

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS
A TRAVES DE UNA PRUEBA INMUNOENZIMATICA
ELISA**

POSTULANTE :

UNIV. VANIA JAEL BONIFAZ PÉREZ

TESINA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

**La Paz – Bolivia
2006**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS
A TRAVES DE UNA PRUEBA INMUNOENZIMATICA
ELISA**

POSTULANTE :

UNIV. VANIA JAEL BONIFAZ PÉREZ

ASESORAS :

**DRA. JACQUELINE CALLA
DRA. JACQUELINE CORTEZ**

TESINA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

**La Paz – Bolivia
2006**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

I . INTRODUCCIÓN	1
II . MARCO TEÓRICO	3
A . ANTECEDENTES GENERALES	3
1. DEFINICIÓN DE CISTICERCOSIS	3
2. EPIDEMIOLOGÍA	3
2.1. Distribución	3
3. ETIOLOGÍA	6
3.1 . Características de los cisticercos	8
4. CICLO DE VIDA	10
4.1. Periodo de incubación de infección	13
5. PATOGENIA	13
5.1 . Teniasis	13
5.2 . Cisticercosis	14
6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	17
7. RESPUESTA INMUNE	19
7.1 . Inmunidad humoral frente a los helmintos	19
7.2 . Inmunidad celular frente a los helmintos	20
7.3. Respuesta Inmune en cisticercosis	20
8. TRATAMIENTO	23
8.1. Drogas cestocidas	23
8.2. Tratamiento sintomático	24
9. MÉTODOS DE CONTROL DE CISTICERCOSIS	25
10. DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS	27
10.1 . Hemograma	27
10.2 . Estudios de neuroimagen	27
10.3. Pruebas inmunológicas	28
10.3.1 . Ensayoinmunoenzimático (ELISA)	29
10.3.2 . Electroforesis en gel de poliacrilamida	33

III. ANTECEDENTES	27
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
V. JUSTIFICACIÓN	43
VI. OBJETIVOS	44
A . OBJETIVO GENERAL	44
B . OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	45
A . TIPO DE ESTUDIO	45
B . POBLACIÓN	45
C . METODOLOGÍA	46
1. Material y métodos	46
1.1. Material	46
1.2. Reactivos	46
1.3 Equipos	47
2. Procedimiento	47
2.1. Obtención de los sueros	47
2.2. Preparación del antígeno soluble a partir de cisticercos	47
2.3. Determinación de proteínas por el Método del Rojo Ponceau	48
2.4. Determinación de condiciones de trabajo para ELISA indirecto	49
2.5. ELISA indirecto diagnostico de cisticercosis (procedimiento)	50
2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE- SDS)	53
VIII . RESULTADOS	55
IX . DISCUSIÓN	66
X . CONCLUSIONES	68
XI . BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA N° 1	Zonas con Cisticercosis endémica	5
FIGURA N° 2	Oncósfera de taenia solium	10
FIGURA N° 3	Ciclo vital: Taenia solium	11
FIGURA N° 4	Duración Vital e Infectante	13
FIGURA N° 5	Aspecto macroscópico de cisticercos en cerebro	16
FIGURA N° 6	Ejecución de la técnica de ELISA	29
FIGURA N° 7	Fases de la técnica Elisa Sándwich	30
FIGURA N° 8	Fases de la Técnica Elisa de competición	31
FIGURA N° 9	Fase de la técnica Elisa indirecto	32
FIGURA N° 10	Determinación del peso molecular proteico del antígeno	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	Casos de cisticercosis humana en Bolivia	4
TABLA N° 2	Determinación del punto de corte (cut off)	56
TABLA N° 3	Determinación del título significativo (+) para ELISA	57
TABLA N° 4	Valores de absorbancia según ELISA para cisticercosis	58
TABLA N° 5	Distribución de muestras según titulación	60
TABLA N° 6	Análisis estadístico de la técnica ELISA	61
TABLA N° 7	Resultados según número y porcentaje de casos (+) y (-)	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N° 1	Valores de absorvancia para cisticercosis (+) y (-)	57
GRAFICO N° 2	Número de casos positivos para cisticercosis según sexo.....	63
GRAFICO N° 3	Distribución de casos (+) según sexo y edad	64

DEDICATORIA

*Con mucho cariño para Víctor y Elvira
mis padres , quienes fueron mi constante
aliento y fuerza para seguir adelante
apoyandome en todo momento , a mis
hermanos Ricardo, Efraín y Diego
por brindarme siempre su afecto , apoyo y
compañía , mi querida familia.*

Bania J. Bonifaz Pére

AGRADECIMIENTOS

- *Al personal del Instituto S.E.L.A.D.I.S, mi profundo agradecimiento por permitir el desarrollo del presente trabajo, especialmente a las Dras del área de Inmunología, la Dra. Jacqueline Calla y Jacqueline Cortés por su colaboración y aporte para poder plasmar el presente trabajo.*
- *Al querido personal del Laboratorio del Hospital del Niño, en especial al Dr. Eduardo Aranda T. ,por los valores y enseñanzas impartidas , a las Dras Nieves Velásquez y Miriam Zambrana , a todos ellos mil gracias por su apoyo cariño y confianza.*
- *A mi Familia, a mis padres Víctor y Elvira por su apoyo incondicional , especialmente por su amor y cariño al igual que, a mis hermanos Ricardo , Efraín y Diego .*
- *A quien en todo momento estuvo junto a mi dándome animo, mucha fuerzas y amor para seguir adelante , Ruvén.*
- *A mis queridas amigas y compañeras por su constancia y cariño Maria , Daniela , Edith y Maribel.*
- *Y principalmente a Nuestro Señor Dios por darme el aliento de vida y permitirme gozar de todo lo que estoy viviendo .*

Vania J. Bonifaz Pérez

RESUMEN

La cisticercosis es una parasitosis de importancia en nuestro país debido a las manifestaciones clínicas graves que ocasiona en el hombre, ocurre por la infección de los tejidos por cisticercos de *Taenia solium*, la ubicación de estos a nivel del sistema nervioso central (Neurocisticercosis) es de mayor relevancia, por los daños que ocasiona, generando morbilidad considerable, siendo una de las principales causas de epilepsia, Bolivia (1) se encuentra entre las regiones endémicas; la alta incidencia detectada en hospitales de la ciudad de La Paz demuestra la importancia de la neurocisticercosis.

