

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



***“Elaboración de antígeno soluble total de
Cysticercus cellulosae con cepa nativa para su
aplicación de la técnica del Ensayo Inmuno
Enzimático (ELISA) para el diagnóstico
indirecto”***

**TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
LICENCIATURA**

POR: GARCIA BALDERRAMA ANDREA GRICEL

LA PAZ – BOLIVIA
2015

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



***“Elaboración de antígeno soluble total de
Cysticercus cellulosae con cepa nativa para su
aplicación de la técnica del Ensayo Inmuno
Enzimático (ELISA) para el diagnóstico
indirecto”***

**TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
LICENCIATURA**

POR: GARCIA BALDERRAMA ANDREA GRICEL

TUTORA: DRA. STRAUSS ZEGADA WILMA

LA PAZ – BOLIVIA

2015

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA

TESIS DE GRADO:

***“Elaboración de antígeno soluble total de
Cysticercus cellulosae con cepa nativa para su
aplicación de la técnica del Ensayo Inmuno
Enzimático (ELISA) para el diagnóstico indirecto”***

Presentada por: *Garcia Balderrama Andrea Gricel*

Para obtener el grado académico de *Licenciada en Bioquímica*

Nota numeral:

Nota Literal:

Ha sido:

Directora de la carrera de Bioquímica: Dra. Strauss Zegada Wilma

Asesora: Dra. Strauss Zegada Wilma

Tribunal: Dr. Salamanca Capusiri Efraín

Tribunal: Dra. Soto Sánchez María Luz

Tribunal: Dr. Sosa Tordoya Luis Fernando

AGRADECIMIENTOS

Gracias mi Facultad FCFB-UMSA, Docentes, Mención Bioquímica Clínica, Seladis, Hospital Materno Infantil.

Dra. Wilma Strauss mi asesora, que desde el primer momento fue quien me presto su experiencia, dedicación, colaboración, afecto, concejos y recomendaciones en cada etapa de elaboración de este trabajo.

DEDICATORIA

Sueña lo que quieras soñar;
Ve donde quieras ir;
Se lo que quieras ser;
Ama intensamente;
Y sonríe....
.... La aventura del mañana
Apenas comienza
Anónimo

Este trabajo va dedicado a:

A Diosito y la Virgencita del socavón por regalarme todos los días de mi vida, y aquellos que descansan a su lado porque fueron importantes en mi vida.

A mi Familia porque la unión es lo más valioso, porque no importa la distancia, siempre estaremos unidos y lucharemos ante todo y contra todos, Mi papá por enseñarme que el trabajo es duro pero que todo esfuerzo vale la pena, Mi mamá por enseñarme la perseverancia porque sin importar el tiempo si lo quieres lo puedes lograr, Mi hermano por enseñarme que no importa lo que digan los demás si lo quieres lo haces, Mi Hermana por enseñarme a perdonar y dar cariño a todos aquellos que nos rodean.

A Carlos Gemio, mi amigo, mi compañero, mi confidente, te convertiste en la persona incondicional, juntos luchando contra la marea.

A Harold Heredia, Divia Guardia, y mi princesa Dulce Shanjana, por dejarme ser parte de su familia y ustedes de la mía.

A la Lic. Loza te convertiste en una gran amiga, a pesar de su poco tiempo me brindo su apoyo, aliento y sobre todo la que más apoyo me dio al guiarme en este camino de la investigación.

A mis amigos Los Adidas, Paty Loza, Yrma Poma, Marisel Mamani, Krystal Bedregal, (y a todos aquellos verdaderos amigos que pasaron por todas las etapas de mi vida) gracias por darme los mejores y malos momentos, las reuniones, las mejores charlas, los mejores consejos, etc. y se los llevara siempre en el corazón.

Mil Gracias a todos Ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 1 |
| 1.1 | Justificación | 1 |
| 1.2 | Objetivos..... | 3 |
| 2 | DISEÑO TEÓRICO | 4 |
| 2.1. | Marco referencial..... | 4 |
| 2.1.1. | Antecedentes generales..... | 4 |
| 2.2. | Marco teórico..... | 7 |
| 2.1.1 | Teniasis | 8 |
| 2.1.1.1 | Taenia solium | 9 |
| 2.1.1.2 | Morfología de Taenia solium | 10 |
| 2.1.1.3 | Ciclo de la Taenia solium..... | 15 |
| 2.1.2 | Cisticercosis humana..... | 20 |
| 2.1.3 | Neurocisticercosis | 23 |
| 2.1.3.1 | Infección en el cerdo | 24 |
| 2.1.3.2 | Infección en el hombre | 25 |
| 2.1.3.3 | Sintomatología..... | 25 |
| 2.1.3.4 | Métodos de laboratorio para el diagnóstico..... | 27 |
| 2.1.3.4.1 | Métodos de cuantificación por inmunoanálisis | 27 |
| 2.1.3.4.2 | Tipos de ELISA..... | 28 |
| 2.1.3.5 | Inmunodiagnóstico | 33 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.1.3.6 | Tratamiento de la Neurocisticercosis | 37 |
| 2.1.3.6.1 | Tratamiento en el humano | 38 |
| 2.1.3.6.2 | Tratamiento de la cisticercosis en el cerdo..... | 39 |
| 3 | HIPÓTESIS | 40 |
| 4 | DISEÑO METODOLÓGICO..... | 41 |
| 4.1 | Tipo de investigación | 41 |
| 4.2 | Obtención de la muestra biológica | 41 |
| 4.3 | Métodos | 42 |
| 4.3.1 | Equipos..... | 42 |
| 4.3.2 | Materiales..... | 42 |
| 4.3.3 | Reactivos | 43 |
| 4.3.4 | Procedimiento | 45 |
| 4.3.4.1 | Obtención de la muestra biológica infectada naturalmente con Cysticercus cellulosae | 45 |
| 4.3.4.2 | Obtención del extracto antigénico soluble | 46 |
| 4.3.4.3 | Proceso de liofilización | 48 |
| 4.3.4.4 | Sensibilización de la Microplaca o Policubeta y la determinación de la concentración adecuada del antígeno para el ELISA..... | 48 |
| 4.3.4.5 | Aplicación de la técnica de ELISA indirecto | 52 |
| 4.3.4.6 | Determinación del título diagnóstico de los sueros..... | 53 |
| 4.3.4.7 | Determinación del Cut off o Línea de corte | 55 |
| 5 | RESULTADOS | 57 |

| | | |
|----|----------------------|----|
| 6 | DISCUSIÓN | 63 |
| 7 | CONCLUSIÓN..... | 66 |
| 8 | RECOMENDACIONES..... | 67 |
| 9 | BIBLIOGRAFÍA | 68 |
| 10 | ANEXOS | 74 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Resumen de la Taxonomía de la Taenia solium | 9 |
| Tabla 2: Cuadro Resumen de la descripción de la Taenia solium (Gusano adulto) | 16 |
| Tabla 3: Cuadro resumen de la descripción del huevo de Taenia spp. | 17 |
| Tabla 4: Datos epidemiológicos nacionales de Cisticercosis y Tenias positivos durante los últimos 6 años..... | 23 |
| Tabla 5: Resumen del procedimiento de la técnica de ELISA..... | 53 |
| Tabla 6: Resultados de la determinación de Proteínas del extracto antigénico del sobrenadante fraccionado..... | 57 |
| Tabla 7: Obtención de datos por absorbancia para la obtención de la concentración antigénica óptima, para la sensibilización de la placa con el antígeno fresco. | 58 |
| Tabla 8: Obtención de datos por absorbancia para la obtención de la concentración antigénica óptima, para la sensibilización de la placa con el antígeno liofilizado..... | 58 |
| Tabla 9: Sensibilización de la placa con el antígeno fresco y liofilizado para la obtención de la concentración del antígeno usando ELISA..... | 59 |
| Tabla 10: Sensibilización de la placa con el antígeno fresco y liofilizado para la determinación del título diagnóstico del suero..... | 60 |
| Tabla 11: Sensibilización de la placa o Microplaca para la determinación del Cut off o línea de corte | 61 |
| Tabla 12: Tabla resumen para la determinación de la línea de corte | 62 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: <i>Taenia spp</i> , gusano adulto (Mide entre 2-5 metro) | 10 |
| Figura 2: <i>Taenia solium</i> : se observaba al microscopio electrónico de barrido; Cuello, Ganchos rostelares y Escólex..... | 11 |
| Figura 3: <i>Taenia solium</i> , Proglótidos grávidos: Se aprecia el conducto uterino central del que se desprenden las ramas en un número de 7-15, las cuales hacen la diferencia. | 13 |
| Figura 4: Larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> | 14 |
| Figura 5: Ciclo de vida de la <i>Tenia Solium</i> | 19 |
| Figura 6: Huevo fértil con embrión hexacanto de <i>Taenia spp</i> observado a 40 x | 20 |
| Figura 7: ELISA Directo | 30 |
| Figura 8: ELISA indirecto..... | 31 |
| Figura 9: ELISA Sándwich | 32 |
| Figura 10: Tratamiento específico para la Cisticercosis, Albendazol y Praziquantel. | 38 |
| Figura 11: Fraccionamiento del sobrenadante, para la determinación de proteínas | 47 |
| Figura 12: Dilución del antígeno soluble total sin liofilizar para la sensibilización de la Policubeta o Microplaca..... | 49 |
| Figura 13: Identificación de la Microplaca o Policubeta para la determinación de la concentración del antígeno..... | 51 |
| Figura 14: Dilución para la determinación del título diagnóstico de los sueros | 54 |
| Figura 15: Identificación de la Microplaca o Policubeta para la determinación del título diagnóstico de los sueros..... | 55 |
| Figura 16: Sensibilización de la placa o Microplaca para la determinación del Cut off o línea de corte | 56 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1: Identificación de las larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> de <i>Taenia solium</i> obtenidas de la carne de cerdo infectada por medio del microscopio..... | 74 |
| Anexo 2: Detalle morfológico y rango de tamaño de la <i>Taenia solium</i> | 75 |
| Anexo 3: Huevecillos de la <i>Taenia solium</i> | 76 |
| Anexo 4: Se observa la plazuela del municipio de Batallas, localidad Batallas, provincia Los Andes, ciudad de La Paz. | 77 |
| Anexo 5: Zonas con Cisticercosis endémica..... | 78 |
| Anexo 6: Obtención de la muestra biológica contaminado naturalmente con <i>Cysticercus cellulosae</i> en la comunidad de Copacabana, municipio de Batallas, localidad Batallas, provincia Los Andes, ciudad de La Paz. | 79 |
| Anexo 7: Muestra Biológica con larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> en el tejido de la carne de cerdo infectada naturalmente. | 80 |
| Anexo 8: Fraccionamiento de la muestra biológica con <i>Cisticercus cellulosae</i> | 81 |
| Anexo 9: Fracción de muestra biológica para la obtención de las larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> | 82 |
| Anexo 10: Obtención de las larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> | 83 |
| Anexo 11: larvas de <i>Cysticercus cellulosae</i> bien lavadas | 84 |
| Anexo 12: Obtención de la pasta antigénica usando un triturador manual..... | 85 |
| Anexo 13: Sonicado de la Pasta antigénica..... | 86 |
| Anexo 14: Determinación de la concentración de proteínas..... | 87 |
| Anexo 15: Sensibilización de la Placa o Policubeta | 88 |
| Anexo 16: Preparación de Reactivos | 89 |

RESUMEN

Las personas afectadas por Teniasis/Neurocisticercosis que es una enfermedad que producen anticuerpos séricos contra epítomos en estas proteínas del patógeno. En general, el ELISA indirecto permite detectar anticuerpos séricos contra el patógeno desde las primeras seis semanas de una infección. Es por eso que se obtiene antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* utilizando una cepa nativa de la región para su aplicación en técnicas de inmunodiagnostico. Se preparó antígeno crudo usando larvas obtenidas de la carne de cerdo infectada naturalmente. Las larvas fueron trituradas con un triturador de tejidos, mediante sonicación y lavadas por centrifugación para obtener extractos de proteínas para usarlos como antígeno. La concentración proteica fue de 25900 µg/mL y 30090 µg/mL. Se probó en placas de ELISA de 96 pocillos y se determinó las concentraciones de antígeno, sueros y puntos de corte, para permitir la diferenciación. Los controles positivos fueron sueros de pacientes diagnosticados con Neurocisticercosis; y los controles negativos fueron sueros de pacientes que dieron negativos a la infección. El valor de la concentración antigénica optima fue de 125 µg/mL, 1/64 para el suero; los valores de densidad óptica para las muestras positivas fueron en promedio 0.104, Desviación estándar 0.059, y el valor de la línea de corte es de 0.220, por lo tanto los valores por encima de este son considerados Positivos, y los valores por debajo de este son considerados negativos. Los resultados muestran que esta técnica puede constituirse en una prueba de tamizaje de Cisticercosis y Neurocisticercosis a la población por la elaboración del antígeno soluble total de manera casera.

Palabras clave: *Cysticercus cellulosae*; Neurocisticercosis; Cisticercosis; Teniasis; *Taenia solium*; ELISA; serología; diagnóstico de laboratorio.

SUMMARY

People affected by Taeniasis/neurocysticercosis which is a disease causing serum antibodies against epitopes in these proteins from the pathogen. In general, the indirect ELISA allows to detect serum antibodies against the pathogen from the first six weeks of infection. That's why it gets soluble Antigen total of *Cysticercus cellulosae* using a native strain of the region for use in immunodiagnostic techniques. Crude Antigen prepared using larvae from naturally infected pork meat. Larvae were crushed with a breaker of tissues by sonication and washed by centrifugation to obtain extracts of protein as an Antigen. The protein concentration was 25900 $\mu\text{g/mL}$ and 30090 $\mu\text{g/mL}$. Tested on 96-well ELISA plates and determined the concentrations of Antigen, Sera and cut-off points, to allow differentiation. Positive controls were Sera from patients diagnosed with neurocysticercosis; and negative controls were Sera from patients who were negative to the infection. The value of the Antigen concentration optimal was 125 $\mu\text{g/mL}$, 1/64 for serum; the values of optical density for positive samples were in 0.104 average, standard deviation 0.059, and the value of the cutting line is from 0.220, therefore values above this are considered positive and the values below this are considered negative. The results show that this technique can become a test of screening of cysticercosis and neurocysticercosis people by the development of total soluble Antigen's way home.

Key words: *Cysticercus cellulosae*; Neurocysticercosis; Cysticercosis; Taeniasis; *Taenia solium*; ELISA; serology; laboratory diagnosis

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Justificación

En los últimos años, la tasa de frecuencia del binomio Teniosis/Cisticercosis ha ido variando, por la capacidad de difundir la información necesaria y el control específico del manejo de carne de cerdo, crianza y alimentación específica en las ciudades. Pero todavía sigue existiendo problemas en el área rural de nuestro país motivo por el cual no se ha podido controlar dicha zoonosis.

La Teniasis y la Cisticercosis ocasionadas por diferentes estadios evolutivos de *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, falta de información, ignorancia y pobreza.

El diagnóstico de la Cisticercosis y la Neurocisticercosis humana se constituye en un problema para los laboratorios clínicos de nuestro país porque los reactivos no son elaborados a nuestras condiciones, es decir, por encima a los 3600 s.n.m. pueden cambiar o afectar la reacción e inclusive obligar a el bioquímico a cambiar la técnica y adecuarla a su laboratorio, si bien son confiables, ser estandarizados a sus condiciones, y claro realizar pruebas cuantitativas pero estos kits comerciales hacen que cada prueba diagnóstica tenga un alto costo, pero no se realizan pruebas de seguimiento para verificar el tratamiento.

La finalidad de este trabajo es la elaboración y obtención del antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* de una cepa nativa de manera casera usando la técnica de Ensayo Inmuno Enzimático (ELISA) en base a este antígeno para coadyuvar al diagnóstico más preciso de la Cisticercosis humana en nuestra región. Es una alternativa sabiendo que para un laboratorio es muy difícil obtener el kit comercial, puesto que se debe hacer el pedido del mismo a importadoras nacionales que trabajan en convenio con importadoras extranjeras, haciendo que se retrasen el trabajo del laboratorio e incluso perjudicar al paciente, es por eso que se pretende la obtención de un antígeno soluble total de una cepa nativa utilizando la técnica ELISA indirecto y así realizar los ensayos de una manera más rápida, donde el beneficiario directo sea el paciente y así coadyuvar al diagnóstico más preciso de la enfermedad y la capacidad de poder realizar el seguimiento de la enfermedad. Así se utilizaría el antígeno soluble total para aplicarlo en el laboratorio de rutina para el diagnóstico.

1.2 Objetivos

Objetivo General

- ✓ Obtener un antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* utilizando una cepa nativa de la región para su aplicación en técnicas de ELISA indirecto como diagnóstico.

Objetivos Específicos

- ✓ Obtener la muestra biológica para la elaboración de antígenos solubles de *Cysticercus cellulosae* con una cepa nativa de manera casera.
- ✓ Aplicar la técnica de ELISA para el diagnóstico de Cisticercosis utilizando los extractos antigénicos solubles totales obtenidos de una cepa nativa.
- ✓ Identificar la concentración antigénica óptima, dilución diagnóstica y línea de corte usando los antígenos solubles totales elaborados.

2 DISEÑO TEÓRICO

2.1. Marco referencial

2.1.1. Antecedentes generales

Los parásitos intestinales son reconocidos desde hace mucho tiempo, se ha encontrado escritos que datan de 1550 a.c. (Solorzano, 2003). Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los denominaron “gusanos planos” por su estrecho parecido a cintas o listones. Los romanos Celso, Plinio el viejo y Galeno los llamaron “lumbricus latus” que significa gusano ancho (Flisser y col., 1997).

Rummer (1558) fué pionero en comunicar un caso de Cisticercosis humana, descubriéndolo como un tumor. Panarolus observó quistes que tenían un parecido, en el cuerpo calloso del cerebro de una persona epiléptica, sino que hasta el siglo XIX que el ciclo de vida de *Taenia solium* fue elucidado por Kuchenmeister quien demostró en 1855 que las *Taenia* se desarrollan a partir del *Cysticercus cellulosae* (Ruiz, 2004).

