 5.0 mL, se comprobó la presencia de proteínas por DO a 280 nm, los anticuerpos se concentraron por ultrafiltración con membrana Amicon XM100A, se verificó la reacción contra el antígeno correspondiente por la técnica de Ouchterlony [41] y de inmunoelectroforésis [15], se determinó por el método de Lowry [33] el contenido de proteínas en la fracción concentrada y se almacenó en alícuotas de 1.0 mL a -20°C.

1 Whatman 52-DE

2 Los anticuerpos liofilizados anti-conejo se disolvieron 2g en 60 mL de PBS

Amortiguadores [66]:

Amortiguadores para preparar conjugados:

Solución amortiguadora de acetato de sodio 1.0 mM pH 4.4

Uso: para dializar la mezcla peroxidasa / periodato.

Solución A

Acetato de sodio anhidro	8.24 g
Agua destilada	c.b.p. 1.0 L

Solución B

Acido acético glacial	6.005 mL
Agua destilada	c.b.p. 1.0 L

Mezclar 1 parte de A por 2 de B y diluir 1 : 100 con agua tridestilada, ajustar si es necesario con ácido acético 1.0 M a pH 4.4

Solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH 9.5

Uso: para neutralizar la disolución de NaIO₄/peroxidasa de rábano dializada en acetatos

Solución A:

Na ₂ CO ₃ anhidro	21.2 g
Agua destilada	c.b.p. 1.0 L

Solución B:

NaHCO ₃	16.8 g
Agua destilada	c.b.p. 1.0 L

Mezclar B con A hasta pH 9.5

Amortiguadores para ELISA.

Solución amortiguadora de fosfatos-salina-Tween20 0.05 %, pH 7.4, 0.13 M.

Uso: solución de lavado y disolvente de reactivos que no se adsorben a la fase sólida en ELISA (PBS-Tween20).

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	2.9 g
Tween 20	0.5 mL
Agua tridestilada	c.b.p. 1.0 L

Amortiguador de carbonatos 0.06 M pH 9.6

Uso: Amortiguador de adsorción en las placas para microelisa.

Solución A

Na ₂ CO ₃ anhidro	8.4 g
Agua destilada	c.b.p. 1 L

Solución B

NaHCO ₃	10.6 g
Agua destilada	c.b.p. 1 L

Solución de trabajo:

Mezclar 45.3 mL de A con 18.2 mL de B, agregar agua destilada c.b.p. 1 L

Solución amortiguadora de ácido cítrico-fosfato

Uso: para preparar el sustrato de la peroxidasa de rábano: orto-fenilen-diamina (OPD)

Acido cítrico 0.1 M	24.3 mL
Na ₂ HPO ₄ 0.2 M	25.7 mL
Agua destilada	c.b.p. 100.0 mL

Preparación del sustrato de la peroxidasa de rábano: orto-fenilen-diamina 3.8 M

(OPD):

Orto-fenilen-diamina	8.0 g
Amortiguador ácido cítrico / fosfato	10.0 mL
Peróxido de hidrógeno al 30 %	100.0 µL
Agua destilada	10.0 mL

REFERENCIAS

REFERENCIAS.

- 1.- Ausubal, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Strohl, K. Editors. (1987) Currents protocols in molecular biology. 1st Ed., vol. 2, U.S.A.: Editorial Limusa Wiley: 11.1.1-11.2.19 .
- 2.- Avrameas, S. (1969) Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde, use of conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochem.* 6(1):43-52.
- 3.- Avrameas, S. and Ternynck, T. (1971) Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochem.* 8(12): 1175-1179.
- 4.- Ayalde, J. (1979) Oncocercosis en las Americas en: Memorias: Simposium Internacional "La oncocercosis en México". Gómez-Priego A. Editor. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: 23-37.
- 5.- Beaver, P.C., Hira, P.R. and Patel, B.G. (1983) Onchocerciasis in Zambia: Report of *O. volvulus* in a child and its differentiation from *O. elukei* in cattle. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77(2):162-166.
- 6.- Beck, J.W. y Davies, J. E. (1983) Parasitología Médica. 3a Ed. México: Editorial Interamericana: 155-169.
- 7.- Beltrán-Hernández, F., Gómez Priego A., Martínez Chacón J.F. y Ortega Gutiérrez M. (1979). Investigaciones Recientes sobre la Oncocercosis en Chiapas. en: Memorias: Simposium Internacional "La oncocercosis en México." Gómez-Priego A. Editor. San Cristóbal de las Casas, Chiapas:159-180.