Es por ello que es necesario el enfoque de métodos que proporcionen un adecuado diagnóstico, la prueba inmunológica empleada con mayor frecuencia en nuestro medio es el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) en complemento de los estudios de neuroimagen para confirmar o descartar la infección, por lo que se desarrolló un ELISA en base a antígenos obtenidos, y procesados en SELADIS (Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud) con el objetivo de constituirse en examen de costo económico accesible, buena sensibilidad y especificidad y este más al alcance de la población que padece esta enfermedad. La técnica optimizada permitió diferenciar claramente muestras positivas y negativas, el punto de corte determinado fue 0,244 estableciendo que aquellos valores por debajo 0,244 se consideraron negativos y aquellos valores mayores como positivo; Se establecieron las condiciones adecuadas de trabajo para la técnica tales como: concentración adecuada de antígeno 25 ug/ml de antígeno, como dilución adecuada de las muestras 1/200. El rendimiento de la técnica fue evaluado mediante determinación de Sensibilidad, Especificidad con valores de 92% y 88% respectivamente y VPP 88,5%; VPN 92%. Aplicando la prueba de "t" de student, se determinó la concordancia de resultados entre técnicas Inmuno Enzimática optimizada y la TAC (gold estándar) el cual mostró la existencia de asociación estadística dando un valor de $p < 0,01$ según tablas.

Se determinaron las condiciones para la separación antigénica en función al peso molecular de las proteínas del antígeno de cisticerco por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE), se determinaron los pesos moleculares de 3 fracciones correspondientes a 13KDa; 11KDa y 9KDa.

I. INTRODUCCIÓN .

La cisticercosis es una parasitosis de importancia en nuestro país debido a las manifestaciones clínicas graves que ocasiona en el hombre , esta enfermedad ocurre por la infección de los tejidos por las larvas quísticas de la *Taenia solium* o cisticercos, en la cual el paciente se comporta en forma similar al hospedero intermediario porcino, al ingerir los huevos infectantes del parásito provenientes de otro individuo portador de una *Taenia solium* en el intestino , los cisticercos pueden localizarse en cualquier tejido u órgano , pero la ubicación de mayor relevancia por los daños que ocasiona es a nivel del sistema nervioso central (Neurocisticercosis) , constituyendo la mas importante de las enfermedades neurológicas humanas de origen parasitario, generando morbilidad considerable , siendo una de las principales causas de epilepsia con graves consecuencias sociales, físicas y psicológicas.

Esta enfermedad es más frecuente en zonas rurales desde donde se convierte en una amenaza para las zonas urbanas, ya que la infección por *Taenia solium* va estrechamente ligada al cuidado de los ganados, bajo nivel sanitario, uso de aguas contaminadas , fecalismo , migración de personas portadoras del parásito adulto , deficiente educación higiénica , hábitos en la preparación de alimentos.

La cisticercosis es una parasitosis que representa un problema de salud publica a nivel latinoamericano dada su prevalencia en naciones que se encuentran en vías de desarrollo como lo es nuestro país Bolivia , que según la 56ª Asamblea Mundial de Salud , OMS 2003 (1) se encuentra entre las regiones con cisticercosis endémica; Los departamentos más afectados en el país son Chuquisaca , Cochabamba , La Paz y Tarija , la alta incidencia detectada en hospitales de la ciudad de La Paz demuestra la importancia de la principal forma de cisticercosis , la neurocisticercosis (2)

Es por este y otros puntos planteados anteriormente que se hace necesario el enfoque de este tema y los métodos que proporcionen un adecuado y certero diagnóstico, la prueba inmunológica empleada con mayor frecuencia en nuestro medio es el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) método con buena sensibilidad y especificidad, por lo que se plantea el desarrollo de un método inmunoenzimático en base a antígenos obtenidos, procesados e identificados por Electroforesis en gel de poliacrilamida en SELADIS (Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud); la finalidad es que la prueba desarrollada tenga buena sensibilidad y especificidad, sea menor costo económico y este mas al alcance de la población que padece esta enfermedad, constituyéndose en complemento importante de los estudios de neuroimagen para confirmar o descartar la infección.

II. MARCO TEÓRICO.

A . ANTECEDENTES GENERALES.

1. DEFINICIÓN DE CISTICERCOSIS .

La cisticercosis ocurre como consecuencia de la infección causada por el estadio larvario (cisticerco) de la *Taenia solium* , que se produce cuando el hombre se convierte en forma accidental en hospedero intermediario de éste cestodo , se puede contraer a través de la ingestión de alimentos o agua contaminada con huevos de este parásito (etapa larvaria o cisticerco) o también puede darse autoinfección . La infección se manifiesta cuando los cisticercos se encuentran en el estómago, los jugos gástricos propician la salida de las larvas, y facilitan su entrada al torrente sanguíneo atravesando la pared del estómago e intestino, de esta manera son distribuidas por todo el cuerpo, incluyendo el cerebro (3) .