Taenia solium es un serio problema de salud pública en zonas rurales endémicas (Pawlowski, 2005) pues su expresión zoonótica representa un grave problema de salud para el ser humano (González, 2002). Los estudios epidemiológicos indican que el portador puede permanecer infectado por varios años, se sabe que más del 80% de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia viven en países de ingresos bajos y medianamente bajos. *Taenia solium* es la causa del 30% de los casos de

epilepsia en muchas zonas endémicas donde hay cerdos en libertad cerca de donde viven las personas (OMS, 2015).

Por esta razón los niveles de Cisticercosis porcina afecta principalmente a la salud y el sustento de las comunidades dedicadas a la agricultura de subsistencia de los países en desarrollo de África, Asia y América Latina. También reduce el valor de mercado del ganado porcino, y sobre todo hace que la carne de cerdo no sea apta para el consumo (OMS, 2013). La Teniosis y la Cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son una problemática de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza (González, 2002).

El mapa de distribución de prevalencias del binomio Teniasis/Cisticercosis se ha ido actualizando considerablemente durante la última década no sólo en América Latina sino además en África y en Asia donde se han identificado áreas hiperendémicas (OMS, 2002; Phiri y col., 2003; Rajshekhar, 2003; Zoli y col., 2003). Sin embargo la enfermedad es prácticamente inexistente entre los países musulmanes dado que el Corán prohíbe el consumo de carne de cerdo.

La Cisticercosis humana es una enfermedad con un importante componente médico social y con impacto económico en el mundo, especialmente cuando su localización y afectación en el SNC (Flisser y col., 1997) por las larvas del helminto intestinal *Taenia solium* causando la Neurocisticercosis.

La Neurocisticercosis es una patología endémica en el sudeste asiático, África, América (central y del sur), etc. En la mayoría de países de África y Asia, no existen datos sobre la prevalencia real. En México, el 12% de las intervenciones de neurocirugía las motiva la Neurocisticercosis y hasta el 4% de las autopsias revelan la presencia parásitos en el SNC. En la India, esta enfermedad es la principal causa de crisis epilépticas, con una prevalencia similar a la de América latina. Es la primera causa de epilepsia adquirida en el adulto en países como Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, México, Bolivia, etc., siendo la principal razón de que la incidencia de crisis en dichos países duplique a la de los países desarrollados (Imirizaldu, 2004).

Sin embargo, en los últimos años, con el rápido incremento de la población, el diagnóstico de esta enfermedad ha aumentado de nuevo, es por eso que la Cisticercosis por *Taenia solium* sigue siendo una enfermedad desatendida y la OMS la añadió a la lista de las principales enfermedades tropicales desatendidas en 2010 (OMS, 2015).

2.2. Marco teórico

La Teniasis y Cisticercosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial. Es ocasionada por el metacestodo *Taenia solium* que tiene como hospedador definitivo (HD) al ser humano albergando la fase adulta en el tracto gastrointestinal y como hospedador intermediario (HI) al cerdo y como hospedero intermediario accidentalmente al propio ser humano albergando la fase larvaria del parásito (Soulsby, 1987; Cordero Del Campillo y Rojo, 1999). *Taenia solium* es un serio problema de salud pública en zonas rurales endémicas (Pawlowski, 2005) pues su expresión zoonótica representa un grave problema de salud para el ser humano (González, 2002).

Las condiciones socioeconómicas y culturales se encuentran asociadas a esta zoonosis ya que en cada uno de los momentos del ciclo de vida del parásito existen actividades humanas involucradas. La crianza de cerdos es una actividad que constituye el sustento económico de los habitantes de las zonas rurales. Sin embargo este tipo de crianza predispone a los animales a tener acceso a las heces contaminadas con los huevos de *Taenia solium* y desarrollar Cisticercosis (Garcia y col., 2005) por la falta de condiciones sanitarias en estas zonas, las cuales los alejan de tener todas las comodidades y servicios básicos que se tienen en la ciudad, como ser servicio eléctrico, agua potable y alcantarillado.

Por esta razón los niveles de Cisticercosis porcina son considerados un indicador epidemiológico de la intensidad de transmisión de la *Taenia solium* con mayor

frecuencia en Asia, África, Latino américa, México y Bolivia (Garcia et al., 2005). La Teniosis y la Cisticercosis, ocasionadas por *Taenia solium*, son una problemática de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza (González, 2002).

2.1.1 Teniasis

La Teniasis es una infección producida por los helmintos de la familia *Taenidae* en su fase adulta. Existen dos especies que afectan a los humanos: *Taenia solium* y *Taenia saginata*, mismas que requieren hospederos intermediarios, el cerdo en el caso de *Cysticercus cellulosae* y la vaca en el caso de *Cysticercus bovis* ya que las larvas muestran especificidad por su hospedero intermediario. El hombre es el hospedero definitivo obligatorio para ambas tenías (Garcia y col., 2010).

La teniasis intestinal es habitualmente asintomática, puede haber manifestaciones digestivas inespecíficas como dolor abdominal, hambre, flatulencia, alteraciones del tránsito intestinal (náuseas, vómitos o diarrea), pérdida de peso así como también manifestaciones nerviosas (irritabilidad); además es muy frecuente el prurito anal, puede haber síntomas alérgicos, se han comunicado casos de obstrucción intestinal y perforación intestinal con peritonitis secundaria (OPS, 2001).

2.1.1.1 *Taenia solium*

El cisticerco de la *Taenia solium* fue designado como *Cysticercus cellulosae*, a principios del siglo XIX. Sin embargo, dicho termino dejo de tener validez taxonómica una vez que se demostró que el cisticerco es la forma larvaria de la *Taenia*. Ver figura 1.

Tabla 1: Resumen de la Taxonomía de la *Taenia solium*

| | |
|-----------------|------------------------|
| Phylum | <i>Platyhelminthes</i> |
| Clase | <i>Cestoda</i> |
| Subclase | <i>Ceitodeos</i> |
| Orden | <i>Cyclophyllidea</i> |
| Familia | <i>Taenidae</i> |
| Genero | <i>Taenia</i> |
| Especie | <i>Taenia solium</i> |

Fuente: Modificado de <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/ficha-taxonomica.php?id=88&nivel=Phylum&nombre=Platyhelminthes>

La *Taenia solium* descritas por Vargas-Parada y col. (1999) indicaron que produce unas concreciones minerales denominadas corpúsculos calcáreos que se forman en el lumen de los ductos protonefridiales y no intracelularmente como se ha descrito para otros cestodos. Debido a su localización, es probable que dichos corpúsculos participen en procesos de desintoxicación. Cabe notar que todos los elementos celulares por debajo

del tegumento se distribuyen en forma poco organizada y sincicial en medio de un abundante tejido conectivo parasitario.

2.1.1.2 Morfología de *Taenia solium*

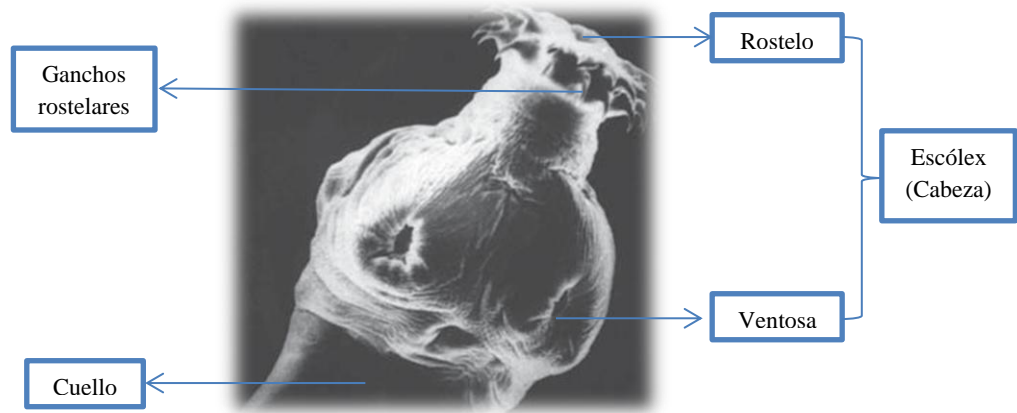
Figura 1: *Taenia spp*, gusano adulto (Mide entre 2-5 metro)



Verster (1969) indicó que las Tenias solitarias, como otras especies informado por genero *Taenia* son gusanos aplanados, excepcionalmente largos (Ver figura 1). La *Taenia solium* normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud, aproximadamente; el escólex posee cuatro ventosas y un róstelo coronado por dos hileras de ganchos (Ver figura 2).

El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173 μm (media 165.7 + 5.0). Tanto las ventosas como el róstelo son estructuras de fijación que capacitan a la solitaria para mantenerse anclada en la pared del yeyuno. Estudios realizados por Merchant (1998) en modelos experimentales han permitido un análisis detallado de la íntima unión que establece este parásito sobre la pared intestinal.

Figura 2: *Taenia solium*: se observaba al microscopio electrónico de barrido; Cuello, Ganchos rostelares y Escólex.



Fuente: Modificado de <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/porcinos/parasitos-internos/cestodes-taenia-solium.htm>

El proceso de estrobilación ocurre en la región distal del cuello. Los proglótidos son segmentos independientes pero unidos entre sí. Están recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincitial con funciones de secreción y absorción. El parénquima de los proglótidos inmaduros cuenta con abundantes fibras musculares lisas y bolsas de glucógeno, estructuras que son menos aparentes conforme se van desarrollando los órganos genitales.

La presencia del tejido muscular explica los constantes movimientos de contracción y relajación que se observan tanto en el cisticerco como en el gusano adulto vivo. La presencia de abundantes partículas de glucógeno distribuidas entre todas las estructuras, sugiere que la glucosa es la fuente de energía más importante para el cestodo.

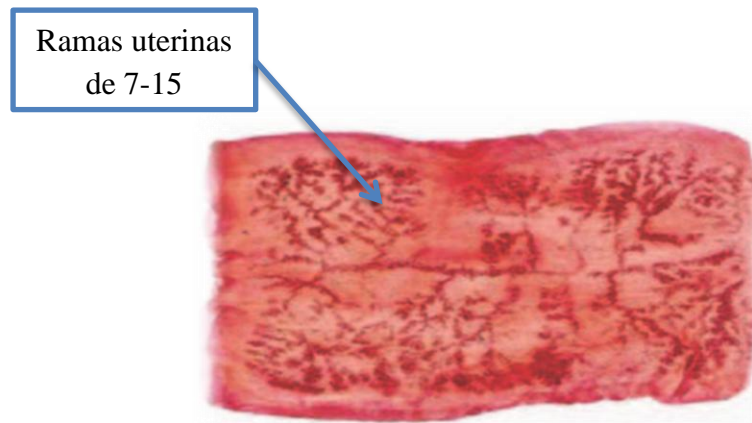
Los proglótidos inmaduros cercanos al cuello son de tamaño variable. Los proglótidos maduros, incluyendo los proglótidos grávidos, generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho. Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente, puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos. Los genitales masculinos se desarrollan primero y están constituidos por un gran número de testículos (275 a 575) que confluyen en un ducto genital que a su vez desemboca por un costado del proglótido en el atrio genital. Ver anexo 2.

Willms y col. (2003) describieron con detalle el proceso de espermatogénesis en *Taenia solium*. Tomando en cuenta que Justine (1998) habló del proceso que comprende meiosis y maduración de espermatozoides filiformes (no tienen cabeza), con un solo axonema, alrededor del cual se encuentra el núcleo enrollado en forma helicoidal, y una capa de microtubulos helicoidales externos.

Los genitales femeninos de la *Taenia solium* están constituidos por un ovario aparentemente trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el atrio genital. El útero en los proglótidos grávidos muestra de 7 a 15 ramas laterales repletas de huevecillos. Cada una

de las ramas puede presentar subramificaciones. El número de ramas uterinas permite diferenciar morfológicamente a *Taenia solium* y *Taenia saginata*.

Figura 3: *Taenia solium*, Proglótidos grávidos: Se aprecia el conducto uterino central del que se desprenden las ramas en un número de 7-15, las cuales hacen la diferencia



Fuente: encontrado en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/taeniosis.html>

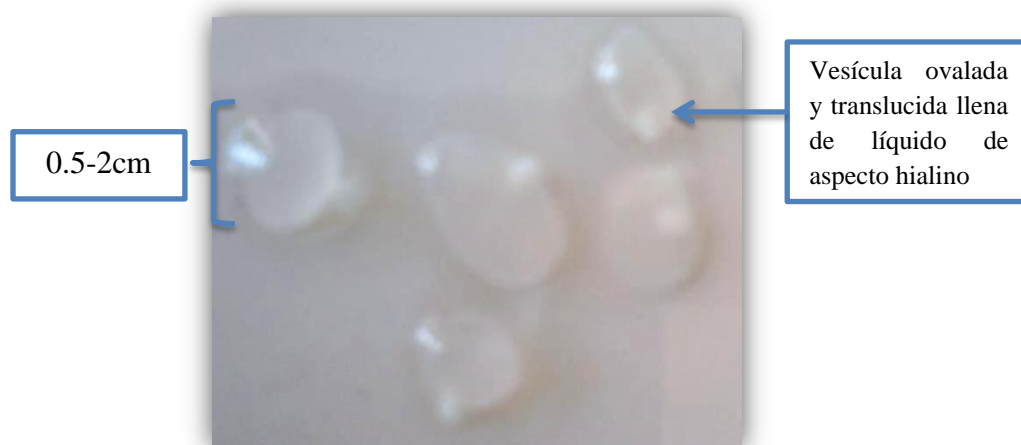
Los huevos contenidos en los proglótidos grávidos se encuentran en distintos grados de maduración; alrededor del 50% contienen oncosferas infectivas totalmente desarrolladas. Los huevecillos inmaduros pueden madurar fuera del huésped y permanecer viables e infectivos en aguas negras, ríos o pasturas por semanas. Los huevecillos de la *Taenia solium* son esféricos y miden 30-45 μm .

Laclette y col. (1982) pudieron identificar estructuras morfológicas varias envolturas que posibilitan la supervivencia de la oncosfera en el medio. La envoltura más externa es el vitelo o capsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio. La siguiente envoltura es el embrioforo, formado por pequeños bloques proteicos unidos

entre sí por un material cementante. Esta envoltura, además de ser la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevecillos su apariencia estriada característica. A su vez, el embrioforo es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrioforal. Finalmente, la membrana oncosferal rodea directamente al embrión hexacanto.

Los proglótidos grávidos de *Taenia solium* contienen miles de huevecillos, de manera que la ingestión de un proglótido o partes de este puede dar lugar a varios cientos de cisticercos en el huésped intermediario (Cerdo).

Figura 4: Larvas de *Cysticercus cellulosae*



El cisticercos de la *Taenia solium* está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (de 0.5 a 2 cm de diámetro), con un pequeño escólex invaginado (Slais, 1970). La superficie que presenta el cisticercos a su huésped humano o porcino es un tegumento citoplasmico, sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Puesto que los cestodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y

excretan sus desechos a través de la superficie tegumental. En congruencia con su función de absorción, la superficie externa del tegumento aparece aumentada por proyecciones digitiformes designadas como microtricas. Estas proyecciones son similares a las microvellosidades que constituyen los ribetes de cepillo en diversos epitelios de vertebrados e invertebrados. Ver Tabla 2 y 3.

2.1.1.3 Ciclo de la *Taenia solium*

Los huevos, con sus embrióforos, se diseminan en el medio ambiente cuando son liberados desde las heces de las personas infestadas, que contienen los proglótidos maduros terminales. La estructura de los mismos es tal que les permite sobrevivir, incluso en condiciones extremas como alta sequedad, ya que están dotados de una estructura cementante que los recubre por completo y preserva en su interior al embrión u oncosfera.

Al ser ingeridos por el huésped intermediario, el material cementante es digerido en las condiciones microambientales del tracto digestivo, y el embrión es liberado y se convierte en una oncosfera. Posteriormente, la oncosfera migra a través de la pared intestinal y alcanza la sangre, o la linfa, e invade la musculatura o el sistema nervioso central del hospedador intermedio y allí se establece y desarrolla hasta alcanzar la fase larvaria o intermedia denominada cisticerco.

Tabla 2: Cuadro Resumen de la descripción de la *Taenia solium* (Gusano adulto)

| | | |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| Cuerpo entero | <i>Longitud (m)</i> | 1.5 – 5 |
| | <i>Ancho máximo (mm)</i> | 7 – 10 |
| | <i>Proglótidos (número)</i> | 700 – 1000 |
| Escólex | <i>Diámetro (mm)</i> | 0.6 – 1.0 |
| | <i>Ventosas (número)</i> | 4 |
| | <i>Rostelo coronado</i> | 1 por dos hileras de ganchos |
| | <i>Ganchos rostelares (número)</i> | 22 – 32 |
| | <i>Ganchos rostelares (µm)</i> | 159 – 173 |
| Proglótidos maduros | <i>Largo (mm)</i> | 7-12 |
| | <i>Ancho (mm)</i> | 5-6 |
| | <i>Testículos (número)</i> | 275 – 575 |
| | <i>Ovario (número de lóbulos)</i> | 3 |
| | <i>Esfínter vaginal</i> | Ausente |
| Proglótidos grávidos | <i>Diámetro (cm)</i> | 0.3 – 2.2 |
| | <i>Útero (número de ramas de cada lado)</i> | 7 – 15 |
| | <i>Protuberancia posterior</i> | Ausente |
| | <i>Modo en que son excretados</i> | En grupos, pasivamente en las heces |
| | <i>Longitud (mm)</i> | 7 – 12 |
| | <i>Ancho (mm)</i> | 5 – 6 |

Fuente: Modificado de <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/ficha-taxonmica.php?id=88>

Tabla 3: Cuadro resumen de la descripción del huevo de *Taenia spp.*

| | | |
|--------------|--------------------------|--|
| Huevo | <i>Diámetro (cm)</i> | <i>16 – 45</i> |
| | <i>Huevos producidos</i> | <i>50000 – 60000</i> |
| | <i>Tamaño (µm)</i> | <i>30 – 45</i> |
| | <i>Membranas</i> | <i>Oncosferal (interna) y vitelo (formada por bloques unidos con proteínas cementantes que le dan aspecto radiado.</i> |
| | <i>Vitelo</i> | <i>Huevo inmaduro que permite la obtención de nutrientes.</i> |

Fuente: Modificado de <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/ficha-taxonomica.php?id=88&nivel=Phylum&nombre=Platyhelminthes>

Esta forma larvaria es una vesícula que alcanza un tamaño de hasta 5 cm y en su interior aloja al escólex invaginado, que contiene la porción cefálica armada necesaria para que la tenia se fije en el intestino del hospedador de la forma adulta, o definitivo.

