

Comparación de técnicas del diagnóstico inmunoserológico de la Neurocisticercosis

*Roxana Carrasco, Tania Ampuero, Clara Camacho, Hortensia Miguez, Mario Barragán

Abstract

Enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.), Immunofluorescence (I.F.), and Indirect Hemagglutination (H.A.I.) tests were evaluated and compared with each other in the immunodiagnosis of Neurocisticercosis disease. The concordance between the techniques was from 84.24% to 100% in sera and of 90% in cerebrospinal fluid (C.S.F.) The statistical analysis showed a good correlation in sera and C.S.F. between E.L.I.S.A. and I.F., a finding which was verified by linear regression equation. H.A.I. technique showed the best sensitivity, however it presented 3 false positives.

Resumen

Las técnicas de la enzima ligada al inmunoabsorbente (ELISA), Inmunofluorescencia (I.F.) y la Hemaglutinación indirecta (H.A.I.) fueron evaluadas y comparadas en el diagnóstico de la Neurocisticercosis. la concordancia entre las técnicas fue del 84,21% al 100% en suero y del 90% en el líquido cefalorraquídeo L.C.R.

Los estudios estadísticos mostraron una buena correlación del suero y L.C.R. entre las técnicas de E.L.I.S.A. e I.F. lo cual fue verificado por la ecuación de regresión lineal.

La técnica de H.A.I. mostró aparentemente la mejor sensibilidad, pero sin embargo presentó 3 falsos positivos.

Introducción

La Cisticercosis es una enfermedad debida a la forma larvaria de la *Taenia solium* que afecta principalmente al sistema nervioso central dando lugar a la Neurocisticercosis.

Actualmente se consideran por lo menos cuatro criterios para el estudio de la Neurocisticercosis:

* Instituto Boliviano de Biología de Altura.

- a) el epidemiológico
- b) el clínico
- c) el tomográfico
- d) el inmunológico

Todos estos aspectos son importantes para el diagnóstico. Varias son las técnicas evaluadas por diferentes estudios:

- Reacción de fijación de complemento
- Reacción de precipitación
- Hemaglutinación indirecta
- Inmunofluorescencia indirecta y últimamente la
- Técnica de E.L.I.S.A.

ampliamente utilizada en el diagnóstico de diferentes patologías parasitarias.

En este estudio evaluamos y comparamos las técnicas de E.L.I.S.A., I.F. y H.A.I. aplicadas al diagnóstico de la Neurocisticercosis. Se estudiaron 160 sueros y 43 L.C.R. provenientes de pacientes y sujetos aparentemente sanos, los cuales sirvieron para la estandarización de las técnicas y la comparación de las mismas.

Material y Métodos

Antígeno:

El extracto antigénico salino soluble total, fue preparado según COSTA 1986, a partir de carne de cerdo infectada con *Cisticercus cellulosae*. Una vez que los cisticercos fueron separados por disección, estos fueron muy bien lavados en solución salina y conservados a -70°C . Posteriormente para la preparación del extracto soluble se resuspendieron los cisticercos enteros o rotos en agua destilada. Esta preparación fue sometida a homogenización por 5' a 4°C y posteriormente fueron ultrasonificados a 40 Khz por 4 períodos de 30" en baño de hielo. Finalmente se isotonizó llevándose nuevamente a 3 períodos de ultrasonificación. Se dejó la mezcla a 4°C por dos horas en agitación lenta y seguidamente se llevó a centrifugar durante 30' a 10.000 g. a 4°C .

El sobrenadante obtenido constituyó el extracto salino donde se determinó la concentración de proteínas y polisacáridos. Este antígeno soluble se utilizó para E.L.I.S.A. y H.A.I. Para I.F. se utilizaron cortes al criostato de 4 micras a -20°C .

Sueros humanos:

Se utilizaron sueros bien referenciados: 19 sueros de pacientes con Neurocisticercosis comprobada en base a datos clínicos y 78 sueros de individuos aparentemente sanos, 49 sueros de pacientes con otras parasitosis (Chagas,

Leishmania y Toxoplasmosis). Además 14 sueros de pacientes con otras enfermedades neurológicas.

L.C.R.

Se estudiaron 10 L.C.R. de pacientes con Neurocisticercosis confirmada y 17 L.C.R. de individuos aparentemente sanos sin alteraciones en el examen licoórico. Por otra parte se estudiaron 14 L.C.R. de pacientes con otras enfermedades neurológicas.

Tanto para los sueros como para los líquidos se contó con testigos reactivos y no reactivos de títulos conocidos.

Procedimientos Serológicos y de L.C.R.:

Técnica inmunoenzimática E.L.I.S.A.