2. EPIDEMIOLOGÍA.

2.1. DISTRIBUCIÓN.-

La prevalencia de cisticercosis es muy variable, depende fundamentalmente de factores socioeconómicos y culturales. No obstante, en las áreas endémicas la enfermedad comúnmente afecta a comunidades rurales y urbanas con patrones higiénicos bajos , tal como lo demuestran estadísticas de localidades ligadas a bajas condiciones de vida. Comunidades rurales y periurbanas de la mayoría de los países de Latinoamérica contribuyen a acentuar el problema: la crianza tradicional y doméstica del ganado porcino, carente de apoyo técnico en la ganadería porcina, de mataderos oficiales, inspección sanitaria por parte de las alcaldías y la falta de control en el cumplimiento de las normas legales en lo que respecta a cría y faenado de cerdos. **Bolivia** se encuentra entre los países de mayor prevalencia en el mundo , conjuntamente con Méjico , Brasil , Ecuador y

Perú en Latinoamérica , pues de acuerdo a experiencia de OPS se considera de alta prevalencia países que sobrepasen el 1% (2) . Según estudios de seroprevalencia por muestreo a nivel urbano y rural en nuestro país, entre 1994-1996 fueron identificados como departamentos de mayor riesgo epidemiológico a Chuquisaca , Cochabamba , La Paz , y Tarija ; Para el año 2000 se determinó que los casos de cisticercosis/teniasis se presentaron en mayor porcentaje en personas entre 15 a 49 años de edad, presentándose además en la ciudad de La Paz un número de casos considerable en personas mayores a 50 años (4).

TABLA N° 1 CASOS DE CISTICERCOSIS HUMANA EN BOLIVIA .

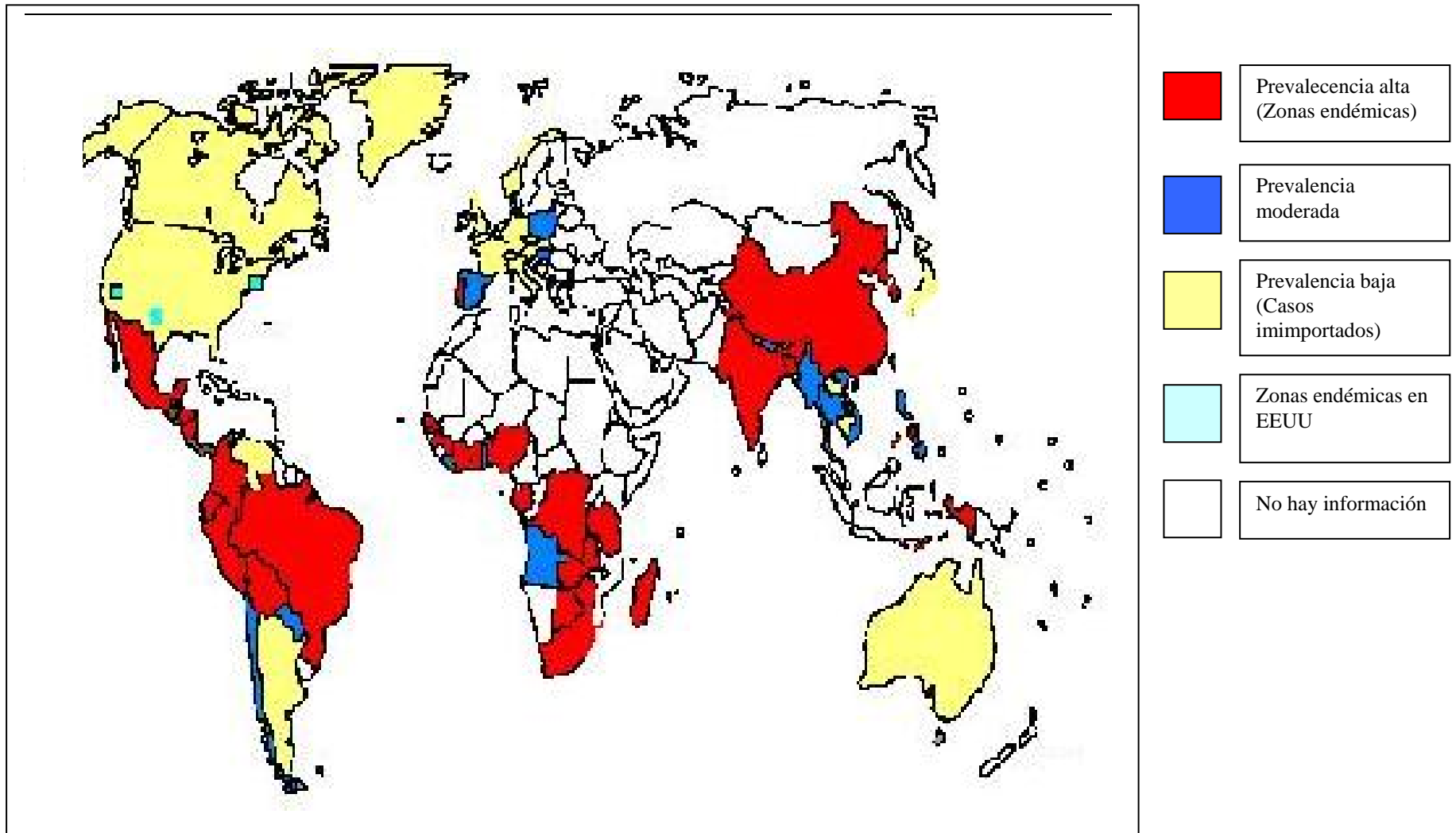
AÑO = 1997 – 2000

Ciudad	Edad					Total
	< a 1	1 a 4	5 a 14	15 a 49	> a 50	
La Paz	0%	13.3%	16%	50.9%	20%	100%
Beni	0%	100%	0%	0%	0%	100%
Sucre	0%	5.7%	2.8%	80%	11%	100%
Cochabamba	0%	3.7%	1.9%	83%	11.3%	100%
Potosí	0%	11.7%	14.4%	53.2%	20.7%	100%
Sta. Cruz	1.5%	13.1%	15%	50.9%	19%	100%
Tarija	1.2%	21.4%	15.3%	45.4%	17%	100%
Total	1.3%	21.4%	15.1%	45.4%	1.8%	100%

Fuente : Vigilancia Epidemiológica .Bolivia .2000

Según la Asamblea Mundial de Salud realizada por la OMS en el año 2003 (1) , se determino que la cisticercosis humana es endémica en el África subsahariana ; América Central , la zona andina de América del Sur , el Brasil y México; China, el subcontinente indio y el sudeste asiático (Fig.N°1).