Cuando los cisticercos son ingeridos por el hombre, con la carne de cerdo cruda o mal cocida infestada por ellos, el escólex evagina y se fija al intestino mediante el soporte que le brinda su doble corona de ganchos y las cuatro ventosas que lo forman. Aproximadamente tres meses después de la fijación al intestino, el parásito adulto, la llamada *lombriz solitaria*, se desarrolla y alcanza su madurez.

La solitaria es un gusano que tiene la forma de un largo tallarín dividido en múltiples segmentos, los que, una vez fértiles, son arrojados en la materia fecal de los individuos

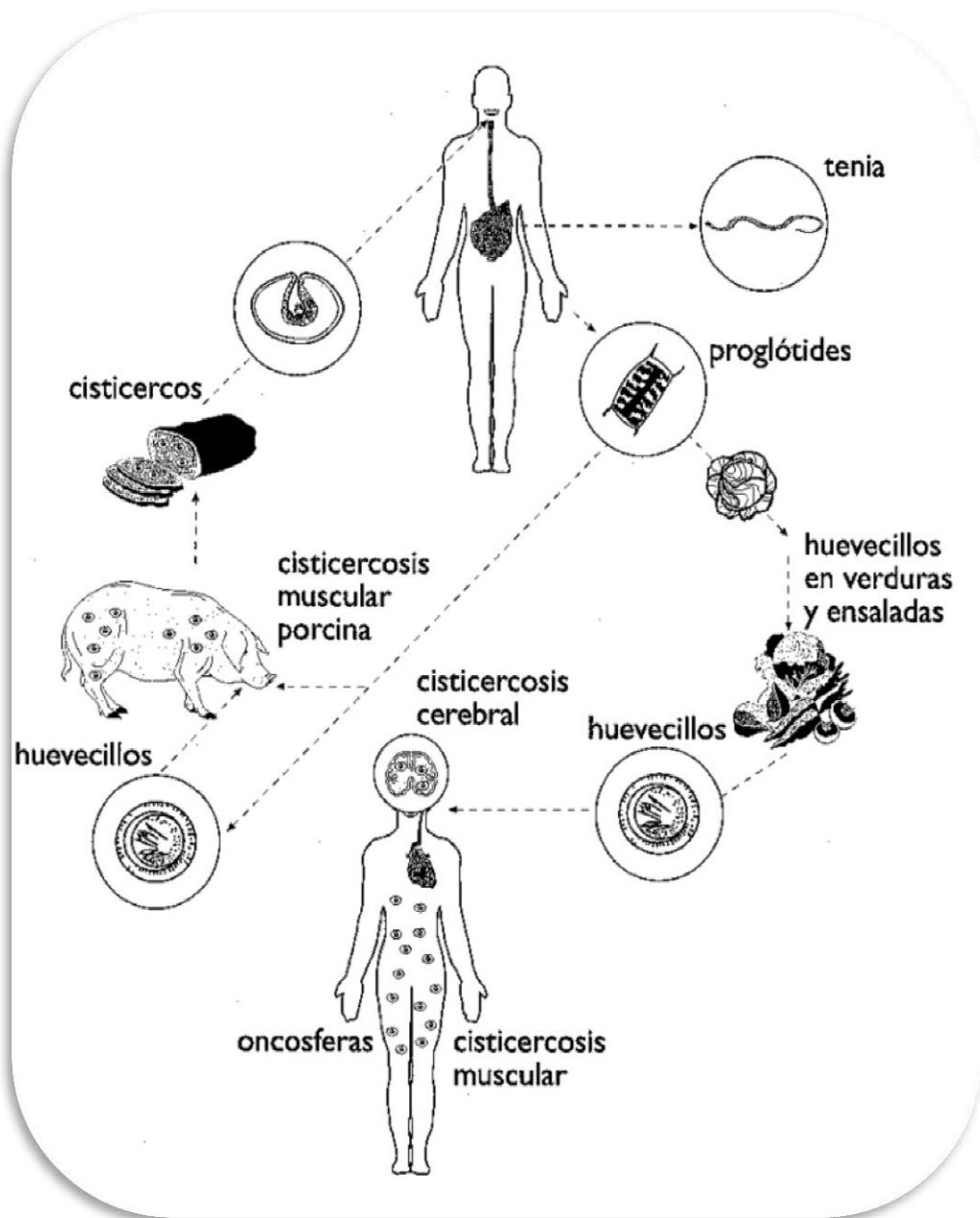
infestados y con ello se completa el ciclo de vida del parásito (Honor y col.; 2000). Ver Figura 5.

El hombre puede también convertirse en huésped intermediario de la *Taenia solium* al ingerir sus huevecillos; bajo estas circunstancias, se desarrolla la cisticercosis humana.

El mecanismo por el cual los huevecillos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre, las formas principales de contagio humano incluyen en la ingestión de comida contaminada con huevecillos de *Taenia solium* y contaminación ano-mano-boca en individuos portadores de la *Taenia solium* en su intestino, los que pueden auto-infectarse o infectar a otras personas, sobre todo en sus contactos domésticos.

La transmisión aérea de huevecillos de la *Taenia solium* y la regurgitación de proglótidos desde intestino delgado hacia el estómago (auto-infestación interna) no han sido adecuadamente demostrados como fuentes importantes de adquisición de la enfermedad. Como ejemplos anecdóticos de contagio, se encuentran la transmisión transplacentaria de cisticercos en la ingestión voluntaria de proglótidos de *Taenia solium* con propósitos medicinales.

Figura 5: Ciclo de vida de la *Tenia Solium*

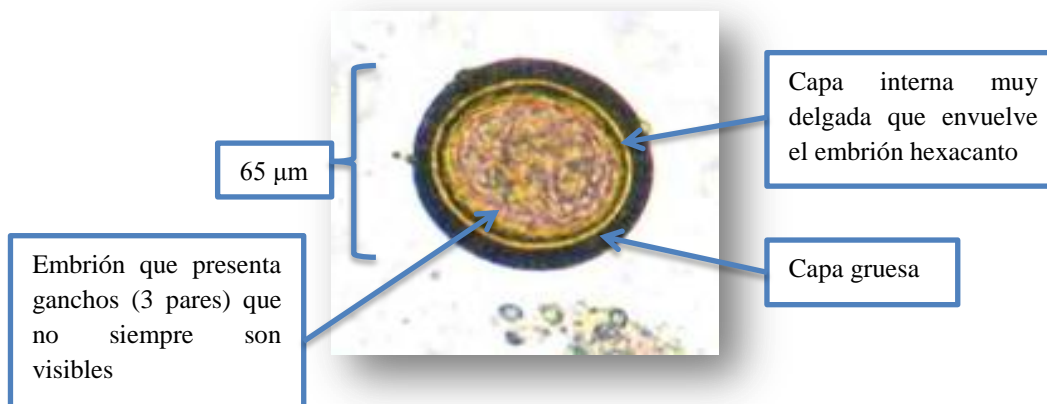


Fuente: <https://alimentacionbajolalupa.wordpress.com/tag/mesoamerica/page/2/>

2.1.2 Cisticercosis humana

La Cisticercosis es una parasitosis originadas por la presencia en huéspedes intermediarios de la fase larvaria de algunas tenías. Se presenta en general como formas vesiculosas monoquísticas, monocefálicas y monosomáticas que originan un embrión exacanto, formado por un único escólex invaginado, rodeado de un líquido débilmente albuminoso. Cuando están totalmente desarrollados aparecen como vesículas ovoides de distinto color y tamaño (Honor y col., 2010). Fue considerada en el pasado menos frecuente que la teniasis, probablemente porque los cisticercos en los músculos por lo general no dejan secuelas importantes (Saavedra y col., 2010). Ver Figura 6.

Figura 6: Huevo fértil con embrión hexacanto de Taenia spp observado a 40 x



Además en el ser humano, los cisticercos se localizan con mayor frecuencia en los músculos esqueléticos, sistema nervioso, ojos, tejido graso subcutáneo y corazón. Cuando el cisticercos se localiza fuera del SNC como músculos y piel, suele ser asintomático, mientras que cuando se aloja en el SNC, llamada Neurocisticercosis, las

manifestaciones clínicas dependerán del número de parásitos y de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped (Larralde de Aluja, 2006).

La Cisticercosis se encuentra en todo el mundo, especialmente en lugares donde la Tenía porcina es común. Tanto la tenía porcina como la cisticercosis se presenta más frecuentemente en zonas rurales de países en desarrollo con malas condiciones higiénicas, donde los cerdos andan sueltos y entran en contacto con heces humanas (Flisser y col., 2007).

La tenía causa la Cisticercosis es endémica en muchas partes del mundo, incluyendo China, el sudeste de Asia, India, África subsahariana y América Latina. La frecuencia ha disminuido en los países desarrollados debido a la estricta inspección de la carne, una mejor higiene y mejores instalaciones sanitarias. La distribución de la *Cisticercosis* coincide con la distribución de *Taenia solium*. La cisticercosis es la causa más común de la epilepsia sintomática en todo el mundo (Saavedra y col., 2010).

En los EE.UU. durante el período 1990-2002, se identificaron 221 muertes cisticercosis. Las tasas de mortalidad fueron más altas para los latinos y los hombres. La edad media de muerte fue de 40,5 años. La mayoría de los pacientes, el 84,6%, eran nacidos en el extranjero, y el 62% habían emigrado de México. Las 33 personas nacidas en que murieron de la Cisticercosis representaron 15% de todas las muertes relacionadas con Cisticercosis. La tasa de mortalidad cisticercosis fue mayor en California, que representaron el 60% de todas las muertes (Cupuñay y col., 2002). Ver Anexo 5.

El nivel socioeconómico se encuentra fuertemente asociado con la presencia del binomio Teniosis/Cisticercosis y otras parasitosis; el bajo nivel socioeconómico provoca situaciones como fecalismo al ras del suelo, costumbre bastante difundida, que provoca la contaminación de alimentos, agua y aire con excremento. Otra situación es el hacinamiento; en este caso, el mayor riesgo se encuentra cuando se convive con una persona que tenga la enfermedad ya que aumenta la posibilidad de adquirir cisticercosis (Capuñay y col., 2002).

Bolivia no es la excepción donde la mayoría de estas enfermedades no pueden diagnosticarse fácilmente, sino también exigen estudios de tomografía computarizada, resonancia magnética y laboratorio para determinar si el paciente está infectado o no por un parásito y en caso afirmativo, la especie a la que pertenece este parásito.

En Bolivia las enfermedades parasitarias causan elevada morbilidad y numerosas defunciones y a menudo cursan con síntomas y signos inespecíficos. La cisticercosis depende del fecalismo humano y es un índice revelador de las malas condiciones de saneamiento básico y de educación de la población, teniendo mayor impacto en zonas rurales deprimidas. Bolivia, junto a Perú y a México, son los países de mayor prevalencia de esta parasitosis, la prevalencia de teniasis en nuestro país es de hasta 8,7% en el altiplano, de 1,6% a 4,3% en los valles y hasta 4,3% en el trópico (Bautista, 2000). La prevalencia de la cisticercosis en Bolivia según los reportes del Ministerio de Salud a Nivel Nacional confirmados hasta abril de 2014.

Tabla 4: Datos epidemiológicos nacionales de Cisticercosis y Tenias positivos durante los últimos 6 años

| | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Cisticercosis</i> | 7,40% | 2,57% | 4,19% | 1,64% | 3,95% | 6,45% |
| <i>Teniasis</i> | 0 | 0,45% | 0,46% | 0,18% | 0,31% | 0,32% |

Fuente: Modificado de Ministerio de Salud y Previsión social, Dirección general de Epidemiología y Zoonosis, Estado Plurinacional de Bolivia, La Paz 2015.

Estos porcentajes se deben a la recolección de datos confirmados positivamente, reportados por todos los laboratorios a cargo del mismo Ministerio de Salud. Podemos observar que hasta el 2014 se tiene un porcentaje de 6,45% de datos confirmados para Cisticercosis datos de los cuales se observa el aumento progresivo de positividad de dicha enfermedad.

2.1.3 Neurocisticercosis

La forma larval de la *Taenia solium* se denomina *Cysticercus cellulosae* (Cisticercos del cerdo), el nombre obedece a la localización de las vesículas en el tejido conjuntivo existente entre las fibras musculares y tiene la forma de una vesícula o quiste. En el cerebro el *Cysticercus cellulosae* puede presentarse adoptando formas diferentes: En la forma quística y la forma racimosa (*Cysticercus racemosus*), generalmente el CFDisticercos en el cerebro humano tiene aproximadamente el doble de tamaño del quiste del cerdo (Lapage, 2009).

La Neurocisticercosis es una enfermedad del SNC de origen parasitario que genera una alta morbilidad. Ocasiona sobre todo epilepsia crónica, es causada por el cisticerco del cerdo, puede ser asintomática y tiene buen pronóstico si es tratada a tiempo (Malagon, 2009).

En el SNC los parásitos se pueden alojar en el espacio subaracnoideo, en los ventrículos cerebrales y en el parénquima del encéfalo y médula espinal, puede provocar cuadros epilépticos. Esta variada distribución también es un factor que participa en determinar la forma y dimensión de los parásitos: los ventriculares y los subaracnoideos tienden a ser más grandes y frecuentemente multilobulados, mientras que los de la forma parenquimatosa por lo general son vesículas únicas, ovoides o esféricas, más o menos homogéneas, de 0.5 a 1 cm de diámetro (Durán, 2004).

2.1.3.1 Infección en el cerdo

Se produce una infección masiva cuando los animales tienen la oportunidad de osar en montones de estiércol, letrinas y con ello la posibilidad de ingerir muchos proglótides eliminados por portadores de la Taenia. La cría domiciliaria en el traspatio y el acceso habitual que tienen los cerdos a la materia fecal humana favorecen la transmisión del parásito. En algunas regiones del país existen en su gran mayoría la cría trashumante de cerdos, situación que permite la compra venta de cerdos por los pueblos que pasa o por otra parte de manera dirigida la llegada al poblado después de los días de fiesta en donde hay abundante basura y materia fecal en las calles y terrenos baldíos en donde el

fecalismo es la única alternativa y los cerdos la utilizan como fuente de alimento; por otra parte la cría de cerdos en basureros municipales favorece la ingestión de materia fecal humana y la infección con cisticerco (Borchert, 2005; Quiroz, 2009).

2.1.3.2 Infección en el hombre

La forma más frecuente de infección es la heteroinfección lo cual sucede cuando la persona ingiere los huevos procedentes de otro individuo parasitario; ocasionalmente ocurre la auto infección, esta puede ser externa cuando se contamina las manos o alimentos con los huevos que el mismo paciente a eliminado y también interna cuando se regurgitan proglótidos del estómago y sufre la liberación de huevos (Botero, 2002).

Se debe tomar en cuenta el peligro que presenta un manipulador de alimentos que padezca la *Taenia solium* al descuidar la higiene de sus manos, el riesgo que corre el personal médico y paramédico que atiende pacientes infectados con teniasis al proceder con imprudencia en el manejo de las deposiciones y proglótidos de estos casos (Atias, 2001).

2.1.3.3 Sintomatología

Sintomatología del hombre

Los síntomas son muy variables; este puede ser de algunos meses o de varios años. En los países latinoamericanos la ubicación principal de los cisticercos es el sistema nervioso. La expresión clínica de la cisticercosis es polimórfica; la enfermedad puede

ser desde asintomático hasta incapacitante y en ocasiones mortal. El cuadro clínico de la Neurocisticercosis depende si la cisticercosis es subcutánea, muscular y ocular. Cuando afecta el sistema nervioso las manifestaciones dependen del número, localización y estado evolutivo del parásito; los más comunes son epilepsia de inicio tardío y cefálica. Su localización más común es la sub aranoidea, seguida de la parenquimatosi. Actualmente el diagnóstico se debe apoyar con estudios de imágenes: la tomografía computarizada. En la teniasis pueden observarse síntomas gastrointestinales leves, como náuseas, dolor abdominal o diarreas, muchos casos cursan sin síntomas y algunos expulsan segmentos de tenías en las evacuaciones (www.tupediatra.com, 2012).

Sintomatología del Cerdo

Las infecciones del cerdo son normalmente asintomáticas. Durante la fase de invasión que incluye por el paso del intestino puede observarse signos de enteritis, diarrea ligera, cólico, dolor de la pared abdominal, pero ninguno de estos signos pueden en sí evidenciar la presencia de cisticercosis (Quiroz, 2009; Soulsby, 2008). Solamente algunas veces se aprecia cuando la infestación es masiva en las masas musculares el cerdo presenta una respiración dificultosa y acelerada, rigidez en las extremidades, sensibilidad del hocico y de la lengua, con la cual se dificulta la ingestión del alimento, luego aparece edema, debilidad muscular general y progresivo adelgazamiento. Los cisticercos localizados en el cerebro producen síntomas igual que en el hombre, pero el cerdo no vive el tiempo suficiente como para permitir que estos síntomas se precien claramente (Soulsby 2008; Levine, 2003).