Se realizó mediante el método de ARAMBURO (1978) con algunas modificaciones. Se utilizaron las placas de poliestireno de fondo plano (Cooke Microtiter-Greiner, Alemania) sensibilizándolas con el antígeno soluble a una concentración de 20 ug/ml en tampon carbonato bicarbonato pH 9.6.

El conjugado anti IgG humana marcada a la peroxidasa (Instituto Pasteur de París-Francia) fue utilizada a un título de 1/5.000. La dilución del suero fue de 1/20 para el suero y puro para el L.C.R. Los valores de absorvancia fueron medidos espectrofotométricamente a 410 nm.

Técnica de I.F.:

Como antígeno se utilizaron cortes de 4 micras de *Cisticercus cellulosae* fijados en Tissue Teck a -20°C. El método utilizado fue el de WELLER y COONS 1954 modificado. El conjugado fluoresceinado anti IgG humana (H+L) del Instituto Pasteur de París-Francia, se utilizó a un título de 1:150. El suero a la dilución de 1/20 y 1/40 y el L.C.R. puro. La lectura se efectuó con microscopio de inmunofluorescencia con lámpara de mercurio y filtro BG-12.

Técnica de H.A.I.:

La técnica de H.A.I. requiere de diferentes pasos previos a su estandarización: formolización de los G.R., tanización y sensibilización de los mismos con el antígeno, determinándose la concentración óptica de G.R. sensibilizados, que en nuestro caso fue de 150 ug/ml de antígeno soluble.

Se procedió de acuerdo al método de UEDA 1988 y se utilizó placas de

poliestireno de microtitulación de 120 pozos con fondo en V. Las diluciones de los sueros fue a partir de 1/2.

Resultados

Se determinó la concentración proteica y polisacáridica del antígeno soluble por medio de las técnicas de LOWRY y ANTRONA respectivamente. Estos datos nos sirvieron para determinar la concentración óptima de antígeno para las técnicas de ELISA y Hemaglutinación.

Determinación de los valores límites de las técnicas:

Determinación del valor umbral en suero y L.C.R. en ELISA:

Para la determinación del valor umbral significativo utilizamos 78 muestras de sueros de individuos aparentemente sanos y 14 L.C.R. de individuos controles sin alteraciones en el examen licuórico.

Nº de sueros	= 78
Promedio X	= 0,18
1 Desviación standard	= 0,05
2 Desviación standard	= 0,10
Valor Umbral	= X + 2. D.S.
Valor Umbral	= 0,18 + 0,10
Valor Umbral = 0,28 D.O. para Sueros en ELISA	
Nº de L.C.R.	= 14
Promedio X	= 0,11
1 Desviación standard	= 0,03
2 Desviación standard	= 0,06
Valor Umbral	= X + 2 D.S.
Valor Umbral	= 0,11 + 0,06
Valor Umbral = 0,17 D.O. para L.C.R. en ELISA	

Determinación del título significativo de reactividad en sueros y L.C.R. para la técnica de I.F. en base a la técnica de E.L.I.S.A.

Se efectuó sobre los 19 sueros de pacientes con Neurocisticercosis establecida y los 78 sueros de individuos controles sanos con la que se hicieron diluciones a partir de 1/20 hasta 1/640.

La positividad se consideró a partir de 1/20, (Tabla I)

Tabla I

Determinación del título significativo de positividad en suero para la técnica de IF, en base a la técnica de referencia ELISA.

* ELISA D.O.	TITULOS IF (0 a 3 cruces)					
	20	40	80	160	320	640
0.10 - 0.14	-	-	-	-	-	-
0.15 - 0.19	-	-	-	-	-	-
0.20 - 0.24	-	-	-	-	-	-
0.15 - 0.29	±	-	-	-	-	-
0.30 - 0.34	+	-	-	-	-	-
0.35 - 0.39	+	±	±	-	-	-
0.40 - 0.44	+	+	±	-	-	-
0.45 - 0.49	++	+	+	±	-	-
0.50 - 0.54	++	+	+	+	-	-
0.55 - 0.59	++	+	+	±	±	-
0.60 - 0.64	++	++	+	±	-	-
0.65 - 0.69	+++	++	+	+	±	-
0.70 y mas	+++	++	+	+	+	±

* Resultado de exámenes de sueros reactivos y no reactivos en la técnica de E.L.I.S.A.

En la tabla I podemos observar que a partir o por encima de la D.O. 0,30 de ELISA, se encuentran los títulos iguales o superiores a 1/20 para I.F. y que corresponden a los pacientes con Neurocisticercosis comprobada. Por debajo de la D.O. 0,30 para ELISA y 1/20 para I.F. se encuentran los controles sanos.