FIGURA N°1 ZONAS CON CISTICERCOSIS ENDÉMICA



FUENTE : ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 56ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD .Control de la cisticercosis. 2003

3. ETIOLOGÍA.

La cisticercosis es una enfermedad conocida desde la antigüedad , en el siglo IV A.C., Aristóteles en su tratado "Historia de los Animales" describe con precisión la presencia de larvas parasitarias en la musculatura del cerdo . En 1650 Paracelso sospechó que la epilepsia de un sacerdote enfermo derivaba de la presencia de quistes cerebrales , en 1819 se le otorga el nombre de "cisticerco fisherianus" atribuido a Laenec basándose en "kistis" vejiga, "kestus cola, y "fisherianus" en honor a su descubridor , quien introdujo por primera vez el término "cellulosae". En 1860 las primeras descripciones anatomopatológicas y sus respectivas correlaciones clínicas fueron hechas por Virchow, quien además determinó la localización meníngea basal de este parásito llamándolo cisticerco multilocuaris", dos años mas tarde Griesinger establece una relación directa entre cisticercosis cerebral y epilepsia . En 1885 Kuchenmeister descubre que el cisticerco es la forma larvaria de *Taenia solium*, Entre los años 1909 y 1911 Winberg y Moses los que mediante la fijación del complemento en el suero iniciaron el diagnóstico serológico . En 1983 Aparecen los primeros informes sobre tratamiento de la cisticercosis , la Organización Mundial de la Salud publicó una guía para el manejo, la prevención y control del complejo Teniasis/Cisticercosis , en la década de 1980 se dio mucho énfasis al diagnóstico inmunológico de la NC destacándose los estudios sobre el ensayo inmunoenzimático (ELISA), y la inmunoelectro transferencia (EITB) (5).

La *Taenia solium* es un platelminto de la clase Cestoda , familia Taenidae a la cual pertenecen varias especies : *Taenia solium*, *T. saginata* ; *T. hydatígena* ; *T. pisiformes* ; *T. multiceps* ; *T. crassiceps* ; *T. taeniaeformis* ; *T. ovis* . El cestodo *Taenia solium* es un gusano plano y segmentado que vive adherido por medio de las ventosas del escolex a la mucosa de la parte proximal del intestino delgado del hombre, este cestodo mide unos 3 metros de largo y vive más de 25 años. Está compuesto por un escolex armado con 4 ventosas y una

doble corona de ganchos, un cuello angosto y un cuerpo elongado que consiste en varios cientos de proglótides hermafroditas (6).

En la zona del cuello se ubican las células totipotenciales de gran actividad metabólica, que son muy sensibles a la acción de fármacos que actúan en las fases de replicación del parásito, la unión lineal de las proglótides forma una larga cadena o estróbila que constituye el cuerpo, cada proglótide es a la vez unidad de alimentación y reproducción ya que éste gusano es hermafrodita. Su sistema de alimentación es rudimentario, carece de órganos de especialización, absorbiendo los nutrientes a través del tegumento de las proglótides por ósmosis y pinocitosis. Las proglótides más cercanas al cuello son pequeñas e inmaduras y a medida que en su interior van madurando los órganos reproductores de ambos sexos avanzan hacia el extremo distal siendo remplazadas por nuevas proglótides inmaduras, proceso que culmina en las proglótides grávidas (repletas de huevos) ubicadas al final de la cadena. Se diferencian a lo largo de la estróbila: proglótides grávidas, maduras e inmaduras (7).

La fecundación entre proglótides próximas se ve favorecida por los movimientos peristálticos del intestino, una vez fecundada la proglótide ahora queda grávida y los órganos masculinos involucionan, el útero se repleta de huevos, la estróbila de *T. solium* tiene menos de 1000 proglótides. Los huevos miden de 30 a 45µm de diámetro, son esféricos u ovoides con una gruesa corteza de color café que contiene la oncósfera o embrión exacanto con seis ganchos refringentes ordenados en haz en su interior; Los huevos salen al exterior con las heces, su aspecto microscópico no permite diferenciar *T. solium* de *T. saginata* por lo que al encontrarlos durante el examen de las heces de una persona infectada se informa la presencia de huevos de *Taenia sp.*

El huevo de *Taenia solium* ingerido por el cerdo o el hombre, una vez llegado al intestino libera a la oncósfera o embrión exacanto el cual por medio de sus ganchillos se interna en la mucosa intestinal, penetra vasos mesentéricos y se

disemina por todos los órganos , en tejidos la oncosfera sufre vesiculización y en aproximadamente tres meses se forma el “cisticerco” metacestodo vesicular lleno de líquido que contiene al escolex invaginado , provisto de cuatro ventosas y dos filas de ganchitos (8).

CARACTERISTICAS DE LOS CISTICERCOS.

Los cisticercos se presentan como pequeñas vesículas quísticas de 0,5 a 1 cm de diámetro, con líquido transparente en su interior, su pared externa o cápsula es muy delgada (0,6 a 2,5 μ m de espesor) y translúcida , esta estructura membranosa está compuesta de tres capas : cuticular o externa , celular o media y reticular o interna ; La visión de su superficie con microscopía electrónica de barrido ha permitido identificar una cubierta de microvellosidades de diferentes tamaños ,la transparencia de la cápsula permite visualizar en su interior una masa algo densa , blanquesina que corresponde al escolex invaginado , ésta masa tiene movimiento propios , de allí el nombre de “cisticercus” , que quiere decir quiste con cola . El escolex presenta una estructura similar a la de la *T. solium* con una cabeza o rostelo que presenta ventosas y gancho y un rudimento de cuerpo ,que incluye al canal espiral (6).