2.1.3.4 Métodos de laboratorio para el diagnóstico

Muchas técnicas de laboratorio que son habituales en el laboratorio clínico y en la investigación están basadas en el empleo de anticuerpos. La exquisita especificidad de los anticuerpos por algún antígeno concreto los convierte en un valioso instrumento médico y así proceder a su detección, y al bioquímico la purificación y cuantificación. La Neurocisticercosis es difícil de diagnosticar clínicamente debido a la heterogeneidad de las manifestaciones neurológicas que puede desencadenar. Se diagnostica por medio de Estudios de imagen: Tomografía axial computarizada (TAC), Diagnóstico radiológico, Resonancias magnética (RM) las cuales tienen una elevada confiabilidad, estos permiten confirmar la etiología y definir el número, localización, estado y extensión de las lesiones. Otras opciones de diagnóstico son los exámenes de laboratorio: Biometría Hemática, examen coproparasitológico seriado. Inmunodiagnóstico: ELISA, IFI, Western blot, estos son los más confiables por tener una especificidad del 100%.

2.1.3.4.1 Métodos de cuantificación por inmunoanálisis

Los métodos inmunológicos empleados para cuantificar la concentración de los antígenos ofrecen una sensibilidad y una especificidad exquisita, y se han convertido en unas técnicas corrientes dentro de sus aplicaciones clínicas y de investigación. Todos los modernos métodos inmunohistoquímicos de cuantificación están basados en la obtención de un antígeno puro cuya cantidad pueda medirse a través de la molécula indicadora. Si la molécula indicadora está vinculado a una enzima por un enlace

covalente, puede cuantificarse con un espectrofotómetro mediante la determinación de la velocidad con la que esta enzima transforma una sustancia transparente en un producto coloreado; esta valoración recibe el nombre de ELISA.

ELISA viene de las siglas en inglés de Enzyme-linked Immunosorbent Assay (análisis por inmunoadsorción con enzimas ligados o Ensayo Inmuno Enzimático). Técnica inmunológica de gran sensibilidad y especificidad que detecta antígenos y/o anticuerpos, se basa en la gran capacidad de reacción del complejo enzima-antígeno que se une específicamente con un anticuerpo para formar un compuesto coloreado.

La prueba ELISA es un método de laboratorio calificado de inmunoenzimático. Se trata de una prueba inmunológica, porque tiene como principal objetivo poner en evidencia la presencia de anticuerpos o de antígenos específicos de una enfermedad en una muestra de sangre. Este examen utiliza una proteína del tipo enzima, que se fijará a ciertos componentes específicos de la enfermedad; por la identificación y la cuantificación de esta enzima se puede confirmar la enfermedad y evaluar su intensidad.

2.1.3.4.2 Tipos de ELISA

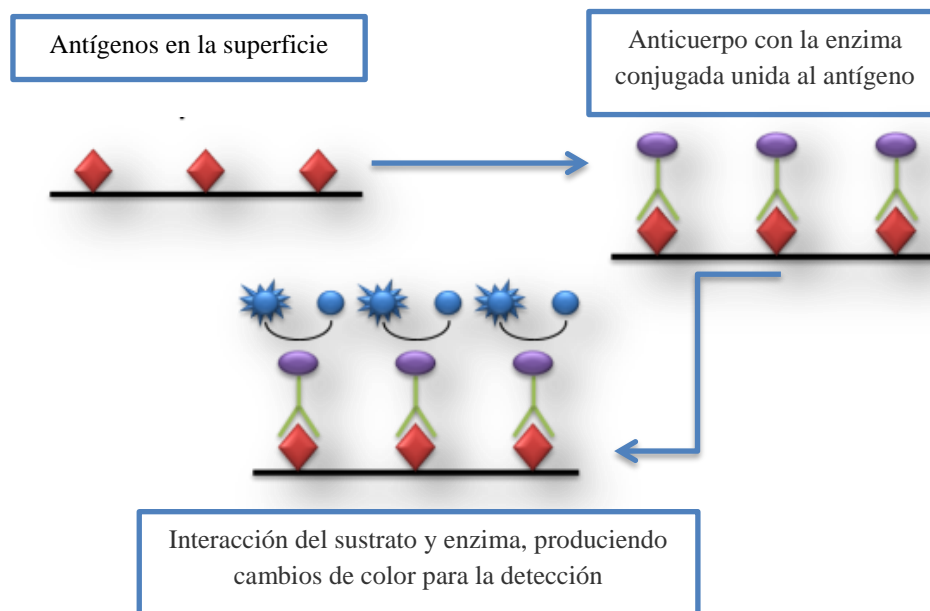
La prueba ELISA es un método de laboratorio calificado de inmunoenzimático. Se trata de una prueba inmunológica, porque tiene como principal objetivo poner en evidencia la presencia de anticuerpos o de antígenos específicos de una enfermedad en una muestra de sangre. Este examen utiliza una proteína llamada enzima, que se fijará a

ciertos componentes específicos de la enfermedad; por la identificación y la cuantificación de esta enzima se puede confirmar la enfermedad y evaluar su intensidad. Técnica inmunológica de gran sensibilidad y especificidad que se utiliza para detectar antígenos y anticuerpos. Se basa en la gran capacidad de reacción del complejo enzima-antígeno que se une específicamente con un anticuerpo para formar un compuesto coloreado.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

ELISA Directo

Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo que las analizadas (sangre, orina), pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado). Ver Figura 7.

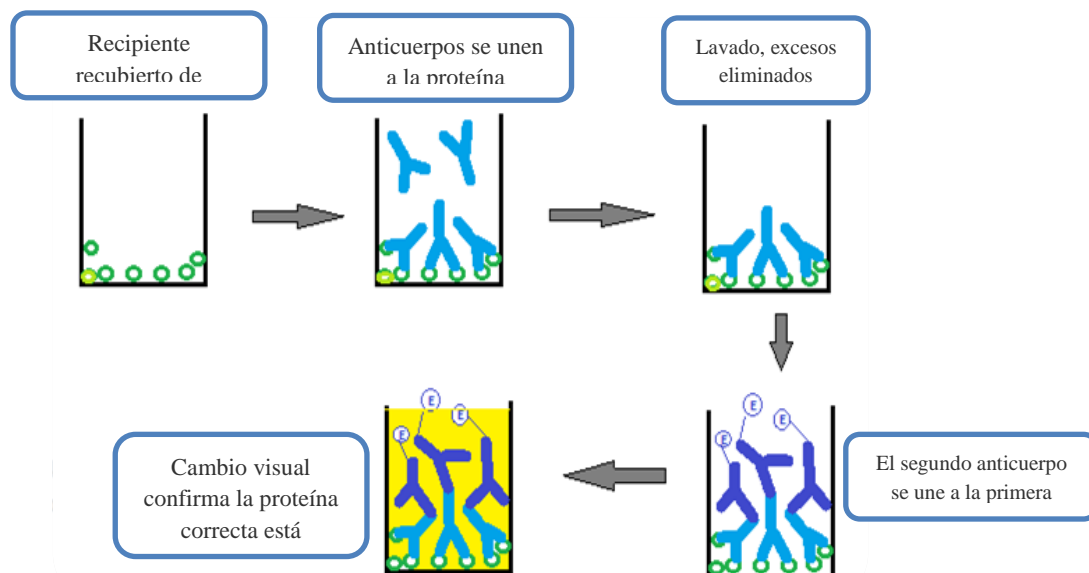
Figura 7: ELISA Directo

Fuente: Modificado de <https://mariecuriesnews.wordpress.com/tag/inmunoensayo/>

ELISA indirecto

Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.

Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos; por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo.

Figura 8: ELISA indirecto

Fuente: Modificado de <https://mariecuriesnews.wordpress.com/tag/inmunoensayo/>

La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario; por ejemplo, suero sanguíneo; es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida, no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. (Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable)

Ver Figura 8.

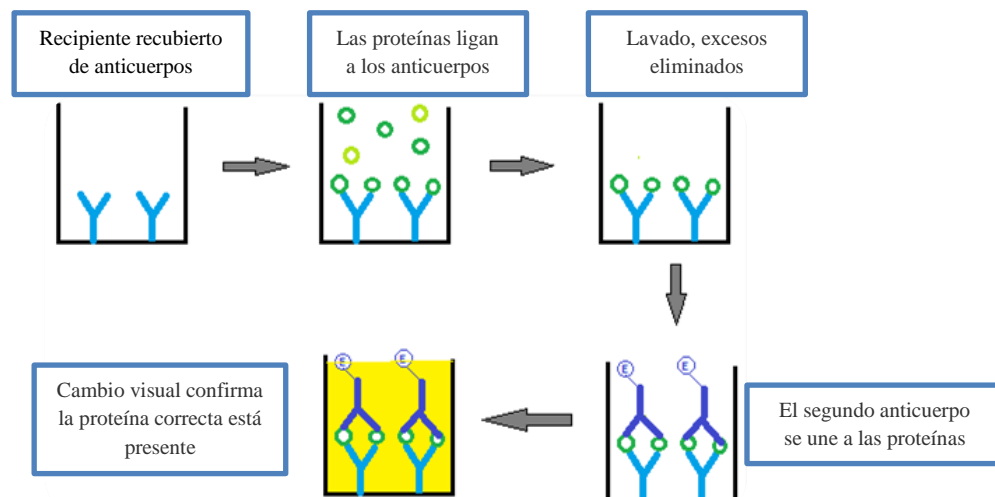
ELISA sándwich

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se aplica la muestra

problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así, pues, cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Ver Figura 9.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo.

Figura 9: ELISA Sándwich



Fuente: Modificado de <https://mariecuriesnews.wordpress.com/tag/inmunoensayo/>

2.1.3.5 Inmunodiagnostico

La función fundamental del sistema inmunológico es detectar, inactivar y destruir moléculas potencialmente patógenas propias o ajenas. Así, cuando entra un patógeno a un organismo inmunológicamente competente se inicia una respuesta inmunológica específica que en la mayoría de las ocasiones culmina con su destrucción.

La especificidad de esta respuesta inmunológica subyace en la proliferación clonal selectiva linfocitaria y su posterior diferenciación a células efectoras tipo TH1 o TH2, con la subsiguiente producción de citocinas (IL2, IL12 e IFN γ , en el caso de células TH1, o IL4, IL5, IL6, e IL13, en el caso de las TH2), y a células plasmáticas con la consecuente producción de inmunoglobulinas específicas.

Las propiedades de los antígenos tienen una participación crítica en el desencadenamiento y el tipo de respuesta inmunológica específica inducida. En la fase larvaria, el cisticerco expresa un conjunto complejo de antígenos de origen proteico (Plancarte y col., 1994), glicoproteico (Prabhakaran y col., 2004) y lipídico (López-Marín y col., 2002). Esta heterogeneidad antigénica, si bien no se ha caracterizado sistemáticamente, ha sido parcialmente descrita utilizando diferentes metodologías entre las que destaca la inmunoelectrotransferencia (Ramos-Kuri y col., 1992). Antígenos parasitarios totales o fraccionados, así como algunos antígenos aislados o expresados en forma recombinante o sintética, han sido estudiados para determinar sus propiedades antigénicas, pero se han explorado mucho menos sus propiedades inmunogénicas, y más

aún falta por conocer sobre sus propiedades y funciones en la vida del propio parásito.

Se ha reportado que existen algunos componentes antigénicos que son los más frecuentemente reconocidos por el suero de humanos Cisticercosis (Handali y col., 2004); otros son principalmente secretados como el antígeno HP10 (Fleury y col., 2003); mientras que algunos son compartidos por las diferentes fases del parásito (Toledo y col., 1999), otros son específicos de cada fase (García-Allan y col., 1996).

Respecto a la respuesta inmunológica del humano asociada a las diferentes formas de la enfermedad, la gran diversidad de formas clínicas de la Neurocisticercosis dificulta las declaraciones sencillas.

La Neurocisticercosis asintomática calcificada se distingue de las personas expuestas al presentar una respuesta proliferativa específica con producción de citocinas predominantemente de tipo TH2 (IL4, IL5, IL13 e IL12) y niveles incrementados de IgG4 específica (Chavarría y col., 2003; Chavarría y col., 2005). En contraste, la Neurocisticercosis sintomática, con múltiples cisticercos vesiculares o en estadios mixtos, presenta bajos niveles de proliferación linfocitaria específica sin producción de citocinas. Cabe destacar que esta depresión de la respuesta celular no se debe al efecto de drogas cestocidas ni de inmunosupresores, ya que los pacientes no estaban bajo tratamiento en el momento en que se realizaron los estudios mencionados (Chavarría y col., 2005). Es factible que esta inmunodepresión específica participe controlando la extensión del fenómeno inflamatorio en el SNC previniendo así la entrada de linfocitos

periféricos activados al SNC.

Con respecto a la respuesta inmunológica local, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de estos pacientes se detectan niveles incrementados de IL5 e IL6, ambas citocinas que participan en fenómenos inflamatorios en el SNC; adicionalmente, presentan niveles elevados de IL10, una citocina inmunosupresora que probablemente participe en la regulación del fenómeno inflamatorio en este compartimiento (Chavarría y col., 2005).

En contraste con la deprimida respuesta inmunológica celular periférica, destaca la presencia de elevados niveles de anticuerpos de las diferentes subclases de inmunoglobulinas, lo que señala las diferencias en la modulación de la respuesta inmunológica celular y humoral asociada a esta parasitosis. En la Neurocisticercosis sintomática se presentan aumentadas las cuatro subclases de IgG, mientras que en la Neurocisticercosis asintomática se detectan niveles muy inferiores de las diferentes subclases de IgG. Estas diferencias en las cantidades de anticuerpos detectadas pudieran reflejar la presencia de parásitos vesiculares en la cisticercosis sintomática que activamente estimulan el sistema inmunológico con la producción de antígenos secretores y la liberación de antígenos de superficie como consecuencia de su propio metabolismo. En contraste, la presencia de lesiones calcificadas, situadas ya sea en el parénquima o en los surcos entre circunvoluciones, probablemente resueltas desde meses o años, se asocian a niveles de anticuerpos que progresivamente disminuyen en ausencia de estímulos antigénicos.

Mientras que las observaciones mencionadas representan estudios descriptivos de los principales elementos de la respuesta inmunológica que se han encontrado asociados a la presencia del parásito, su relevancia en la capacidad de dañarlo ha sido poco explorada. Entre los principales hallazgos respecto a los mecanismos efectores de daño, se ha demostrado que los anticuerpos son capaces de destruir a las oncosferas de *Taenia solium* a través de la fijación de complemento (Molinari y col., 1993), lo cual señala la vulnerabilidad del parásito en las fases tempranas de su desarrollo. Se ha identificado que anticuerpos dirigidos contra ciertos epítopes del parásito, en particular contra la secuencia que codifica para el péptido protector denominado GK1, que constituye uno de los componentes de la vacuna S3Pvac contra la cisticercosis, induce la producción de anticuerpos que afectan la viabilidad de los cisticercos para convertirse en tenia. En efecto, cuando los anticuerpos anti-GK1 se incuban con cisticercos, éstos pierden la capacidad experimental de transformarse en *Taenia* en el modelo de teniasis de hámster dorado (García y col., 2001).

Existen además algunas evidencias que sugieren posibles estrategias de adaptación del parásito en un hospedero inmunocompetente. Entre ellas cabe mencionar la secreción del antígeno B, capaz de fijar el complemento en complejos solubles, una propiedad que podría prevenir el daño del parásito por fijación de complemento sobre su superficie (Laclette y col., 1989); la presencia de una gran cantidad de inmunoglobulinas en la superficie del parásito podrían enmascarar su presencia ante el sistema inmunológico (Flisser y col., 1986).

A pesar del esfuerzo de numerosos grupos de investigadores desde hace más de 50 años, todavía no se ha podido disponer de una prueba inmunodiagnóstico que sea sensible, específica y reproducible en un porcentaje cercano al 100%. Desde 1948, diferentes técnicas inmunológicas han sido utilizadas. La primera fue la reacción de fijación de complemento adaptada por Nieto para medir anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo. Surgieron pruebas como la inmunolectroforesis, la hemaglutinación pasiva, la inmunofluorescencia y la doble inmunodifusión.

Debido a este panorama, la principal utilidad del inmunodiagnóstico está en la evaluación de la exposición al parásito de una población. Para el diagnóstico de caso médico de Neurocisticercosis, su utilización es limitada; aunque una prueba positiva en líquido cefalorraquídeo, en un individuo proveniente de una zona endémica, junto a cuadros clínicos y radiológicos sugestivos, sí fortalece el diagnóstico de neurocisticercosis.

2.1.3.6 Tratamiento de la Neurocisticercosis

Según las investigaciones de García y col. (2002); Riley y White (2003) indicaron que la Neurocisticercosis se caracteriza por su gran heterogeneidad, su tratamiento debe ser individualizado tomando en cuenta la viabilidad, el número, la localización y el tamaño de los parásitos, la intensidad de la reacción inflamatoria asociada y el estado clínico del paciente. El tratamiento puede ser específico con antiparasitarios, sintomático o quirúrgico.

2.1.3.6.1 Tratamiento en el humano

Tratamiento para la Teniasis en el humano

- **Praziquantel:** Es una droga de elección ya que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos principalmente del calcio (www.geocites.com.2012).
- **Albendazol:** Es otra droga de elección sobre todo en menores de 5 años de edad. Es bien tolerada y produce efectos secundarios mínimos. La ventaja de este medicamento es que no solo actúa contra la *Taenia* spp, sino también contra la mayor parte de otros helmintos y nematodos frecuentes (www.geocites.com.2012).

Figura 10: Tratamiento específico para la Cisticercosis, Albendazol y Praziquantel.



Fuente: Encontrado en <http://aragec.com/albendazol.html>; <http://www.alexcofarma.net/En/Products.aspx?type=92>

Tratamiento de la cisticercosis para el humano

Hasta hace pocos años el tratamiento de la neurocisticercosis se circunscribía al control sintomático, tanto con medicamentos como por medio de una cirugía para resolver principalmente la hipertensión. Con el desarrollo de drogas cestodicas se abrió la posibilidad de curar la enfermedad en forma no invasiva. En la actualidad, se cuenta con dos medicamentos de administración oral disponibles en el mercado: el praziquantel y el albendazol. A partir de los primeros informes de pacientes tratados con estas drogas se ha venido obteniendo experiencias principalmente en el tratamiento de cisticercosis parenquimatosa, seguida de la subaracnoidea. Su utilidad en otras variantes con las intraventriculares no ha sido establecida por la intensa reacción inflamatoria que ocurre durante la destrucción del parásito. Se han sugerido diferentes esquemas de dosificación con la utilización concomitante o no de esteroides (www.insp.mx 2012).