- 8.- Bradley, J.E., Trenholme, K.R., Gillespie, A.J., Guderian, R., Titanji, V., Hang, Y. and Mc Reynolds, L. (1993) A sensitive serodiagnostic test for onchocerciasis using a cocktail of recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**(2):198-204.
- 9.- Büttner, D.W., Laer, G.V., Mannweiler, E. and Büttner, M. (1982) Clinical parasitological and serological studies on onchocerciasis in the Yemen Republic. *Tropenmed. Parasit.* **33**(3): 201-212.
- 10.- Cabrera, Z. and Parkhouse, R.M.B. (1986) Identification of antigens of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca gibsoni* for diagnostic use. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**(3):225-231.
- 11.- Carlier, I., Bout, D., Bina, J. C., Camus, D., Figueiredo, J. F.M. and Capron, A. (1975) Immunological studies in human schistosomiasis I.- Parasitic antigen in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**(6):949-954.
- 12.- Cupp, E.W. (1992) Treatment of onchocerciasis with ivermectin in Central America. *Parasitol. Today* **8**(6):212-214.
- 13.- Chávez Núñez, M. (1979) Epidemiología de la oncocercosis en la República Mexicana. *Salud Pública Mex.* **21**(6):707-718.
- 14.- Des Moutis, I., Ouaiissi, A., Grzych, J.M., Yarzabal, L., Haque, A. and Capron, A. (1983) *Onchocerca volvulus*: detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**(3):533-542.
- 15.- Dresser, D.W., (1986) Immunization of experimental animals in: Handbook of experimental immunology and immunochemistry Weir, D.M. Editor. 4th Ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 27.1-27.20.

16.- Elson, L.H., Guderian, R.H., Araujo, E., Bradley, J.E., Days, A. and Nutman, T.B. (1994) Immunity to onchocerciasis: Identification of a putatively immune population in a hyperendemic area of Ecuador. *J. Infect. Dis.* **169**(3):588-594.

17.- Ewert, E., Corredor, A., Lichtner, L. and D'Alessandro, A. (1979) Onchocerciasis focus in Colombia follow-up study after 12 years. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* **28**(3):486-490.

18.- Faust, E.C., Russel, P.F. y Clifton, J.R. (1978) *Parasitología Médica*. 1a Ed. Barcelona: Salvat editores: 380-387, 786-787.

19.- Fernández de Castro, J. (1979) Historia de la oncocercosis. *Salud Pública Mex.* **21**(6):283-696.

20.- Fragoso, R. (1979) Algunas observaciones que apoyan el origen precolombiano de la enfermedad de Robles en América. *Salud Pública Mex.* **21**(6):697-706 .

21.- Gallin, M., Edmons, K., Ellner, J.J., Esttman, K.D., White, A.T., Newland, H.S., Taylor, H.R. and Greene, B.M. (1988) Cell-mediated immune responses in human infection with *Onchocerca volvulus*. *J. Immunol.* **140**(6):1999-2007.

22.- Gallin, M.Y., Murray, D., Lass, J.H., Grossniklaus, H.E. and Greene, B.M. (1988) Experimental interstitial keratitis induced by *Onchocerca volvulus* antigens. *Arch. Ophthalmol.* **106**(10):1447-1452.

23.- Gibson, D.W., Heggie C. and Connor DH (1980) Clinical and pathologic aspects of onchocerciasis. *Pathol. Ann.* **15**(part. 2):195-240.

24.- Gómez-Priego, A. (1995) Conceptos actuales para el diagnóstico de la oncocercosis. *Rev. Mex. Patol. Clin.* **42**(1):31-40.