Una vez que los cisticercos entran en el sistema nervioso , se encuentran en estado vesicular , donde los parásitos son viables , en algunos casos los cisticercos permanecen por años en este estadio ; en otros casos entran como resultado del ataque inmunológico , en un proceso degenerativo (estadio de involución) que termina con la muerte del parásito ; los cambios que sufren los parásitos a consecuencia de la reacción inflamatoria que el huésped desarrolla a su alrededor son : Una etapa temprana en la evolución natural de los cisticercos es la forma **vesicular** con membrana transparente en esta etapa la membrana es delgada y el líquido que contiene es claro y la larva invaginada es de aspecto normal. La segunda etapa en la evolución de los cisticercos es la etapa **vesicular coloidal**, en ella la membrana es mas gruesa, el líquido en su interior se torna turbio y la larva es deleznable. La tercera etapa evolutiva es la **granular nodular**, en el cual la vesícula reduce su tamaño y su contenido se torna

semisólido, incluyendo a la larva. La última etapa evolutiva del cisticerco es la **nodular calcificada**, en la cual el parásito se transforma en un nódulo sólido y calcificado (9).

Los cisticercos ubicados en el cerebro se clasifican por estadio en :

- a. Estado encefalítico.
- b. Estado quístico (cellulosae) : Parenquimatoso , subaracnoideo , ventricular , mixto y espinal .
- c. Estado racemoso cisternal.
- d. Estado parcialmente degenerado.
- e. Estado totalmente degenerado ó calcificado.

Las características morfológicas de los cisticercos , de acuerdo a su localización en cerebro (ubicación más relevante) son :

-Cisticercos parenquimatosos , son más pequeños y se localizan preferentemente en la corteza cerebral y en los ganglios basales debido a la gran vascularidad de éstas áreas , éstos quistes rara vez miden mas de 10mm de diámetro ya que la presión que ejerce el parénquima cerebral impide su crecimiento .

-Cisticercos subaracnoideos , pueden ser pequeños si se localizan en la profundidad de los surcos corticales o pueden alcanzar tamaños mayores de 5cm si están a nivel de las cisternas de LCR (líquido cefalorraquídeo) en la base del cráneo .

-Cisticercos ventriculares , pueden ser pequeños o grandes , usualmente son únicos y se localizan de preferencia en el IV ventrículo , éstos parásitos pueden estar adheridos a la capa ependimaria o encontrarse libremente en las cavidades ventriculares .

-Cisticercos espinales, se localizan en el espacio subaracnoidéo o en el parénquima medular y su aspecto macroscópico es similar al de los quistes localizados en el cerebro (9).

4. CICLO DE VIDA .

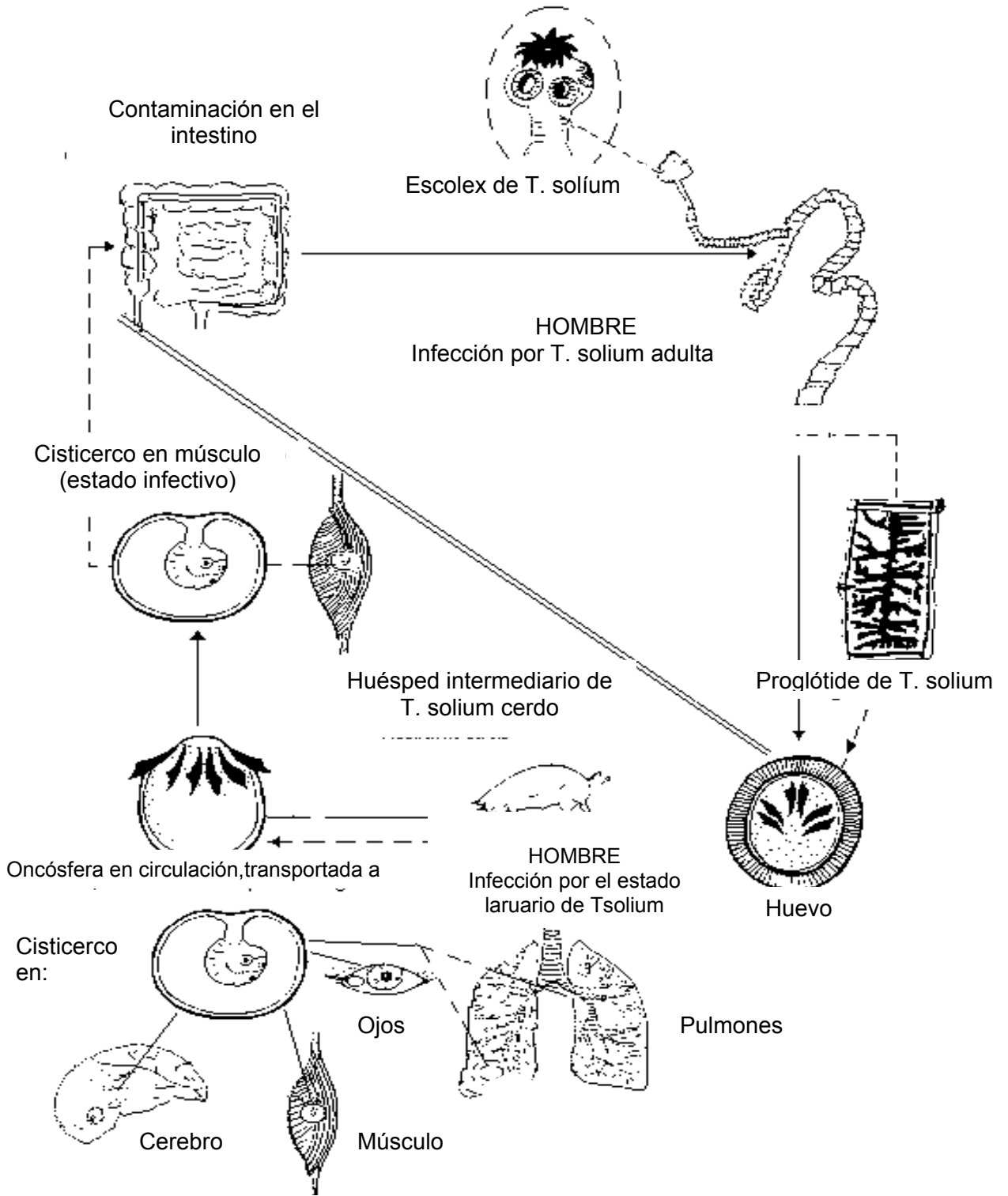
El hospedero definitivo es el hombre en cuyo intestino delgado se desarrollan los parásitos adultos , los hospederos intermediarios son el cerdo y accidentalmente el hombre causándole cisticercosis. El parásito adulto habita en el tubo digestivo del ser humano donde se mantiene firmemente adherido a la pared intestinal mediante sus ventosas y ganchos ; cada día varios proglótides grávidos se separan del extremo distal de la tenia y son expulsados con las heces , cada proglótide contiene miles de huevecillos que se liberan en el ambiente y que pueden permanecer viables durante largo tiempo (8) ; en lugares donde la eliminación de excretas es inadecuada los cerdos se alimentan con heces humanas e ingieren los huevos de la *T. solium*, una vez ingeridos por el cerdo los huevecillos pierden su cubierta y se liberan las oncosferas (embriones hexacantos) los que atraviesan la pared intestinal y entran al flujo sanguíneo desde donde son transportados a los tejidos del cerdo principalmente músculos estriados y cerebro (Figura N°2) ; en dichos tejidos las oncosferas evolucionan y se transforman en larvas (cisticercos). Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida y contaminada con cisticercos las larvas se evaginan en el intestino delgado , el escolex se adhiere a la pared intestinal y el parásito crece y forma proglótides (10).