2.1.3.6.2 Tratamiento de la cisticercosis en el cerdo

El tratamiento contra la cisticercosis en cerdos generalmente no se lo realiza por su elevado costo. Puede realizarse con drogas como el praziquantel. Estudios recientes han mostrado que con sólo un día de tratamiento es factible curar esta enfermedad siempre y cuando se permita que la reacción inflamatoria destruya al parásito, lo que sucede en dos meses aproximadamente. El praziquantel a demostrado ser más efectivo contra la cisticercosis porcina en dosis única de 50 mg/kg en tratamiento por un día (García y Lobo, 1989; www.insp. mx 2012).

3 HIPÓTESIS

Es posible obtener de un extracto antigénico soluble total de las larvas de *Cysticercus cellulosae* de una cepa nativa que permita optimizar un Ensayo Inmuno Enzimático (ELISA) para efectuar el diagnóstico indirecto de Cisticercosis humana, para la aplicación en un laboratorio de diagnóstico rutinario.

4 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de investigación

El estudio aporta desarrollo tecnológico, sobre la elaboración de un antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* de manera casera. Esta información será de gran ayuda para su uso en la técnica de ELISA para el diagnóstico indirecto.

4.2 Obtención de la muestra biológica

La carne de cerdo contaminada naturalmente con *Cysticercus cellulosae* fue recolectada en dos ocasiones, en mayo 2013 y junio 2014 con la que se pudo trabajar y realizar el presente trabajo. Estas carnes fueron obtenidas en el municipio de Batallas, localidad Copacabana, provincia Los Andes, ubicada a 50 Km de la ciudad de La Paz (aproximadamente a una hora y media; Ver Anexo 2).

4.3 Métodos

4.3.1 Equipos

- Desmembrador sónico (Branson modelo 3200)
- Lector de placas de ELISA (BioTek modelo ELx800)
- Liofilizador (Fin Agua Lyovac modelo GT2)
- Espectrofotómetro (Jasco modelo V-630)
- Incubadora de laboratorio (IN, In plus +5°C a +80°C)
- Centrifugadora de alta velocidad (Numak modelo 18C)
- Refrigerador (Nuair - 86° C Ultra low Freezer)
- Termómetro de Mercurio, para uso en laboratorio, inversión total de -20°C a 110°C
- Cámara húmeda casera
- Balanza electrónica de precisión (Kern PLS de 4500 g – 0.01 g)
- Cronómetro Digital (Hanhart labor 2" 99h, 59m, 59 seg)
- Estufa 502 (Fanem, sao paulo – Brasil)
- PH metro 700 (Oakton)

4.3.2 Materiales

- Tubos de ensayo (Kimble, tubos de vidrio de borosilicado, 12 x 75 mm)
- Pipetas Pasteur (Chase Instruments, Flint Glass, Length 5 ¾ ")
- Viales (con sus tapas de 3mL)
- Gradillas para tubos (Kertell para 40 tubos)

- Pipetas (Greiner bio-one de 1mL, 2mL,5mL y 10mL)
- Micropipeta (Research Plus de 10-100 ul y 20-200 ul)
- Micropipeta multicanal de ocho entradas (Brand, Tranferpette -8, 20-200 ul)
- Puntas de Pipetas (Plastibran, Tip-Rack, 10-100 ul; 20-200 ul)
- Vasos de precipitados (Germany, de 20-100 mL)
- Cajas Petri de vidrio (medianas y grandes)
- Matraz aforado (Hirschman, W. Germany de 50 mL y 100 mL)
- Papel filtro (Watt man 0.1 mm)
- Pinzas y bisturí anatómicas
- Microplacas o Policubetas sin sensibilizar (Dynatech Inmulon, de 96 pocillos)
- Probeta (100mL)
- Guantes de látex (Mediglove talla S)
- Barbijos descartables (Premier)

4.3.3 Reactivos

- PBS (Buffer fosfato salino) pH 7.5 1M Tween
- Buffer carbonatos (Tampón carbonato/bicarbonato) pH 9.6 0.1M
- Agua destilada (H₂O₂)
- Conjugado: antiinmunoglobulina humana marcada con peroxidasa obtenida en cabra (Marca Dako)
- Sustrato: Peróxido de hidrogeno 60 mmol/L en Buffer Citrato 50mmol/L pH 3,2
- Cromógeno: Tetrametilbencidina (TMB) 0,01 mol/L en ácido clorhídrico 0,1 N
- Solución de Stop o Stopper: Ácido sulfúrico 2 N

- Buffer de lavado concentrado (cloruro de sodio 1,4 mol/L en buffer fosfato 100 mmol/L)
- 5 Sueros positivos (+) y 35 Sueros Negativos (-) para serología de cisticercosis procedentes de la seroteca del Laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS.

4.3.4 Procedimiento

4.3.4.1 Obtención de la muestra biológica infectada naturalmente con *Cysticercus cellulosae*

- ✓ Se recolectó la carne de cerdo infectada naturalmente, e inmediatamente se fraccionó la muestra biológica obtenida, se la llevó a 4°C, para poder conservarla y evitar la contaminación, y así poder obtener mayor cantidad de ejemplares de *Cysticercus cellulosae*.

- ✓ Se tomó una fracción de muestra biológica infectada naturalmente y se procedió a la obtención de las larvas de *Cysticercus cellulosae*, sacándolas con mucho cuidado evitando que estas revienten, con la ayuda de un bisturí y una pinza anatómica, y colocándolas en una caja Petri de vidrio que contenía solución de PBS a pH 7.5, se repitió este procedimiento hasta obtener unas 250 larvas (Orrega y col., 2014) para poder realizar el trabajo.

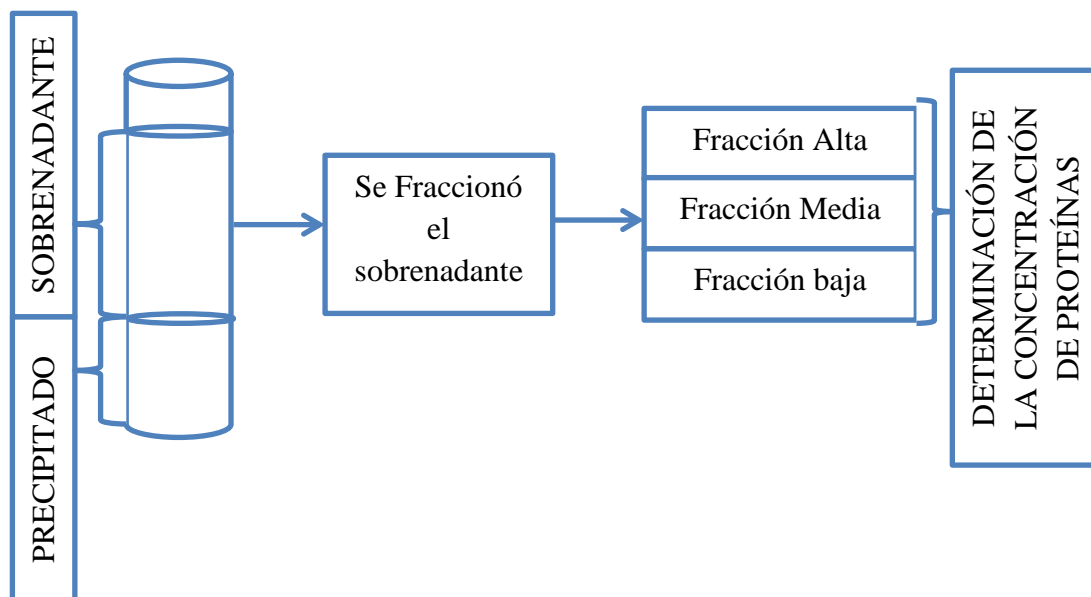
- ✓ Una vez obtenidas las larvas, se lavaron con PBS a pH 7.5 de 6 a 7 veces hasta que el PBS quedó totalmente límpido, de esta manera se logró que las larvas estén totalmente exentas de residuos de carne para evitar que el antígeno pueda ser alterado, por estos las larvas se conservaron en solución de PBS pH 7.5, a 4°C hasta obtener la cantidad necesaria (250 larvas) para poder trabajar en la elaboración de antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* teniendo cuidado de que el tiempo no exceda de 2 días y así evitar su contaminación.

- ✓ La obtención de la Muestra Biológica naturalmente infectada y la identificación de larvas con *Cysticercus cellulosae* fué detectada por la observación al microscopio de larvas en la carne de cerdo y la verificación de su morfología observando las larvas aplastada entre 2 portaobjetos al microscopio (Ver Anexo 1).

4.3.4.2 Obtención del extracto antigénico soluble

- ✓ Se contaron 250 larvas y se trituraron con la ayuda de un Triturador de Tejidos para la obtención de una Pasta Antigénica.
- ✓ La Pasta Antigénica se sometió a la desmembración sónica en el Sonicador, programando sesiones alternas de 30 segundos durante 30 minutos en baño de hielo a 10°C.
- ✓ Dejar la pasta antigénica sonicada a refrigeración a 4°C durante 24 horas, para permitir el flujo de las fracciones solubles del antígeno a la solución de PBS, para que las fracciones solubles del antígeno pasen al PBS.
- ✓ Pasado este tiempo, se sometió a 10.000 rpm por 10 min en una centrifugadora de alta velocidad, y se separó el sobrenadante.
- ✓ Posteriormente se separa el sobrenadante en tres fracciones que constituyen el extracto antigénico soluble. Ver Figura 11.

Figura 11: Fraccionamiento del sobrenadante, para la determinación de proteínas



- ✓ Se realizó la determinación de la concentración de proteínas, de cada fracción por el método de Biuret en $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ La fracción que dio un contenido de proteínas con una absorbancia alta, suficientes y aceptables para servir como antígeno, que dio un volumen de 4 mL aproximadamente, para ser utilizada es la fracción media.
- ✓ Esta fracción media se fraccionó en dos parte, la primera mitad del extracto antigénico soluble en vial para su liofilización durante 72 horas y la otra mitad del extracto antigénico soluble se alicuotó en viales con sus tapas y se conservaron a -20°C en congelación.

4.3.4.3 Proceso de liofilización

- ✓ Para poder realizar la liofilización se toman frascos de vidrio con sus respectivas tapas, del mismo volumen y de peso aproximado.
- ✓ Una vez fraccionado la mitad del volumen obtenido en dos fracciones, se toma una fracción y se lo reparte en dos frascos de vidrio.
- ✓ El proceso de la liofilización es la deshidratación de la solución antigénica, lo primero que se debe hacer es identificar los frascos y cubrir con una gasa bien sujeta y llevarlos a congelación a -80°C por 48 horas.
- ✓ Pasado este tiempo, la solución antigénica congelada se debe llevar inmediatamente al equipo de liofilización durante 72 horas.
- ✓ Inmediatamente se debe proceder a cerrar el frasco con sus respectivas tapas, para evitar contaminación y conservar la esterilización.

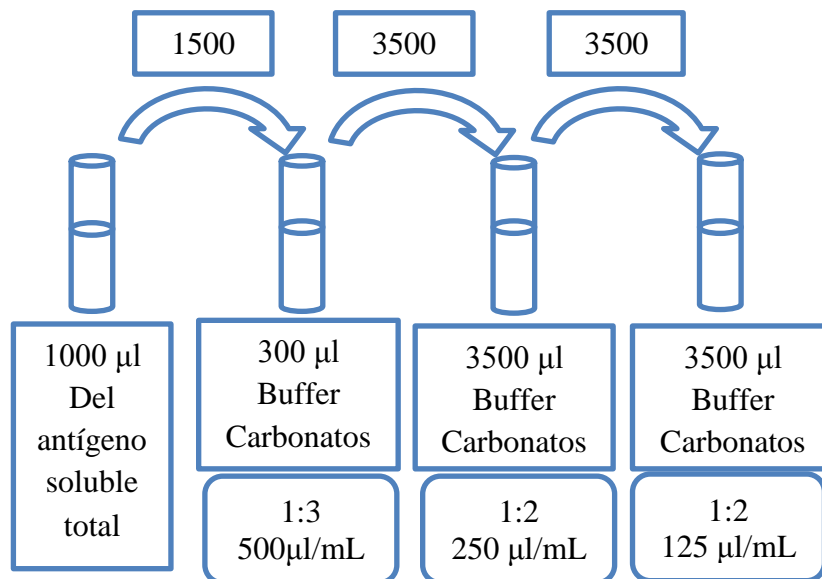
4.3.4.4 Sensibilización de la Microplaca o Policubeta y la determinación de la concentración adecuada del antígeno para el ELISA

PARA EL ANTIGENO FRESCO

- ✓ Para obtener la determinación de la concentración adecuada del antígeno fresco, se

sensibilizó la Microplaca o Policubeta realizando la dilución del extracto antigénico con el Buffer Coating o buffer carbonatos. Ver Figura 12.

Figura 12: Dilución del antígeno soluble total sin liofilizar para la sensibilización de la Policubeta o Microplaca



- ✓ Una vez hechas las diluciones con el Buffer carbonatos, se adiciona 100 µl a cada uno de los pocillos de una Microplaca o Policubeta bien identificada, cubrir la Microplaca con tapa o parafilm y luego dejar a 4°C por una noche, para sensibilizar la Microplaca con el extracto antigénico diluido. Ver Figura 13.
- ✓ Pasado este tiempo se debe retirar del refrigerador la placa sensibilizada con solución antigénica y vaciar el contenido de los pocillos.
- ✓ Realizar la adición de 200 ul de PBS a los pocillos de la Microplacas, y dejar

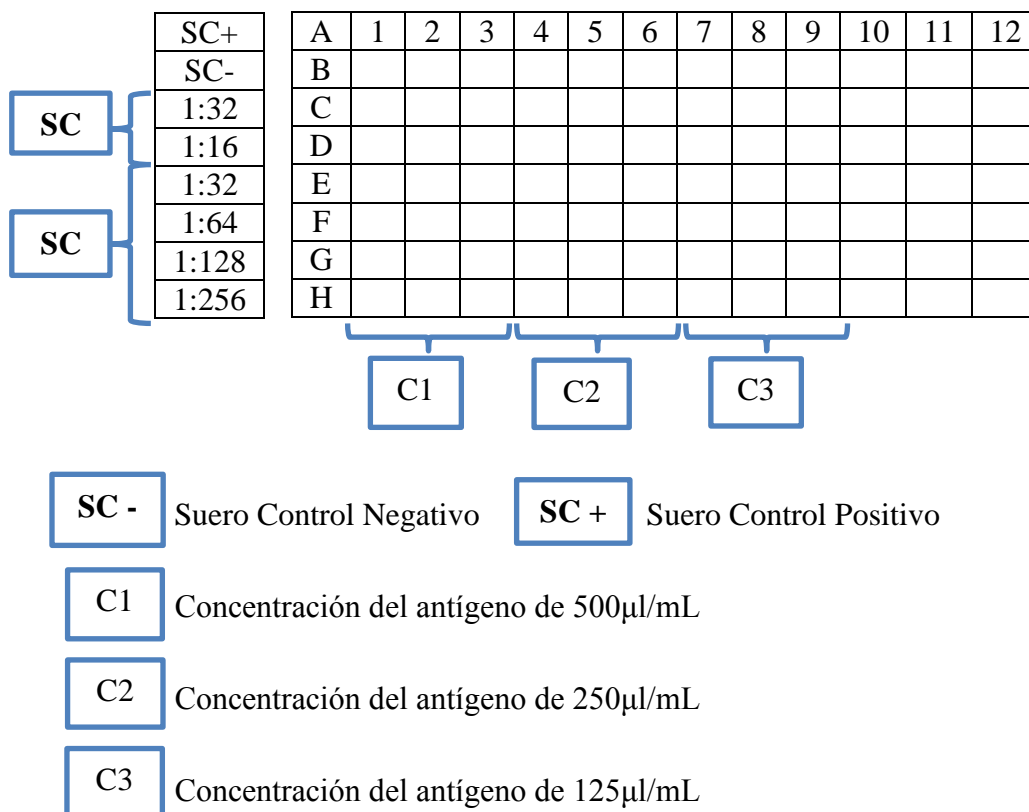
reposar durante 30 min por 37°C, y así bloquear los sitios inespecíficos

- ✓ Lavar los pocillos de la Microplaca por triplicado con 200µl de Buffer de lavado diluido a 1:4 y así eliminar todos los restos que no se han fijado, en el último lavado eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente aplicando golpes firmes.

PARA EL ANTIGENO LIOFILIZADO

- ✓ Para obtener la determinación de la concentración adecuada del antígeno liofilizado, se debe resuspender el vial con 2ml de agua destilada y dejar en reposo de 10 min antes de su uso.
- ✓ Se sensibilizó la Microplaca o Policubeta realizando la dilución del extracto antigénico con el Buffer Coating o buffer carbonatos. Ver Figura 12.
- ✓ Una vez hechas las diluciones con el Buffer carbonatos, se adiciona 100 µl a cada uno de los pocillos de una Microplaca o Policubeta bien identificada, cubrir la Microplaca con tapa o parafilm y luego dejar a 4°C por una noche, para sensibilizar la Microplaca con el extracto antigénico diluido. Ver Figura 13.
- ✓ Pasado este tiempo se debe retirar del refrigerador la placa sensibilizada con solución antigénica y vaciar el contenido de los pocillos.

Figura 13: Identificación de la Microplaca o Policubeta para la determinación de la concentración del antígeno



- ✓ Realizar la adición de 200 ul de PBS a los pocillos de la Microplacas, y dejar reposar durante 30 min por 37°C, y así bloquear los sitios inespecíficos
- ✓ Lavar los pocillos de la Microplaca por triplicado con 200 ul Buffer de lavado diluido a 1:4 y así eliminar todos los restos que no se han fijado, en el último lavado eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente aplicando golpes firmes.