- 25.- Gómez-Priego, A., Paniagua-Solis, J.F., Rivas-Alcalá, R.A. and Ruenes-Meza, M.T. (1985) Successful application of the diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) in onchocerciasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79(2):159-161.
- 26.- Gómez-Priego, A., Cruz-Gutiérrez, L.E., Paniagua-Solis, J.F. and Ruenes-Meza, M.T. (1993) Dig ELISA test in onchocerciasis, serum antibodies and probability of infection. *Arch. Med. Res.* 24(4):353-359.
- 27.- Greene, B.M. (1984); Onchocercosis in: Tropical geographic medicine, 1st Ed. U.S.A.: Mc Graw-Hill. Inc. : 413-422 .
- 28.- Greene, B.M., Taylor, H.R. and Aikawa, M. (1981) Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J. Immunol.* 127(4):1611-1618.
- 29.- Guderian, R.H., Swanson, D., Carrillo, D.R., Proaño, R., Molea, J. and Swanson, W.L. (1983) Onchocerciasis in Ecuador. II.- Epidemiology of the endemic focus in the province of Esmeraldas. *Tropenmed. Parasit.* 34(3):149-154.
- 30.- Grauer, G.F., Culham, C.A., Bowman, D.D., Mika-Grieve, M. and Grieve, R.B. (1998) Parasite excretory-secretory antigen and antibody to excretory-secretory antigen in body fluids and kidney tissue of *Dirofilaria immitis* infected dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39(4):380-344.
- 31.- Kreysig, E. (1987) Introducción a la estadística matemática: Principios y métodos. 1a Ed. México: Editorial Limusa Wiley: 315-378.

- 32.- Lavebratt, C., Dalhammer, G., Adamafo, M.A., Nykänen-Dejerud, U., Mingarini, K., Ingemarsson, K., Opoku, N. and Akuffo, H.O. (1994) A simple dot blot assay adaptable for field use in the diagnosis of onchocerciasis: Preparation of an adult worm antigen fraction wich enhances sensitivity and specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88(3):303-306.
- 33.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(2):265-275.
- 34.- Manson-Bahr, D.R. (1987), Onchocerciasis, in: Manson's Tropical Diseases. Manson-Bahr Editors. 19th Ed. London: 374 - 405.
- 35.- Martínez Baéz, M. (1982) Manual de parasitología médica. 2a Ed. México: Prensa Médica Mexicana: 304-307.
- 36.- Martínez-Reynoso, R.D. (1979). La oncocercosis en México; Situación actual de la endemia. *Salud Pública Mex.* 21(6):761-769.
- 37.- Merino, F. and Brand, A.. (1977) Immunological studies in onchocerciasis patients. *Tropenmed. Parasit.* 28(4):229 -234.
- 38.- Nakamura, R.M., Voller, A. and Bidwell, D.E. (1986) in: Handbook of experimental immunology and immunochemistry. Weir, D.M. Editor. 4th Ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 27.1 - 27.20.
- 39.- Nakene, P.J. and Kawaoi, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22(7):1084 -1091.
- 40.- Ortega, M.G. y Róvelo, J.E. (1990) Oncocercosis en el Soconusco, Chiapas. Caracterización clínica de las lesiones dermatológicas en una comunidad de alta endemia. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 37(1):37-43 .

41.- Ouchterlony, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5(1):1-78.

42.- Ottesen, E.A. (1984) Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78(Suppl.):9-17.

43.- Parkhouse, R.M.E., Bofil, M. Gómez-Priego, A. and Janossy, G. (1985) Human macrophages and T-lymphocyte subset infiltrating nodules of *Onchocerca volvulus*. *Clin. Exp. Immunol.* 62(1):13 - 18.

44.- Petralando, I., Yarzabal, L. and Piessens, W.F. (1988) Parasite antigens are present in breast milk of women infected with *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38(2):372-379.

45.- Prost A. (1980) Latence parasitaire dans l'onchocercose. *Bull WHO* 58(6): 923-925.

46.- Raez, P., Tenner-Raez, K., Albiez, E.J. and Buttner, D.W. (1982) Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchocercal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmed. Parasit.* 33(3):213-218.

47.- Rassi, M.H., Monzon, H., Castillo, M., Hernández, I., Ramirez-Pérez, J. and Convit, J. (1977). Discovery of a new onchocerciasis focus in Venezuela. *Bull. Pan. Am. Hlth Org.* 11(1): 41-49.

48.- Reporte (sin autores) (1997) Onchocerciasis, report from the Interamerican conference on onchocerciasis in Oaxaca, México. *Weekly Epidem. Rec.* 72(29):215-218.

49.- Rivas-Alcalá, R. and Schlie-Guzmán, A. (1987) La oncocercosis como problema de salud en el sureste de México. *Bol. Chil. Parasitol.* 42(3):58-63.