Fig 2. En la cisticercosis el hombre adquiere los huevos por contaminación , éstos se activan en el estómago y duodeno para convertirse en larvas invasivas (oncosferas) que atraviesan la pared intestinal

FUENTE : Sistema Interactivo de Información de Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas .Med_Disclaime.htm

FIGURA N° 3 CICLO VITAL: *Taenia solium*



El hombre desarrolla cisticercosis cuando ingiere huevecillos de *T.solium* , el mecanismo por el cual éstos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre es similar al descrito en el cerdo. Las formas principales de contagio humano incluyen ingestión de comida contaminada con huevecillos y contaminación ano-mano-boca en individuos portadores del parásito en su intestino los que pueden auto infectarse o infectar a otras personas.

Factores de Riesgo (3)

- Ingerir alimentos o agua contaminada.
- No lavarse las manos antes de comer y después de ir al baño.
- No lavar y desinfectar adecuadamente las verduras.
- Comer en lugares con poca higiene.
- Comprar carne en sitios sin control sanitario

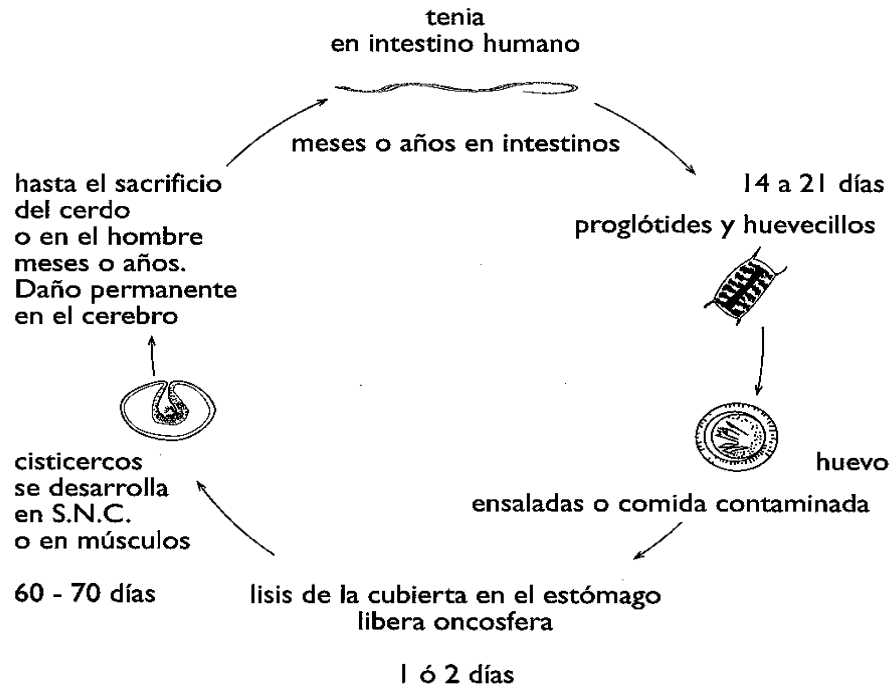
4.1. PERIODO DE INCUBACIÓN E INFECCIÓN

El lapso desde que se ingieren los huevecillos hasta cuando se desarrolla la infección, va de acuerdo a los períodos de viabilidad y ocurrencia de cada evento del ciclo biológico del parásito.(11). (FIG N°4).

- * Las proglótides y los huevecillos que pueden vivir de 4 a 6 semanas en la tierra y en el excremento.
- * La ingestión de los huevecillos, la lisis de sus cubiertas en el intestino en unas horas.
- * La erosión de la mucosa y el paso de la oncosfera con sus cuatro ganchos al torrente venoso, al corazón y a la circulación sistémica en unas horas.
- * El paso de la oncosfera que tiene el tamaño de un macrófago (20 micras) hasta el fin de los capilares arteriales musculares o más probablemente en el cerebro del hombre .
- * Su estancia final es el parénquima cerebral, de no ser así llegan hasta los espacios subaracnoideos o ventrículos donde permanecen por horas o días.