En lo que se refiere a las muestras de L.C.R. para determinar el límite significativo en I.F., tuvimos 10 muestras de Neurocisticercosis confirmada y 14 muestras de L.C.R. de controles sanos. El L.C.R. se cargó puro hasta la dilución 1/32. Se consideró la muestra positiva cuando era reactiva al ser cargada pura. (Tabla II).

Tabla II

Determinación del título significativo de positividad en LCR para la técnica de IF, en base a la técnica de referencia ELISA.

* ELISA D.O.	0 a 3 cruces					
	IF 1	2	4	8	16	32
0.05 - 0.09	-	-	-	-	-	-
0.10 - 0.14	-	-	-	-	-	-
0.15 - 0.19	±	-	-	-	-	-
0.20 - 0.24	+	±	-	-	-	-
0.25 - 0.29	+	+	±	±	-	-
0.30 - 0.34	+	+	+	±	-	-
0.35 - 0.39	++	+	+	+	±	-
0.40 - y mas	+++	++	+	+	+	±

* Resultado de exámenes de LCR reactivos y no reactivos en la técnica de ELISA.

En la tabla II, podemos observar que los líquidos por debajo de la D.O. 0,15 para ELISA y que son negativos al ser cargados puros para I.F., corresponden a los controles sanos. Por otra parte los L.C.R. que se encuentran por encima de la D.O. 0,15 y que son positivos al ser cargados puros o diluidos para IF, corresponden a las muestras de pacientes con Neurocisticercosis.

Determinación del título significativo de positividad en suero para la técnica de H.A.I. en base a las técnicas de ELISA e I.F.:

Siempre en base a los 19 sueros de Neurocisticercosis y 78 sueros de los controles sanos, se hizo la determinación del valor significativo para H.A.I. El suero fue diluido a partir de 1/2 para adelante. (Tabla III) Los valores encontrados en ambos grupos, nos permiten elegir el título de 1/2 como significativo para H.A.I.

Tabla III

Determinación del título significativo de positividad en suero para la técnica de H.A.I., en base a las técnicas de ELISA e IFI.

	D.O. 1/20	Título: 1/20	H.A.I. título
ELISA, IFI	0.15	(-)	(-) 1/2
ELISA, IFI	0.20	(-)	(-) 1/2
ELISA, IFI	0.25	(-)	(-) 1/2
ELISA, IFI	0.30	(±)	(+) 1/2*
ELISA, IFI	0.35	(+)	(+) 1/4
ELISA, IFI	0.40	(+)	(+) 1/8
ELISA, IFI	0.45	(+)	(+) 1/8
ELISA, IFI	0.50	(++)	(+) 1/16
ELISA, IFI	0.55	(++)	(+) 1/16
ELISA, IFI	0.60	(++)	(+) 1/32
ELISA, IFI	0.65	(+++)	(+) 1/32
ELISA, IFI	0.70	(+++)	(+) 1/64
ELISA, IFI	0.75	(+++)	(+) 1/128

* 1/2 Título significativo de positividad

Determinación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas:

De acuerdo a los resultados encontrados en las 3 diferentes técnicas, se estudió la sensibilidad y especificidad de las mismas en base a sueros y líquidos de los diferentes grupos estudiados: 19 sueros de Neurocisticercosis comprobada, 49 sueros con otras parasitosis, 14 sueros de otras enfermedades neurológicas, 10 L.C.R. de Neurocisticercosis comprobada y 14 L.C.R. de controles aparentemente sanos, (Tabla IV).