- ✓ Pasado este tiempo tanto para la muestra fresca como para la muestra liofilizada, en ambos casos se utilizó un suero control positivo en 5 diluciones (1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512) y suero control negativo en 2 diluciones (1:16; 1:32), para la fijación del suero a la Microplaca (Ver Figura 13), los controles permiten evaluar la reproducibilidad de la prueba brindando confiabilidad de resultados.

4.3.4.5 Aplicación de la técnica de ELISA indirecto

- ✓ Siguiendo el esquema de distribución de sueros y la previa dilución de los mismos (figura 13), añadir en los pocillos 10 ul de cada dilución a cada uno, e incubar 30 min a 37°C en cámara húmeda.
- ✓ Lavar los pocillos de la Microplaca por triplicado con 200 ul Buffer de lavado diluido a 1:4 y así eliminar todos los restos que no se han fijado, en el último lavado eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente aplicando golpes firmes.
- ✓ Añadir 60 ul de conjugado (diluida 1/1000) e incubar por 30 min a 37°C.
- ✓ Lavar los pocillos de la Microplaca por triplicado con 200 ul Buffer de lavado diluido a 1:4 y así eliminar todos los restos que no se han fijado, en el último lavado eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente aplicando golpes firmes
- ✓ Adicionar 50 ul de solución de Sustrato y 50 ul del Cromógeno, inmediatamente

llevar a oscuridad por 30 min a temperatura ambiente.

- ✓ Para detener la reacción se adiciona 50 ul de solución Stopper o Stop.
- ✓ La lectura debe realizarse con el quipo lector de ELISA, a una longitud de 450 nm o dicromática 620nm – 650 nm.

Tabla 5: Resumen del procedimiento de la técnica de ELISA

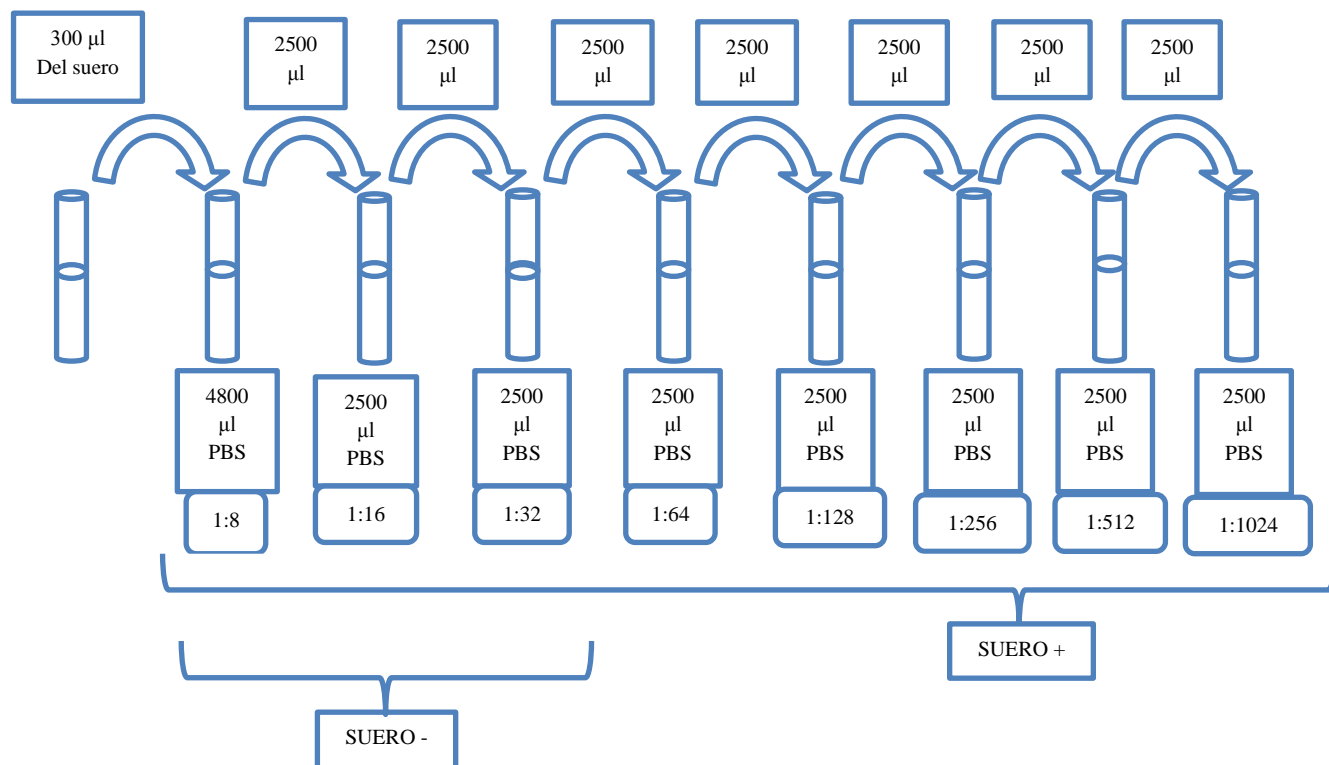
| COMPONENTE | VOLUMEN | TIEMPO |
|------------------|---|---|
| Incubar | ----- | 30 min a 37°C en cámara húmeda |
| Lavado | 3 veces | Buffer de lavado diluido a 1:4 |
| Conjugado | 60 µl | 30 min a 37°C |
| Lavado | 3 veces | Buffer de lavado diluido a 1:4 |
| Sustrato | 50 µl de Sustrato 50 µl de Cromógeno | 30 min a temperatura ambiente a oscuridad |
| Stop | 50 µl | ----- |

4.3.4.6 Determinación del título diagnóstico de los sueros

- ✓ De igual manera se procedió a establecer el título diagnóstico de los sueros para lo cual se sensibilizó una Microplaca con 100 µl de la concentración optima del antígeno diluido en Buffer carbonatos en cada pocillo de la Microplaca y se llevó a 4°C por 24 horas para que la placa se sensibilice.
- ✓ Pasado este tiempo, se lava la Microplaca con PBS por 3 veces, Posteriormente, se trabajó con tres sueros positivos y tres sueros negativos. Los sueros se diluyeron en

forma seriada en los siguientes títulos: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024. Ver Figura 14.

Figura 14: Dilución para la determinación del título diagnóstico de los sueros

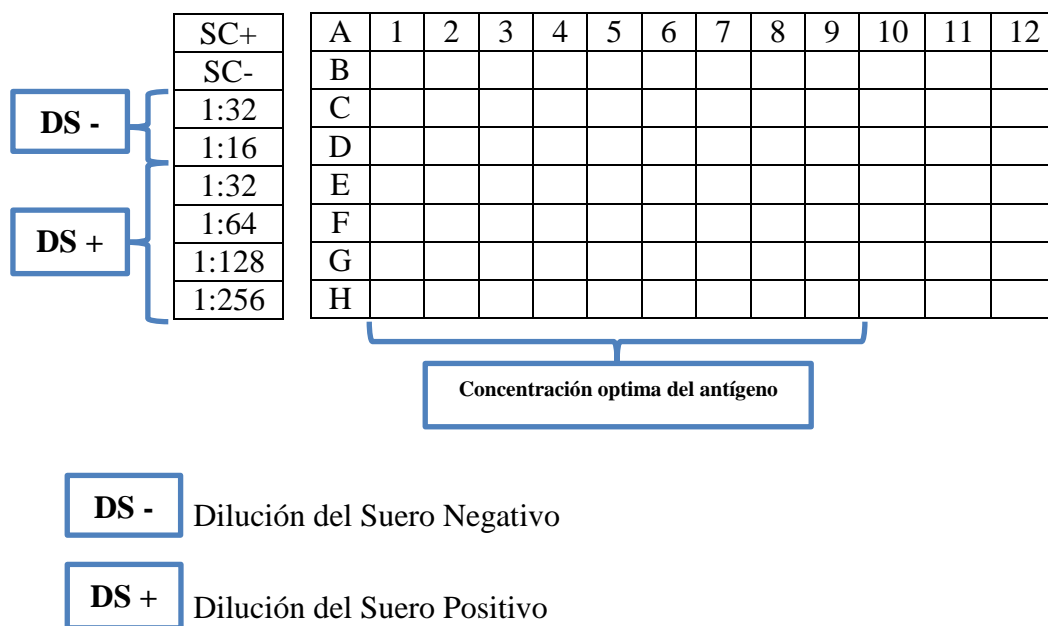


- ✓ Cada una de las diluciones de los sueros se adiciono 100 ul para la fijación del suero a la Microplaca (Ver Figura 15), los controles permiten evaluar la reproducibilidad de la prueba brindando confiabilidad de resultados y aplicando la técnica de ELISA ya mencionada (Ver Tabla 5).

4.3.4.7 Determinación del Cut off o Línea de corte

- ✓ Para realizar esta determinación se utilizaron 35 sueros negativos y 5 sueros positivos.

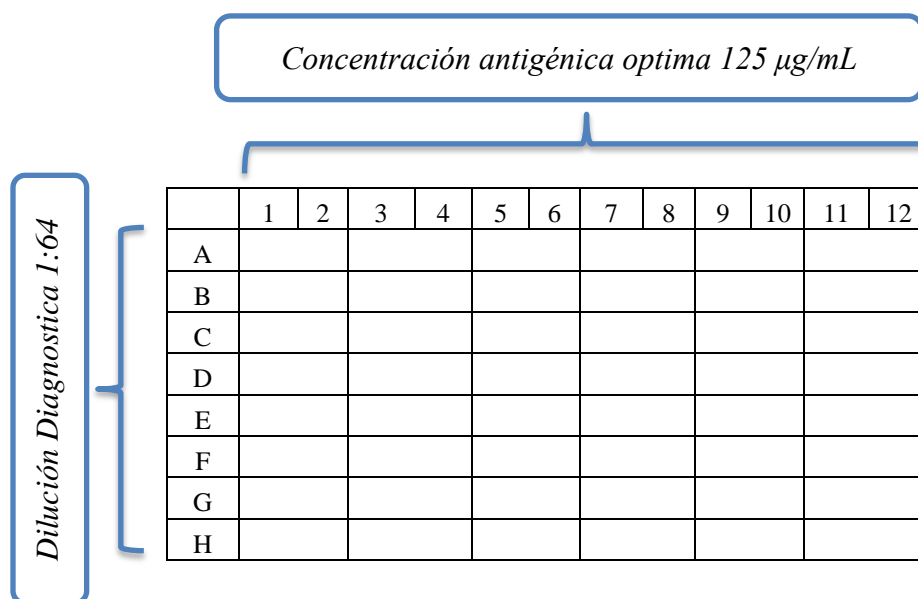
Figura 15: Identificación de la Microplaca o Policubeta para la determinación del título diagnóstico de los sueros



- ✓ Se sensibilizo una Microplaca con la concentración óptima del antígeno diluido en Buffer carbonatos y la dilución diagnostica (Ver Figura 16). Todos los sueros se diluyeron y se corrieron por triplicado. Se incluyó en la placa los respectivos controles tanto positivos como negativos. Se aplicó la técnica de ELISA ya mencionada (Ver Tabla 5).

- ✓ Para cada uno de los sueros positivos se obtuvo el promedio de las determinaciones.
- ✓ Se obtuvo el promedio de todas las determinaciones de los sueros negativos y así obtener D.O. específica del método.

Figura 16: Sensibilización de la Microplaca o Policubeta para la determinación del Cut off o línea de corte



5 RESULTADOS

Para obtener la fracción que contenga la concentración de proteínas más apropiada, se determinó la concentración proteica de cada fracción del extracto antigénico, se utilizó como Reactivo trabajo el reactivo de Biuret, con ayuda del espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm, y se obtuvieron las siguientes absorbancias:

Tabla 6: Resultados de la determinación de Proteínas del extracto antigénico del sobrenadante fraccionado.

| | <i>FRACCION SUPERIOR</i> | <i>FRACCION MEDIA</i> | <i>FRACCION INFERIOR</i> |
|---|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>Antígeno soluble total fresco</i> | 3430 ug/mL | 25900 ug/mL | 6470ug/mL |
| <i>Antígeno soluble total liofilizado</i> | 4950 ug/mL | 30090 ug/mL | 6860ug/mL |

La Concentración Antigénica más óptima para poder trabajar con ella es la fracción media la cual dio una concentración de 25900µg/mL del extracto antigénico fresco y 30090 µg/mL del extracto antigénico liofilizado.

Para determinar la concentración óptima del antígeno fresco y liofilizado explicada en la Figura 13, (no se mencionan diluciones mayores a 125µg/mL ya que estas diluciones no presentan absorbancias relevantes) obteniéndose los siguientes resultados (Ver Tabla 7 y 8):

Tabla 7: Obtención de datos por absorbancia para la obtención de la concentración antigénica óptima, para la sensibilización de la placa con el antígeno fresco.

| | ABS para 500 µg/mL | | | ABS para 250 µg/mL | | | ABS para 125 µg/mL | | |
|--------------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
| 1:32 | 0,783 | 0,671 | 0,732 | 0,213 | 0,196 | 0,189 | 0,423 | 0,534 | 0,421 |
| 1:64 | 0,383 | 0,245 | 0,331 | 0,165 | 0,083 | 0,099 | 0,201 | 0,276 | 0,198 |
| 1:128 | 0,183 | 0,178 | 0,172 | 0,062 | 0,067 | 0,057 | 0,127 | 0,129 | 0,121 |
| 1:256 | 0,069 | 0,092 | 0,090 | 0,032 | 0,036 | 0,062 | 0,067 | 0,087 | 0,056 |

Tabla 8: Obtención de datos por absorbancia para la obtención de la concentración antigénica óptima, para la sensibilización de la placa con el antígeno liofilizado.

| | ABS para 500 µg/mL | | | ABS para 250 µg/mL | | | ABS para 125 µg/mL | | |
|--------------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
| 1:32 | 0,790 | 0,689 | 0,632 | 0,182 | 0,172 | 0,161 | 0,387 | 0,392 | 0,367 |
| 1:64 | 0,390 | 0,452 | 0,361 | 0,090 | 0,083 | 0,65 | 0,213 | 0,199 | 0,180 |
| 1:128 | 0,201 | 0,151 | 0,162 | 0,053 | 0,034 | 0,043 | 0,083 | 0,099 | 0,092 |
| 1:256 | 0,095 | 0,061 | 0,092 | 0,017 | 0,027 | 0,015 | 0,061 | 0,051 | 0,046 |

Se analizó los resultados comparando los valores obtenidos y para confirmar los datos se volvió a repetir el mismo procedimiento, pero ya solo utilizando las dos concentraciones: 250 µl/ml y 125 µl/ml para confirmar así la concentración antigénica óptima. Tanto para el extracto antigénico fresco como para el extracto antigénico liofilizado. Obteniendo los siguientes resultados (Ver Tabla 9):

Tabla 9: Sensibilización de la placa con el antígeno fresco y liofilizado para la obtención de la concentración del antígeno usando ELISA.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|---------|-------|--------|-------|-------|---|---|-------|---|---|----|----|----|
| S+ | A | | | 1.233 | | | | 0.226 | | | | | |
| | B | | | 0.135 | | | | 0.120 | | | | | |
| S- | 1:32 C | 0.155 | 0.0449 | 0.069 | 0.057 | | | | | | | | |
| | 1:16 D | 0.411 | 0.079 | 0.171 | 0.203 | | | | | | | | |
| S+ | 1:32 E | 0.864 | 0.789 | 0.365 | 0.429 | | | | | | | | |
| | 1:64 F | 1.137 | 0.976 | 0.671 | 0.533 | | | | | | | | |
| | 1:128 G | 0.406 | 0.244 | 0.319 | 0.103 | | | | | | | | |
| | 1:256 H | 0.241 | 0.136 | 0.350 | 0.048 | | | | | | | | |

| | | | |
|----------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| 250 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 125 µg/mL |
| Extracto antigénico fresco | | Extracto antigénico liofilizado | |

s + Suero positivo
 s - Suero negativo

Así se estableció que los resultados positivos son todos los que se detectan la presencia de anticuerpos contra los antígenos solubles preparados son reactivas, caso contrario las lecturas son no reactivas.

Como concentración óptima del antígeno aquella la que corresponda a la concentración óptima de 125 µg/mL, permitiendo así una efectiva sensibilización de la placa porque a esta concentración se observan valores de densidad óptima claramente distinguibles entre los sueros positivos (+) de los sueros negativos (-).

Determinación del título diagnóstico de los sueros

De igual manera se procedió a establecer el título diagnóstico de los sueros para lo cual se estableció que a una dilución de 1:64 todos los sueros positivos dieron resultados reactivos y todos los sueros negativos resultaron no reactivos por lo que se estableció este título como dilución diagnóstica.

Tabla 10: Sensibilización de la placa con el antígeno fresco y liofilizado para la determinación del título diagnóstico del suero

| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----|-------|---|-------|-------|-------|-------|---|---|
| S - | S+ | A | 0.218 | | | | | |
| | S- | B | 0.110 | | | | | |
| | 1:32 | C | 0.135 | 0.142 | 0.109 | 0.123 | | |
| | 1:16 | D | 0.062 | 0.076 | 0.063 | 0.054 | | |
| S + | 1:32 | E | 0.632 | 0.260 | 0.432 | 0.532 | | |
| | 1:64 | F | 0.292 | 0.137 | 0.225 | 0.256 | | |
| | 1:128 | G | 0.152 | 0.063 | 0.106 | 0.135 | | |
| | 1:256 | H | 0.051 | 0.030 | 0.047 | 0.077 | | |

125µg/mL

Extracto antigénico fresco

125 µg/mL

Extracto antigénico liofilizado

S + Suero positivo

S - Suero negativo

Haciendo la comparación de resultados con los obtenidos con los sueros control podemos identificar que el valor más específico es la dilución del suero positivo de 1:64. Diluciones del suero mayor a 1:256 nos proporcionan absorbancias que no dan resultados que proporcionen información.

Determinación del Cut off o Línea de corte para la técnica de ELISA

Para realizar esta determinación se utilizaron 35 sueros negativos y 5 sueros positivos proporcionados por el laboratorio de parasitología del instituto SELADIS.