- * Si no encuentran campo propicio mueren o se desarrollan hasta ser larvas -cisticercos- en un periodo de 60 a 70 días, dos a tres meses.

FIGURA N° 4 DURACIÓN VITAL E INFECTANTE



FUENTE :DPTO DE MEDICINA FAMILIAR.,FACULTAD DE MEDICINA, UNAM . Cisticercosis, a la caza de la *Tenia solium* .2000

5 . PATOGENIA.

5.1. TENIASIS.-

La mayoría de las infecciones por *Taenia solium* presenta mecanismos de daño :

- Toxialérgico , los productos del catabolismo del parásito pueden ser absorbidos causando síntomas digestivos y generales .
- Expoliatriz , corresponde a la sustracción de nutrientes contenidos en el quimo digestivo del huésped.

- Irritativo , el efecto de la adhesión del escolex a la mucosa intestinal puede producir irritación mecánica y rara vez una leve reacción inflamación catarral (12).

5.2. CISTICERCOSIS.-

En el hombre el cisticerco se ubica en el tejido celular subcutáneo y musculatura esquelética , la diseminación de las oncósferas se da por vía sanguínea y puede localizarse a nivel del sistema nervioso central (SNC), corazón , pulmón , los ojos o cualquier otro órgano. Es más importante la ubicación a nivel del SNC , pudiendo invadir cualquiera de sus estructuras , se sitúa frecuentemente en el parénquima de los hemisferios cerebrales , las cavidades, el espacio subaracnoideo , las meninges y la medula .

Este parásito tiene predisposición particular por afectar el sistema nervioso condicionando una enfermedad pleomórfica por la multiplicidad de lesiones que causa , tiene diversidad de localizaciones y su aspecto macroscópico varía dependiendo de su localización , siendo las más frecuentes : forma **“celulosa”** a aquellos parásitos que tienen escolex y forma **“racemosa”** a aquellos que no lo tienen , éstos últimos donde el escolex no puede ser identificado , sus membranas se adhieren entre sí , se agrupan en racimos que por resonancia magnética (RM) se observa como una gran vesícula o esfera grande que puede medir desde 5mm hasta 100mm , en los espacios cisternales se observan como quiste multilobulado (7).

La clínica depende de factores como : la localización del parásito en el cerebro , el número de cisticercos , el aspecto vesicular o **racemoso** siendo éstos últimos los más **peligrosos** , y el estado vital del parásito (10). Las formas morfológicas del cisticerco están asociadas con las formas clínicas de la neurocisticercosis , las **formas benignas** asociadas al cisticerco **quístico o vesicular** excepto cuando obstruyen las cavidades ventriculares del cerebro ; las **formas intermedias** y **racemosas** se encuentran en la

neurocisticercosis meningobasales , en éste caso se da una progresiva reacción inflamatoria por el contacto del parásito con las meninges con obstrucción del LCR e hipertensión endocraneana . Es frecuente encontrar parásitos en diferentes estadios en el mismo paciente (estadio coloidal, granular y calcificado) , sin embargo no se sabe si esto se debe a la presencia de infecciones recurrentes o a una sola infección en la que solamente algunos parásitos evaden la respuesta inmune mientras que otros son atacados intensamente (Figura 5).

Los cisticercos se comportan como pequeños tumores provocando daño mecánico , se presenta exudado , inflamación , periartritis , la reacción inflamatoria desencadena una serie de cambios en el parénquima cerebral , el espacio subaracnoideo , las cavidades ventriculares y la medula espinal , dicha reacción inflamatoria se encuentra constituida principalmente por linfocitos , células plasmáticas y eosinófilos , se asocia con diversos grados de edema y gliosis reactiva , varía dependiendo del grado de involución de los cisticercos (13).

-Los cisticercos localizados en el espacio subaracnoideo desencadenan una intensa reacción inflamatoria perilesional , con formación de un denso exudado compuesto por fibras colágenas , linfocitos , células gigantes multinucleadas , eosinófilos y membranas parasitarias hialinizadas . Esto condiciona engrosamiento anormal de las leptomeninges en la base del cráneo , el cual puede extenderse desde la región optoquiasmática hasta el agujero magno .

El quiasma óptico y los demás nervios craneales que atraviesan el espacio subaracnoideo se encuentran rodeados por este denso exudado , los agujeros de Luschka y Magendie pueden ocluirse provocando hidrocefalia . Los vasos sanguíneos que forman el polígono de Willis también se afectan por éste reacción y las paredes de las pequeñas

arterias son invadidas por células inflamatorias , lo cual induce el desarrollo de endarteritis proliferativa con oclusión de la luz arterial .

-Los cisticercos ventriculares desencadenan una reacción inflamatoria localizada si se encuentran adheridos a los plexos coroideos o a la pared ventricular , las células ependimarias protruyen hacia el interior de las cavidades ventriculares y pueden bloquear la normal circulación de LCR a nivel del acueducto de Silvio o de los agujeros de Monro . Este proceso que suele acompañarse de hidrocefalia es denominado ependimitis granular .

-Los cisticercos espinales también pueden desencadenar cambios inflamatorios y desmielinizantes a nivel de las raíces nerviosas ventrales y dorsales al igual que los cisticercos intracraneales lo hacen con los nervios craneales . Los cambios que se producen en el parénquima medular son similares a los descritos en el parénquima cerebral (13).