Tabla IV

Sensibilidad y especificidad de las técnicas

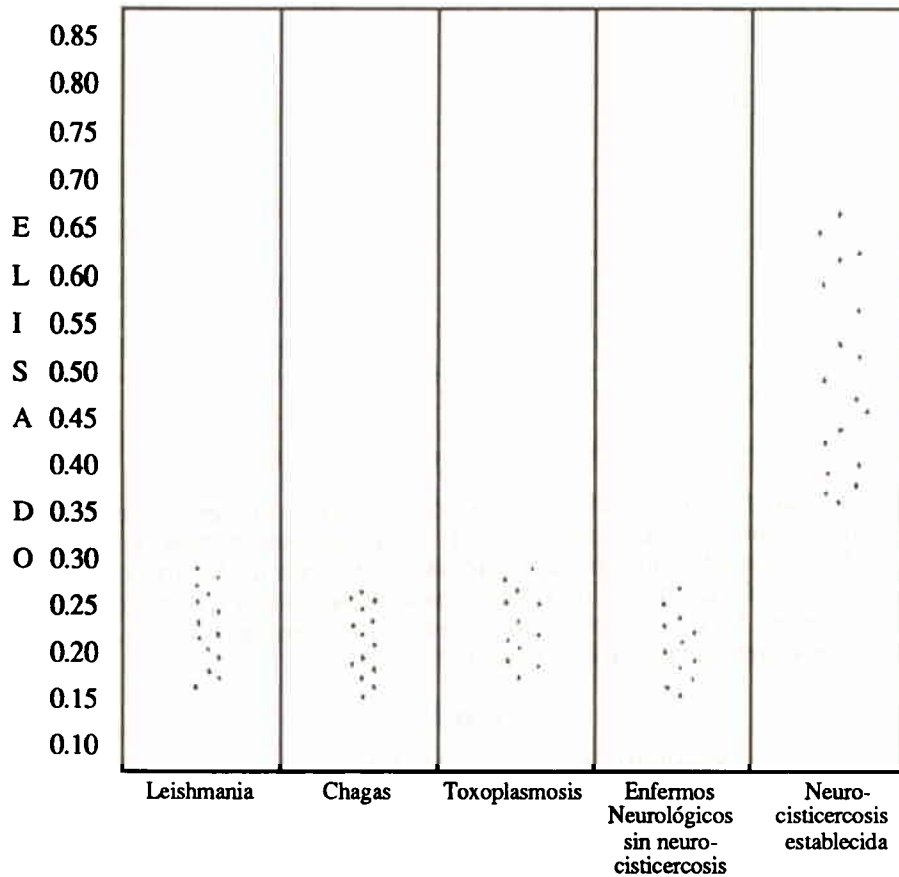
	Sensibil. en suero	Sensibil. en LCR	Especif. en suero	Especif. en LCR
Téc. de ELISA	89,5%	90%	100%	100%
Téc. de I.F.	84,0%	90%	100%	100%
Téc. de H.A.I.	100,0%	* N.D.	97%	N.D.

* N.D. = No determinada

La sensibilidad y especificidad de la técnica de E.L.I.S.A puede ser apreciada en la figura N° 1

Figura 1

Resultado de sueros de otras parasitosis y enfermos neurológicos sin neurocisticercosis, frente a neurocisticercosis establecida.



Concordancia y correlación de las técnicas entre suero y L.C.R. de los pacientes con Neurocisticercosis establecida

En el estudio de la concordancia y discordancia de las técnicas aisladas y asociadas fue efectuado en los 19 sueros y 10 L.C.R. de los pacientes con neurocisticercosis. (Tabla V).

Tabla V

Concordancia y discordancia de técnicas aisladas y asociadas en muestras de suero y LCR de enfermos con neurocisticercosis.

Técnicas	Concordancia		Discordancia		
	Nº sueros	Porcentaje %	Falsos Positivos	Falsos Negativos	
S ELISA	17	89.47	0	2	
U IF	16	84.21	0	3	
E HAI	19	100.00	2	0	
R ELISA, IF	16	84.21	1	0	
O ELISA, HAI	17	89.47	0	2	
S IF, HAI	16	84.21	0	3	
	ELISA, IF, HAI	16	84.21	1	3
	Nº LCR	Porcentaje %	Falsos Positivos	Falsos Negativos	
L ELISA	9	90.00	0	1	
C IF	9	90.00	0	1	
R ELISA, IF	9	90.00	0	0	

Correlación cuantitativa entre las técnicas de E.L.I.S.A., I.F., y H.A.I.

Las rectas de correlación son calculadas por regresión lineal, cuyos coeficientes de correlación analizados con respecto al test de t de student son los siguientes: (Tabla VI).

Tabla VI

Correlación cuantitativa entre técnicas asociadas en sueros y LCR con neurocisticercosis establecida.

Técnicas	r	t	p
S ELISA, IF	0.838	6.631	≤ 0.001
R ELISA, HAI	0.857	6.858	≤ 0.001
O IF, HAP	1.295	---	---
L ELISA, IF	0.924	7.217	≤ 0.001

r: Coeficiente de corelación

t: Valor del t de student

p: Probabilidad

Discusión

El extracto salino total de antígeno, tuvo el rendimiento esperado tanto para la técnica de E.L.I.S.A. y H.A.I. En lo que se refiere a la técnica de I.F. se logró una buena lectura de la intensidad de la fluorescencia con cortes al criostato de *Cisticercus cellulosae*.