Se sensibilizó una Microplaca con la concentración óptima del antígeno (125 µg/mL). Todos los sueros se diluyeron a un título de 1:64 y se corrieron en triplicado. Se incluyó en la placa los respectivos controles tanto positivos como negativos.

Para cada uno de los sueros positivos se obtuvo el promedio de las tres determinaciones, obteniéndose así los siguientes resultados (tabla 9).

Tabla 11: Sensibilización de la placa o Microplaca para la determinación del Cut off o línea de corte

| Concentración antigénica óptima 125 µg/mL | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|----|-------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Dilución Diagnóstica 1:64 | A | 0.233 | 0.226 | 0.197 | 0.194 | 0.242 | | | | | 0.137 | |
| | B | 0.106 | 0.135 | 0.083 | 0.102 | 0.153 | 0.076 | | | | | |
| | C | 0.074 | 0.116 | 0.078 | 0.045 | 0.138 | 0.103 | | | | | |
| | D | 0.168 | 0.091 | 0.042 | 0.035 | 0.052 | 0.055 | | | | | |
| | E | 0.141 | 0.093 | 0.052 | 0.071 | 0.182 | 0.147 | | | | | |
| | F | 0.102 | 0.095 | 0.128 | 0.110 | 0.127 | 0.089 | | | | | |
| | G | 0.139 | 0.099 | 0.168 | 0.178 | | | | | | | |
| | H | | | | | | | | | | | |

Suero positivo

Se obtuvo el promedio de todas las determinaciones de los sueros negativos que dieron un valor de Do. 0.104. Luego se estableció el valor de 2 desviaciones estándar nos dio un valor de 0.117 y 3 desviaciones estándar nos dio un valor de 0.176.

Que sumadas a la Do promedio de los sueros negativos, nos dio un valor de 0.221 que por redondeo se establece como Línea de Corte o Valor Cut off la D.O. 0.220. Sabiendo que esta sería la línea de corte, teniendo resultados por encima de 0.220 en su D.O. es REACTIVO (POSITIVO), y resultados por debajo de 0.220 en su D.O. es NO REACTIVO (NEGATIVO).

Tabla 12: Tabla resumen para la determinación de la línea de corte

| | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| PROMEDIO (De valores | x | 0.10405 |
| D.O. de los sueros negativos) | | |
| DESVIACION ESTÁNDAR | DS | 0.05865 |
| DOS DESVIACIONES | $2DS$ | 0.118 |
| ESTÁNDAR | | |
| TRES DESVIACIONES | $3DS$ | 0.176 |
| ESTÁNDAR | | |
| Punto de corte o Cut off | $x + 2DS$ | 5.221 |
| (unidad de abs) | | |

6 DISCUSIÓN

Este Trabajo consiste en realizar un inmunodiagnostico mediante la técnica de ELISA empleando antígenos específicos de vesícula de cisticerco de *Taenia solium* los cuales serán más específicos (diagnóstico de cisticercosis), estos estarán adheridos a soportes inertes (placa de microtitulación) y antigammaglobulinas humanas conjugadas con enzimas como detectores de la reacción antígeno-anticuerpo, evidenciado por la liberación de color al actuar el sustrato.

El extracto antigénico soluble total fue preparado según la técnica E. Coltorti con algunas modificaciones (Iihoshi, 1988), las cuales se fueron realizando por el hecho que esta técnica esta descrita desde ya hace una década, y cambian según las necesidades y capacidad de obtener recursos, material e inclusive equipos de última generación.

Se determinó la concentración antigénica proteica del antígeno soluble fresco y antígeno soluble liofilizado, obteniendo 25900 µg/ml y 30090 µg/ml, respectivamente, estas concentraciones fueron aceptables para el desarrollo del ELISA. Durante la preparación del extracto antigénico soluble varios factores pueden influir en la concentración proteica final del antígeno, como las condiciones ambientales: temperatura constante y adecuada para que las larvas se conserven por mayor tiempo, evitar su contaminación, tiempo de recolección de la larva, la disección debe ser lo más rápido y exhaustiva posible ya que la carne de cerdo deja de ser viable y putrefacta después de las 72 horas de la disección.

La interpretación de las lecturas del micrométodo de ELISA para el diagnóstico de la Cisticercosis, se realizó según criterios de E. Coltorti y Col. indicado en la tesis Nakahara (1988), obteniendo límite de la Reactividad y la No Reactividad fue la de 1:128 para la dilución diagnóstica del suero, porque a bajas diluciones pueden presentar reacciones cruzadas con otros parásitos, tal cual está publicado por Vásquez (2000), indicando que existe una relación cruzada entre Cestodos y Cisticercosis, los cuales no fueron identificados en este trabajo.

La técnica de ELISA tiene valores de sensibilidad y especificidad que la convierten en un examen potencialmente útil para el tamizaje de la infección. Los valores óptimos en el presente estudio para aplicar la técnica de ELISA en el diagnóstico de Cisticercosis obtenidos son de 125 µg/mL como concentración óptima del antígeno, 1:64 como dilución del suero y 1/1000 como dilución del conjugado, los mismos que permiten afirmar que esta prueba puede tener utilidad para el tamizaje en población de la infección por *Cysticercus cellulosae*, la interpretación es compatible con los valores obtenidos en otros trabajos similares; la interpretación de las lecturas a diluciones superiores a esta, son considerados como reactivas o positivas y las lecturas inferiores como no reactivas o negativas, porque a bajas diluciones pueden presentar reacciones cruzadas con otros parásitos los cuales no fueron observados en este trabajo (Vásquez, 2000), siendo necesario evaluar un mayor número de muestras de individuos con diagnóstico positivo y negativo confirmados para poder tener una mejor idea de su verdadera eficacia e incluirla como instrumento para la investigación. Los resultados del presente estudio corroboran los hallazgos de otros trabajos en distintos

departamentos y países que muestran la utilidad de la técnica de ELISA como método de diagnóstico de Cestodos, como Flores lo indico el 2006 en la Gaceta Médica Cochabamba Bolivia, Estandarizando la prueba de ELISA para el inmunodiagnostico de Cestodos humanos empleando antígenos de producción local.

Una vez elaborado el antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* obtenidas de la región las cuales nos sirvieron para la aplicación de la prueba de ELISA, se analizaron las diferentes muestras positivas y negativas, donde se utilizaron 35 sueros negativos y 5 sueros positivos, pudiéndose evidenciar diferencias significativas de absorbancias entre ambos grupos, el punto de corte establecido fue de 0.220 unidades de absorbancias, estableciendo de este modo que aquellos valores por debajo de 0,220 se consideran negativos, y aquellos valores mayores al mismo son considerados positivos, esto va relacionado con el trabajo de Carrasco (1990) que indica que su valor de la línea de corte es de 0.280, Flores (2006) realizo la evaluación de la técnica de ELISA estandarizada utilizo 17 sueros control positivo y 26 sueros controles negativos, estableciendo el valor de Cut off determinado con la media de 3 controles negativos más 3 desviaciones estándar.

6 CONCLUSIÓN

- ✓ Se logró obtener un antígeno soluble total de *Cysticercus cellulosae* utilizando una cepa nativa elaborado de manera casera en el laboratorio de parasitología, y así poder realizar su aplicación en técnicas de ELISA indirecto como diagnóstico indirecto.
- ✓ Se logró obtener la muestra biológica para la elaboración de antígenos solubles de *Cysticercus cellulosae* como cepa nativa en la localidad de Batallas.
- ✓ Se logró aplicar la técnica de ELISA para el diagnóstico de *Cisticercosis* utilizando los extractos antigénicos solubles totales obtenidos de una cepa nativa, elaborado de manera casera en el laboratorio de parasitología de la FCFB-UMSA.
- ✓ Se logró identificar la concentración antigénica óptima de 125 µg/mL para la sensibilización de la Microplaca, dilución diagnóstica del suero de 1:64 y línea de corte usando los antígenos solubles totales elaborados de manera casera con una D.O. de 0.220.
- ✓ Por lo tanto se acepta la hipótesis planteada

7 RECOMENDACIONES

Para la elaboración de este trabajo se hacen las siguientes recomendaciones:

- Por los factores ambientales, como la conservación de la carne de cerdo infectada naturalmente, se debe fraccionar la misma para que esta no se contamine y conservación, se debe mantener la carne a 4°C.

- Para la obtención de larvas enteras, es necesaria la ayuda de un bisturí y una pinza anatómicas, y dichas larvas limpiarlas con PBS de 3 a 4 veces para su trabajo eficaz.

- Aplicar controles de calidad en todos y cada uno de los pasos a realizar, control de temperatura exacta, control de volúmenes, materiales limpios, etc.

8 BIBLIOGRAFÍA

- **Abdalla A., Flores J., Valdisierra C & Abdalla M. (1975)** Estudio sobre *Taenia solium* en la población de Belén. Trabajo de pregrado del Dpto. de Medicina Preventiva y Social, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.
- **Alarcón de Noya, B., Dávila I., Fernández I., Bruce A.C., Spencer L., Medina L., García M.F. y Colmenares C. (1997)** Utilidad de la determinación simultánea de IgG e IgM específicas en suero y líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de la neurocisticercosis en Venezuela. Arch. Venezolanas Med. Trop.; 1: 81-92.
- **Andrade R., Giraldo J., Medina G. (2003)** Estudio de la prevalencia de la cisticercosis porcina en el matadero municipal de Tunja-Boyacá. Revista de la asociación Colombiana de ciencias Biológicas: Memorias XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Vol. 15:2.
- **Alcívar E., Hernández M., Ibarra J., Macías D. (2010)** TESIS, Fortalecimiento de la Investigación clínica epidemiológica de los helmintos céstodos: teniasis en la provincia de Manabí año 2009. Portoviejo, Ecuador.
- **Carrasco R., Ampuero T. (1990)** Comparación de técnicas de diagnóstico inmunoserológico de la Neurocisticercosis, en IBBA, propuesta UMSA, Anuario 1989-1990.
- **Coltorti E., Alarcón de Noya B., Berro O., Flisser A., Strauss N y Vaz A. (1989)** Informe de la reunión técnica sobre la normatización y estrategia para la

implementación del inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana. CEPANZO. Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo; 31: 291-293.

- **Correa D., Sandoval M.A., Harrison L.J.S., Parkhouse R.M.E., Plancarte A., Meza-Lucas A. & Flisser A. (1989)** Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid Transfer Society Tropical Medical Hyg.; 83: 814-816.
- **Cordero del campillo, M y Rojo Vazquez, F. (1999)** Parasitología Veterinaria. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA.
- **Choromanski L., Estrada J.J. & Kuhn R.E. (1990)** Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. J. Parasitol; 76: 69-73.
- **Flisser A., Madrazo I. y Delgado H. (1997)** Aspectos clínicos y patológicos. En: Cisticercosis humana. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. México; 29-32
- **Flisser A. (2011).** Cisticercosis: enfermedad desatendida. Bol Med Hosp Infant México, 68(2):138-145.
- **Flosser A., Plancarte A. & Avila G. (1999)** Application of diagnostic methods for cysticercosis and taeniosis to epidemiological studies. In: *Taenia solium: Taeniasis/Cysticercosis*. García H.H. & Martínez S.M. (ed). Ed. Universo, Lima, Perú; 39-52.
- **Flores A., Rodríguez P. (2006)** Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de Hidatidosis Humana empleando antígenos de producción

local, Gaceta médica, laboratorio de Inmunología- SEDILAB (Facultad de Medicina-UMSS), Cochabamba-Bolivia.

- **Ferrer E., Cortéz M., Rojas G., Lares M., Alarcón de Noya, B., Harrison L., Parkhouse R.M.E. y Cabrera Z. (1999)** Seroprevalencia de cisticercosis en Belén Edo. Carabobo 1998. Act. Cient. Venezolana, AsoVAC.; 50 (Sup. 2): 345.
- **García, H. H., R. H. Gilman, A. E. González, R. Pacheco, M. Verástegui y V. C. W. Tsang, The Cisticercosis Working Group in Peru, (1999)** “Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco, Peru”, Acta Tropica 73(1):31-36.
- **Gilman RH, Garcia HH, Gonzalez AE, Verastegui M, Dunleavy M, Evans C, and The Cysticercosis Working Group in Perú (1999)** Shortcuts to development: methods to control the transmission of cysticercosis in developing countries. En: García HH, Martínez SM (Eds.) *T. solium* Taeniasis/Cysticercosis. 2da. Edición. Lima: Editorial Universo: 313-26.
- **Gonzales M, Garmendia F, Benllochpicquer V, Melgar M, Zapater C. (2002)** Cisticercosis intrasellar, Hallazgo sorpresivo en un paciente con diagnóstico de prolactinoma. Relatos del II Congreso Peruano de Neurocirugía, Lima.
- **González, A.; C. Gavidia; N. Falcón; C. Evans; T. Bernal; T. López; H. García; R. Gilman. (2002)** Porcine cisticercosis: Epidemiology, diagnosis and treatment. En: *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis. García, H.; S. Martínez (eds). p 97-119. Ed. Universo. Lima
- **Guzmán L. (2010)** Determinación de frecuencia de infección de Cisticercosis

porcina por *Taenia solium* en explotaciones del cantón Espíndola, provincia Loja – Ecuador. Universidad de Córdoba.

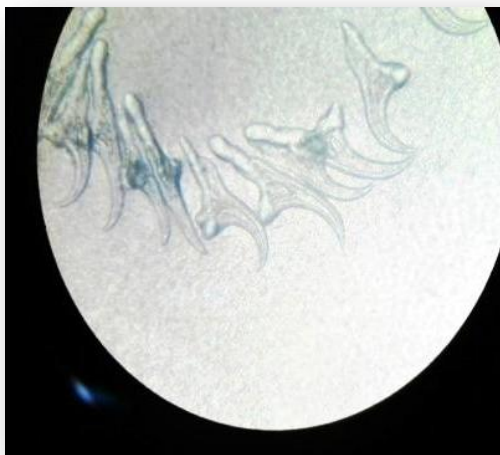
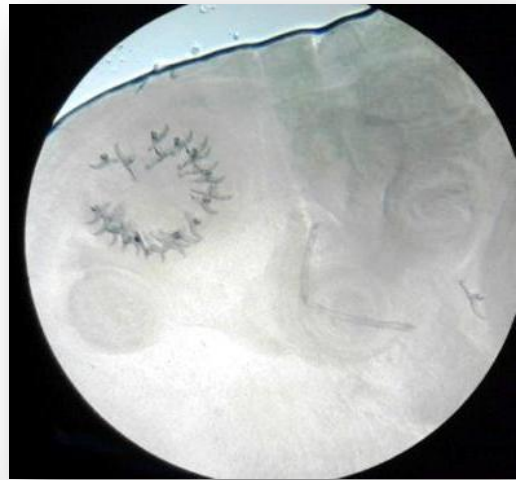
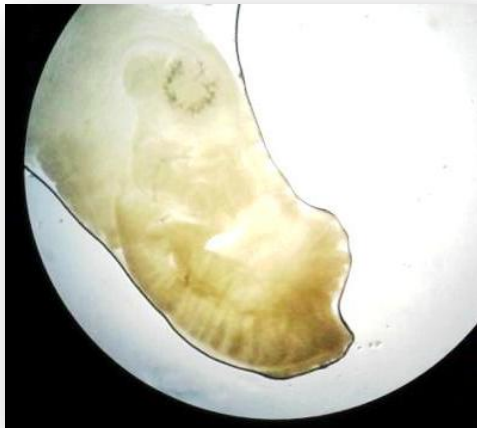
- **Ito A., Plancarte A., Ma L., Kong Y., Flisser A., Cho S., Liu Y., Kamhawi S., Lightowers M.W. & Shantz P. (1989)** Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am. J. Tropical Medicine Hyg*; 59: 291-294.
- **Nakahara I. (1988)** Elaboración del antígeno soluble de Cisticercosis para técnicas serológicas, Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.
- **Larralde C, De Aluja Alines S. (2006)** Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud / coordinación de Carlos Larralde, Aline S. de Aluja. México, FCE, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud.
- **Martins K.Y., Mineo J.R., Pajuaba de Moura L. & Costa-Cruz J.M. ELISA and Western Blotting (2000)** tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Tropical Medicine International Health*; 5: 443-449.
- **Mollinedo S., Prieto C. (2006)**, El enteroparasitismo en Bolivia (Memoria de la investigación 1975- 2004), Bolivia Mayo 2006.
- **Ochoa R. (2012)** Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos, Edición Finlay, La Habana.
- **Orrego-Solano MA, Cangalaya C, Nash TE, Guerra-Giraldez C; Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú (2014)** “*Identificación de células*

proliferativas en quistes de Taenia solium". Revista Peruana Medicina Experimental de Salud Pública; 31(4):702-6.

- **Reyes L., Ortega M. (1999)** “*Estudio epidemiológico de la cisticercosis y conocimiento de la enfermedad en la población del jicarito*”, telica, Departamento de Medicina Preventiva UNAM, León.
- **Rossi N., Rivas I., Hernández M. y Urdaneta H. (2000)** Inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis: estudio comparativo de extractos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* y *Taenia crassiceps*. Revista Cubana Medicina Tropical; 52: 157-164.
- **Ruíz JL. (2004)** “Evaluación del conocimiento sobre teniasis/cisticercosis y uso de la educación popular como medida preventiva en la zona de León agosto a noviembre del 2003”; Tesis para optar a título de licenciatura en medicina universidad nacional autónoma de Nicaragua, veterinaria. Nicaragua.
- **Sarti, E., A. Flisser, P. Schantz, M. Gleizer, M. Loya, A. Plancarte, G. Ávila, J. Allan, P. Craig, M. Bronfman y P. Wijeyaratne (1997)** “Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico”, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56(2):127-132.
- **Sánchez E. y col. (2010)** Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias, Serie de Normas técnicas N° 32, 2° Edición, Lima-Perú.
- **Torres J. R. & Istúriz R.** The 10 most common questions about central nervous system cysticercosis. Infect. Dis. Clin. Pract. 5: 482-485.