- 50.- Rodríguez-Martínez, J.C., Álvarez-Lucas, C.H. y Ferreira-Guerrero, E. (1998) Oncocercosis. *Epidemiología* 15(7):1-3.
- 51.- Rodríguez-Pérez, M.A. y Reyes-Villanueva, F. (1994) Efecto de la Ivermectina sobre la transmisión de *Onchocerca volvulus* en el sur de México. *Salud Pública Mex.* 36(3):281-290.
- 52.- Rodríguez-Pérez, M.A., Rodríguez, M.H., Margeli-Pérez, H.M. and Rivas-Alcalá, A.R. (1995) Effect of semiannual treatments of Ivermectin on the prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* skin infection, ocular lesions, and infectivity of *Simulium ochraceum* population in southern Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52(2):429-434.
- 53.- Ruiz Reyes F. (1952) Datos históricos sobre el origen de la Oncocercosis en América. *Medicina* 32(645): 1-50.
- 54.- Schlie-Guzmán, M.A. and Rivas-Alcalá, R.A. (1988) Antigen detection in onchocerciasis: correlation with worm burden. *Trop. Med. Parasitol.* 40(1):47-50.
- 55.- Schulz-Key H., Albiez, E.J. and Buttner, D.W. (1977) Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed. Parasitol.* 28(3):428-430.
- 56.- Shultz-Key, H. (1988) The collagenase technique. How to isolate and examine adult *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug effects. *Trop. Med. Parasitol.* 39(3):423-440.
- 57.- Singh, B. (1997) Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int. J. Parasitol.* 19(6):1135-1145.

- 58.- Sisley, B.M., B.M., Mackenzie, C.D., Steward, M.W. Williams, J.F., O'Dag, J., Luty, A.J., Braga, M. and Sheikh, H. (1987) Associations between clinical disease, circulating antibodies and C1q-binding immune complexes in human onchocerciasis. *Parasite Immunol.* 9(4): 447-463.
- 59.- Soberón, G. y Peláez, D. (1975) Nociones de Parasitología Médica y Patología Tropical. 2a Ed. México: Francisco Méndez Oteo Editor: 329-333.
- 60.- Soboslay, P.T., Newland, H. S., White, A.T., Erttmann, K.D., Albiez, E.J., Taylor, H.R., Williams, P.N. and Greene, B.M. (1987) Ivermectin effect on microfilariae of *Onchocerca volvulus* after a single oral dose in humans. *Trop. Med. Parasit.* 38(1):8-10.
- 61.- Steward, M.W., Barbara, S., Mackenzie, C.D. and Sheikh, H.E. (1982) Circulating antigen-antibody complexes in onchocerciasis. *Clin. Exp. Immunol.* 48(1):17-24.
- 62.- Schwartz, D.A., Brandling-Bennett, A.D., Figueroa, H., Connor, D.H., Gibson, D.W. (1983) Sowda-type onchocerciasis in Guatemala. *Acta Trop.* 40(4):383-389.
- 63.- Tay, J., Gutiérrez, Q.M., Rodríguez, M., López, R.M. y Romero, C.R. (1993) Microbiología y Parasitología Médicas. Méndez Cervantes Editores., 1a Ed, vol 3 México: 245-255.
- 64.- Taylor, H. R. and Greene, B.M. (1989) The status of Ivermectin in the treatment of human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41(4):460-466.
- 65.- Torroella, J. (1979) Lesiones Oculares en: Memorias: Simposium Internacional "La oncocercosis en México" Gómez-Priego A. Editor. San Cristóbal de las Casas, Chiapas:199-201.

- 66.-Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. (1979) The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. 1st Ed. U.S.A. Dynatech Laboratories, Inc.: 7-56.
- 67.- Voller, A. and De Savigny, D. (1981) Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *J. Immunol. Meth.* **46**(1):1-29.
- 68.- Whittaker, R.H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**(3667):150-159.
- 69.- Wildenburg, G., Korten, S., and Büttner, D.W., (1988) Mast cell distribution in nodules of *Onchocerca volvulus* from untreated patients with generalizated onchocerciasis. *Parasitol.* **116**(1):257-268.
- 70.- World Health Organization. (1997) Onchocerciasis, River blindness, reporte técnico. *Internet.* <http://www.who.ch/programmes/ctd/act/onchact.html/>.
- 71.- World Health Organization. (1987) WHO, Expert committee on onchocerciasis, 3rd. report, *Technical Report Series N° 752* Geneve .
- 72.- Zimmerman, P.A., Guderian, R.H., Araujo, E., Elson, L., Phadke, P., Kubofcik, J. and Nutman, B.T. (1994) Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patientes with onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **169**(3):686-689.