En nuestro estudio se halló la sensibilidad de las técnicas entre 84% a 100% en suero y entre 90% a 100% en L.C.R.; una especificidad del 97% a 100% en suero y del 100% en L.C.R. Estos resultados obtenidos estarían dentro los encontrados por estudios realizados por otros investigadores. Así para la técnica de E.L.I.S.A., MOHAMMAD et al en 1984 utilizando un antígeno delipidado reportaron una sensibilidad en suero de 89% y una especificidad del 100%; en L.C.R. una sensibilidad y especificidad del 94%; COSTA en 1986 obtuvo en E.L.I.S.A. 80% de sensibilidad y 97% de especificidad en suero y en L.C.R. 87,5% de sensibilidad y 100% de especificidad, en I.F. obtuvo 80% de sensibilidad y 97% de especificidad en suero y en L.C.R. 87,5% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Para la técnica de H.A.I. PROCTOR et al. 1966 utilizando como antígeno extracto salino delipidado encontró 85% de sensibilidad en sueros, UEDA et al, 1988 utilizando el mismo antígeno de nuestro estudio encontró un 81,7% de sensibilidad y un 94% de especificidad en muestras de LCR. El estudio de técnicas asociadas fue realizado en el hecho de que la mayoría de los laboratorios hacen uso de la combinación de por lo menos dos técnicas. En la asociación de E.L.I.S.A. y H.A.I., se tuvo una concordancia de 89,5%, sin embargo presentó 2 falsos negativos. Respecto a la combinación de E.L.I.S.A. e I.F.; I.F. y H.A.I. dieron una concordancia de 84%, observándose en E.L.I.S.A. e I.F. 1 falso positivo y ningún falso negativo. En I.F. y H.A.I. no se tuvo falsos positivos pero si 3 falsos negativos. Con estos resultados la combinación más aceptable en cuanto a falsos positivos y falsos negativos sería E.L.I.S.A./I.F., y en la única combinación de L.C.R. la concordancia entre E.L.I.S.A./I.F. fue del 90% y no presentó falsos positivos ni negativos.

En lo que se refiere a la correlación cuantitativa entre títulos de suero, la mejor fue entre E.L.I.S.A. e I.F. ($r: 0,838$, $r: 6,631$) evidenciado por la recta de regresión ($rs: 0,935$). Entre I.F. y H.A.I. no hubo correlación entre títulos. En L.C.R. igualmente se encontró una buena correlación entre E.L.I.S.A. e I.F. ($r: 0,924$ $t: 7,217$) y la recta de regresión $rs: 0,982$.

En base a los resultados obtenidos se sugiere la utilización de las técnicas

de E.L.I.S.A. e I.F. asociados y se aconseja en lo posible emplear como muestra el L.C.R. que es un elemento más importante que el suero en la Neurocisticercosis.

Agradecimientos:

Los autores agradecen la colaboración de los médicos residentes de Neurofisiología del Hospital de Clínicas. Dr. Federico Fortún y Dr. Carlos Flores.

Bibliografía

ARAMBURU III, P.V.: WALLS, K.W.; BULLOCK, S.; I.G. 1978. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme linked immunospecific assay (ELISA) *Acta trop (Brasil)* 35: 63-67

COSTA JULIA MARIA 1983 Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Tese Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de Sao Paulo, Departamento de Microbiologia e Imunologia.

COSTA JULIA MARIA 1986. Teste Imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da Neurocisticercose "Arquivos de Neuro-Psiquiatria" Vol. 44, Nº 1966 - Pag. 15-31.

LIVRAMENTO, J.A.: 1981. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano no estudo de neurocisticercose. *Arq. neuro-psiq. (S.Paulo)*, 39: 261-278.

MOHAMMAD, I.N.: HEINER, D.C.: MILLER, B.L.: GOLDBERG, M.A.; KAGAN, I.G.: 1984. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of cerebral cysticercosis. *Jour of clinical microb.*; 775 - 779.

NIETO, D; ESCOBAR, A; 1961. Cisticercosis of the Nervous System the biological diagnosis by a complement-fixation reaction. *Univ. At. Aut. Mex. D.F.*

PROCTOR, E.M.: POWELL, S.J.: ELSDON-DEW, R. 1966. The serological diagnosis of cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasito.* 60 146-151.

UEDA, M.: CAMARGO, D.E.: VAZ, A.J.: SOUZA, C.A.: FIGUEREIDO, R. M.: DA SILVA, M.V.: 1988. Passive Haemagglutination test for human

neurocysticercosis immunodiagnosis. I. Standardization and evaluation of the passive Haemagglutination test for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 30 (1): 51-56

WELLER COONS, A.H. 1954. Fluorescent antibodies studies with agents of varicells and herpes zoster prepared in vitro Proc Soc. Exp. Biol. (N.Y) 86; 789-794.