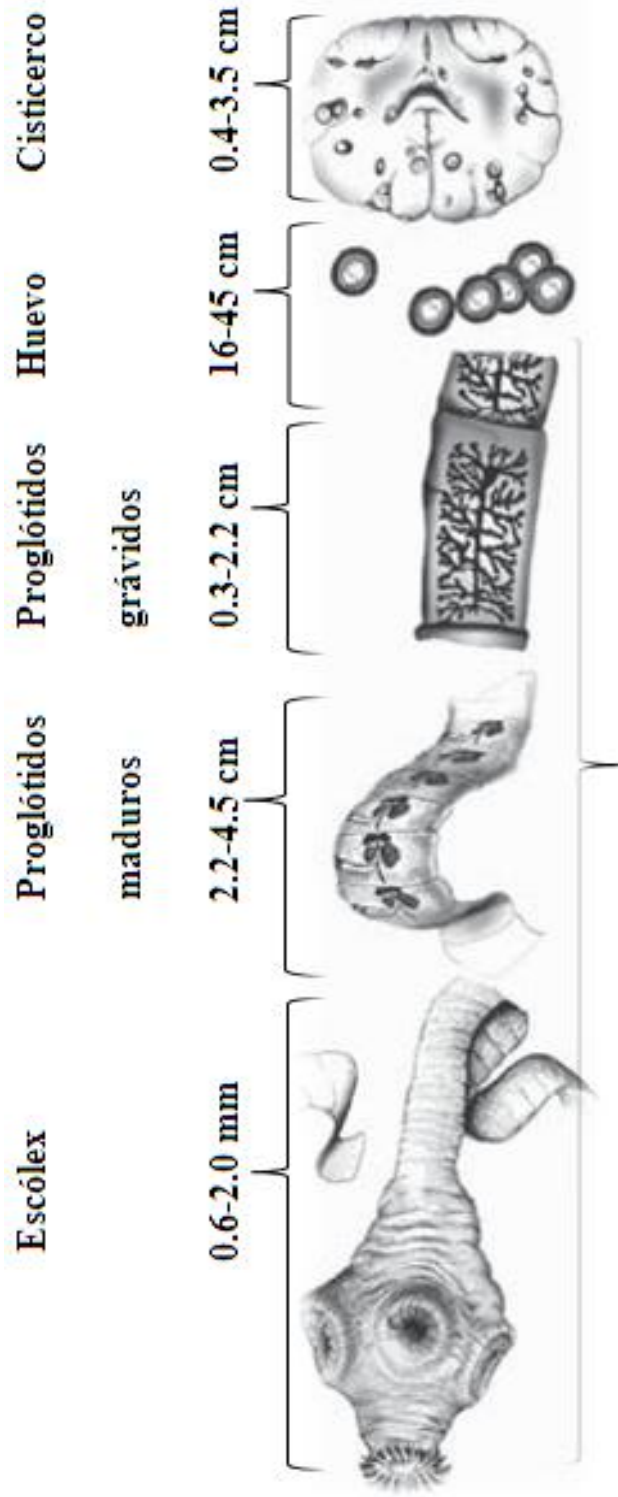
- **Wilkins P., Allan J.C., Verastegui M., Acosta M., Eason A.G., García H.H., Gonzalez A.E., Gilman R.H. & Tsang V.C. (1999)** Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* Taeniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg; 60: 199-204.
- **Wagner C., Alarcón de Noya B., Colmenares C. & Bruces A.C. (2000)** Epidemiological surveillance of cysticercosis in a rural área of Venezuela. XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria; 2: 105.
- **Wagner C., Colmenares C., Bruces A. y Alarcón de Noya, B. (2000)** ELISA para la detección de antígenos en el diagnóstico de la cisticercosis utilizando anticuerpos policlonales anti-fluido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*. Asociación Científica Venezolana, AsoVAC; 51 (Sup. 2): 172.
- **World Health Organization, 2002; Phiri y col., 2003; Rajshekhar, 2003; Zoli y col., 2003**
- **Willms K. Vargas L y Laclette. J (2006).** Biología del Parásito. En: Cisticercosis Guía para Profesionales de la Salud. (Carlos Larralde, Aline S. de Aluja) pags. 19-40.
- **Xionar Isabel, Avellan solorzano (2003)** “Estudio epidemiológico de teniasis cisticercosis en una comunidad rural del departamento de León”, Tesis (Maestría en Bioquímica Clínica), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, leon.

9 ANEXOS

Anexo 1: Identificación de las larvas de *Cysticercus cellulosae* de *Taenia solium* obtenidas de la carne de cerdo infectada por medio del microscopio

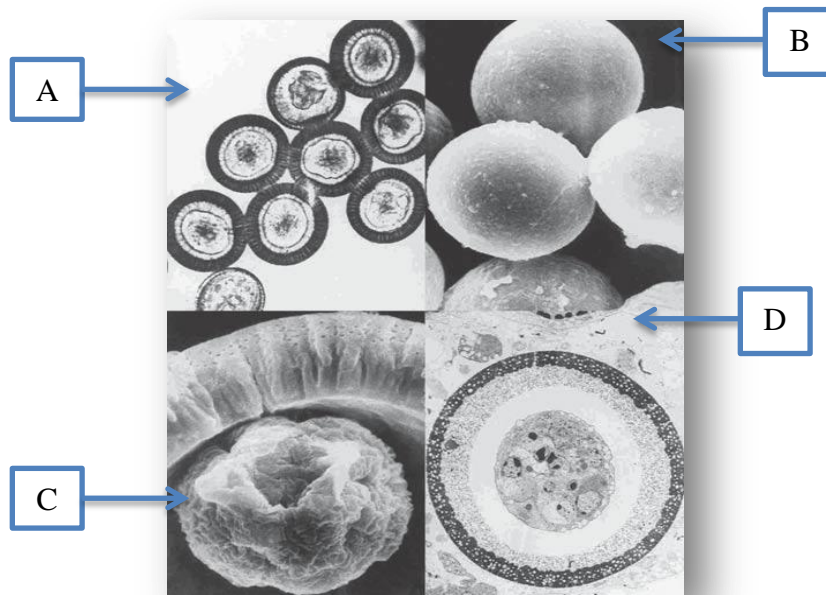
Se tomó una larva de *Cysticercus cellulosae* y para verificar su morfología y diferenciarla de *Taenia saginata*, se aplasta entre dos portaobjetos y se observa al microscopio, observándose en las imágenes escólex, ganchos y cuello identificando la *Taenia solium*.

Anexo 2: Detalle morfológico y rango de tamaño de la Taenia solium.



Estróbilos 1-12 m

Fuente: encontrado en <http://slideplayer.es/slide/1128723/>

Anexo 3: Huevecillos de la *Taenia solium*

- a) Huevos en fresco observados en el microscopio de luz; b) huevos intactos observados en el microscopio electrónico de barrido; c) corte de un huevo inmaduro observado en el microscopio electrónico de barrido; d) corte.

Anexo 4: Se observa la plazuela del municipio de Batallas, localidad Batallas, provincia Los Andes, ciudad de La Paz.



Plaza Municipio de Batallas, se observa la venta de productos de la región. Ubicado en el municipio de Batallas, localidad Batallas, provincia Los Andes, ubicada a 50 Km de la ciudad de La Paz (aproximadamente a una hora y media).

Anexo 5: Zonas con Cisticercosis endémica



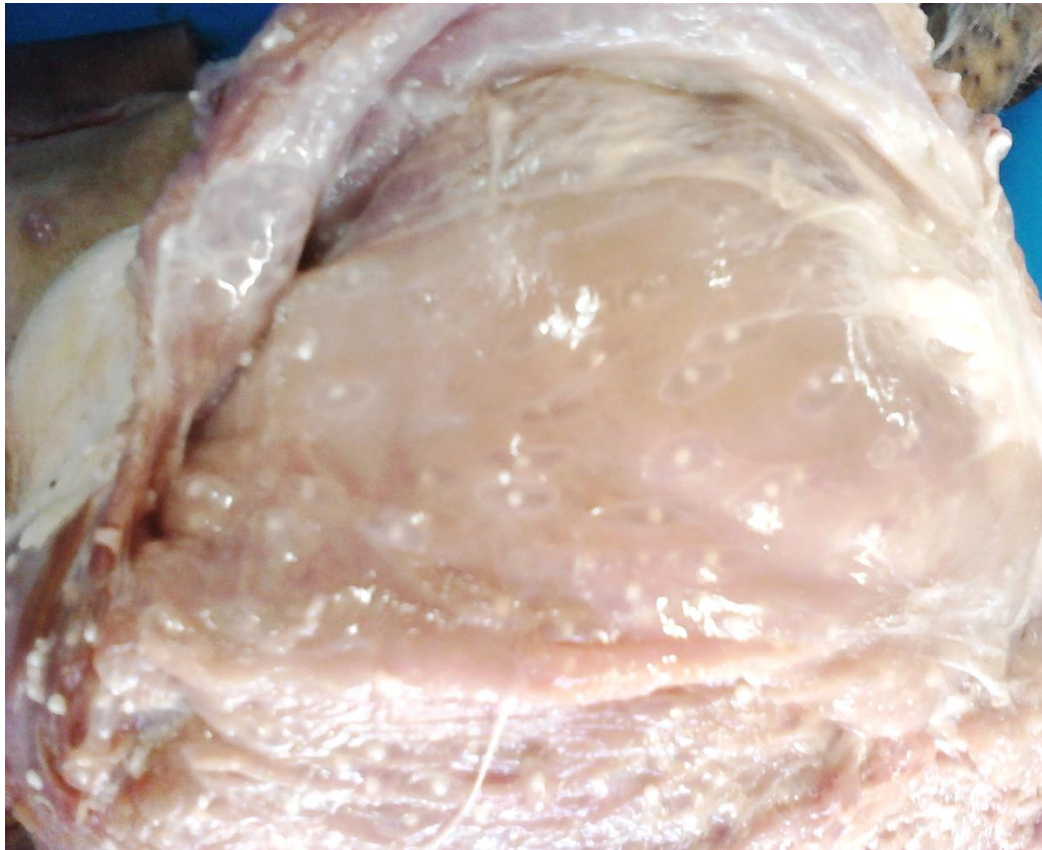
Fuente: encontrado en <http://slideplayer.es/slide/1128723/>

Anexo 6: Obtención de la muestra biológica contaminado naturalmente con *Cysticercus cellulosae* en la comunidad de Copacabana, municipio de Batallas, localidad Batallas, provincia Los Andes, ciudad de La Paz.



Compra de la Muestra Biológica contaminada naturalmente con *Cysticercus cellulosae*, en el municipio de Batallas.

Anexo 7: Muestra Biológica con larvas de *Cysticercus cellulosae* en el tejido de la carne de cerdo infectada naturalmente.



Se observa a simple vista larvas de *Cysticercus cellulosae*, las cuales nos ayudaran a la elaboración del antígeno soluble total.

Anexo 8: Fraccionamiento de la muestra biológica con *Cysticercus cellulosae*



Se Fracciono de la carne de cerdo contaminada naturalmente con *Cysticercus cellulosae* y llevada a 4°C, para su conservación y fácil trabajo para la obtención de larvas.

Anexo 9: Fracción de muestra biológica para la obtención de las larvas de *Cysticercus cellulosae*.



Una vez fraccionada la muestra biológica infectada naturalmente con *Cysticercus cellulosae*, se procedió a la obtención de las larvas, sacándolas con mucho cuidado evitando que estas revienten, con la ayuda de un bisturí anatómico.

Anexo 10: Obtención de las larvas de *Cysticercus cellulosae*.



Se observan de las larvas de *Cysticercus cellulosae*, las cuales se obtuvieron con mucho cuidado, evitando que estas revienten, con la ayuda de un bisturí anatómico, y colocándolas en una caja Petri de vidrio que contiene solución de PBS a pH 7.4 Tween.

Anexo 11: larvas de *Cysticercus cellulosae* bien lavadas



Se observa larvas enteras de *Cysticercus cellulosae* enteras lavadas de 3 a 4 veces con PBS pH7.4 Tween, hasta que se observe de la misma manera que la fotografía.

Anexo 12: Obtención de la pasta antigénica usando un triturador manual



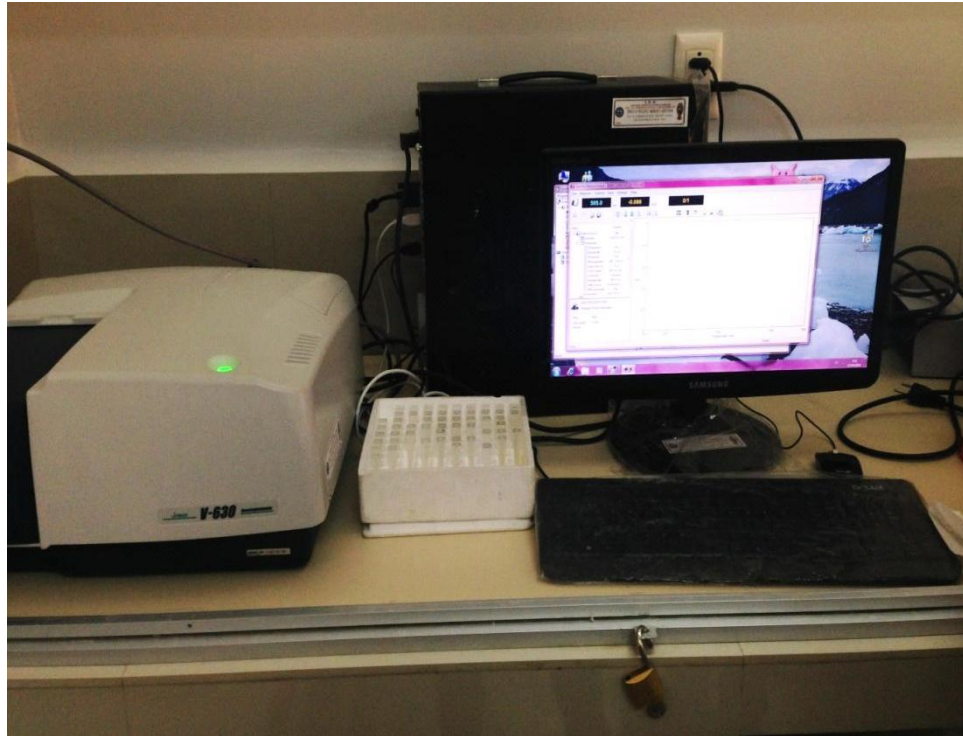
Con la ayuda del triturador manual se obtuvo la pasta antigénica la cual nos ayudó a la obtención de la concentración óptima del antígeno.

Anexo 13: Sonicado de la Pasta antigénica



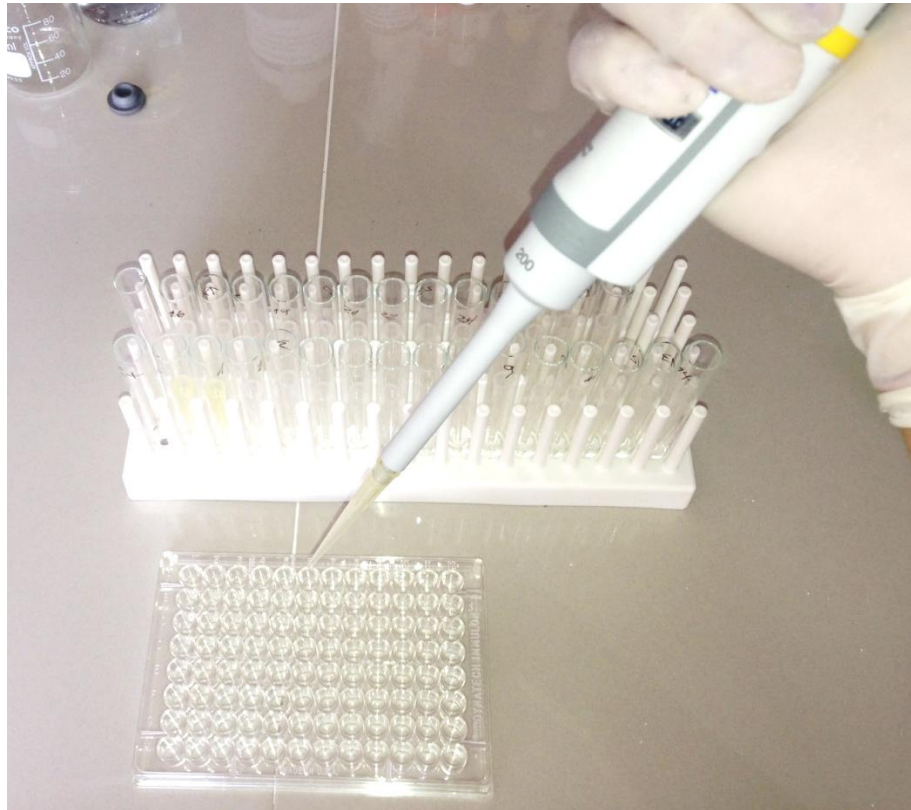
Se lleva la pasta antigénica se somete a la desmembración sónica en el Sonicador Branson 3200, el que se programa en sesiones alternas de 30 segundos durante 30 minutos a 10°C.

Anexo 14: Determinación de la concentración de proteínas



Se realizó la lectura de la concentración de proteínas existentes en la pasta antigénica en el espectrofotómetro Jasco modelo V-630 por el método de Biuret.

Anexo 15: Sensibilización de la Placa o Policubeta



Se sensibilizó la placa o Policubeta con la concentración antigénica óptima de 125 $\mu\text{l}/\text{mL}$ y la dilución diagnóstica de 1:64.

Anexo 16: Preparación de Reactivos

BUFFER CARBONATO (Coating) pH 9,6

$\text{Na}_2\text{CO}_3 = 1.59 \text{ gr}$

$\text{NaHCO}_3 = 2.39 \text{ gr}$

$\text{H}_2\text{O (d) csp} = 1000 \text{ mL}$

PBS pH 7.5 para 500 mL 1X

$\text{NaCl} = 2.19 \text{ gr}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 4.04 \text{ gr}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 5.94 \text{ gr}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.22$

$\text{H}_2\text{O csp}$

Ajustar el pH, llevar a auto clavar