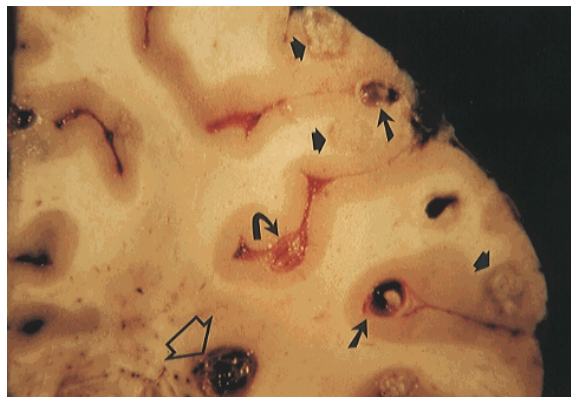


Fig 5. Aspecto macroscópico de cisticercos parenquimatosos en diversos estadios evolutivos: quistes vesiculares (flecha recta), quistes coloidales (flecha curva), granulomas (cabeza de flecha) y calcificaciones (flecha abierta).

FUENTE : Del Brutto OH, Sotelo J, Román GC: Neurocysticercosis: a clinical handbook, Lisse, Swets & Zeitlinger, 1998

6 . MANIFESTACIONES CLINICAS EN CISTICERCOSIS.

Las manifestaciones clínicas se enfocan principalmente a nivel SNC dado que la neurocisticercosis es la patología de mayor gravedad causada ; debido a las diferencias individuales en el número y localización del parásito es que el tiempo promedio para la aparición de los síntomas después de la infección en los pacientes es de 7 años y puede llegar hasta los 20 años (14).

La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente se presenta particularmente en pacientes con compromiso de parenquima cerebral , también se da la presencia de crisis convulsivas de inicio reciente en sujetos mayores de 25 años (epilepsia de inicio tardío) es sugestiva de neurocisticercosis .

Se presentan variedad de signos neurológicos focales , particularmente en pacientes con quistes localizados en áreas cerebrales elocuentes , los signos más frecuentes son : déficit motor , signos de liberación piramidal , ataxia cerebelosa , signos de disfunción de tallo cerebral y movimientos involuntarios . Estas manifestaciones siguen un curso progresivo por lo que es difícil el diagnóstico diferencial con neoplasias o con otros procesos infecciosos del sistema nervioso , en algunos casos los signos focales aparecen súbitamente especialmente si están relacionados con infartos cerebrales secundarios a angeitis cisticercosa (14).

Se presenta hipertensión endocraneal que puede o no asociarse con crisis convulsivas con signos focales o con alteraciones mentales , la causa más frecuente de éste síndrome es la hidrocefalia la cual puede ser secundaria a la presencia de quistes ventriculares , aracnoiditis cisticercosa o ependimitis granular . Generalmente la hipertensión endocraneana sigue un curso lentamente progresivo , que se interrumpe por episodios súbitos de pérdida de conciencia, relacionados con movimientos de la cabeza (síndrome de Bruns) , cuando el cisticerco causal está ubicado en el IV ventrículo (14).

La hipertensión endocraneal puede estar asociada a neurocisticercosis por quistes subaracnoideos gigantes y encefalitis cisticercosa , esta última es grave se da como consecuencia de la infección masiva de cisticercos al parénquima cerebral con la subsecuente reacción inflamatoria , ésta patología es más frecuente en niños y mujeres jóvenes y se caracteriza deterioro de conciencia , crisis convulsivas , disminución de agudeza visual , cefálea , vómitos y papiledema (13) . La neurocisticercosis espinal tiene manifestaciones clínicas inespecíficas , la aracnoiditis se manifiesta por dolor radicular asociado con debilidad muscular, que sigue un patrón de distribución de múltiples raíces nerviosas.

Las principales manifestaciones clínicas son:

Neurocisticercosis :

- . Epilepsia , cefalea , e hipertensión intracraneal.
- . Síndrome sicótico : manifestaciones de tipo esquizofrénico o paranoide , deterioro mental , pérdida de la memoria , confusión o neurosis.
- . Síndrome meníngeo: meningitis aséptica, aumento de las proteínas y eosinofilos en el LCR.
- . Síndrome de Pares Craneanos: afecta pares óptico , oculomotores y auditivo
- . Síndrome Medular: cambios motores y sensitivos en las extremidades inferiores y finalmente parálisis y los pacientes pueden tener bloqueo total o parcial del LCR .

Cisticercosis subcutánea y muscular:

- . Los cisticercos en músculos y tejidos pasan desapercibidos aunque es posible que se produzca pseudohipertrofia muscular cuando su número es importante. Se diagnostica por biopsias.

Oftalmocisticercosis:

. Disminución o pérdida de la capacidad visual, identificándose el cisticerco en el humor vítreo , retina , conjuntiva , cama anterior y orbita . El tratamiento básico consiste en la extirpación y el empleo de láser (14).

7. RESPUESTA INMUNE

7.1. INMUNIDAD HUMORAL FRENTE A LOS HELMINTOS .

Los anticuerpos convencionales de los isotipos IgM, IgG e IgA son los que se producen en respuesta a los antígenos de los helmintos, el isotipo de inmunoglobulinas que participa con mayor intensidad en la resistencia a los helmintos es IgE. Los antígenos de los helmintos favorecen la activación de las células Th2. La combinación de los antígenos de los helmintos con la IgE unida a las células cebadas hacen que estas últimas se degranulen y que liberen agentes vasoactivos. Estos compuestos estimulan la contracción del músculo liso, y aumentan la permeabilidad vascular. Así, en la reacción autocurativa, se producen contracciones violentas de la musculatura intestinal y aumenta la permeabilidad de los capilares de dicho órgano.

Los macrófagos, plaquetas y eosinófilos tienen CD23 , estas células se pueden unir a parásitos cubiertos por IgE. Una vez que se unen, estas células son activadas. Por ejemplo, los macrófagos que se unen a las larvas de helmintos a través de la IgE muestran niveles aumentados de enzimas lisosómicas, y un aumento en la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno, Interleucina I , leucotrienos , factor activador plaquetario y prostaglandinas. El efecto neto es un aumento de la destrucción de parásitos (Tizard 1998) (15).

7.2. INMUNIDAD CELULAR FRENTE A LOS HELMINTOS .

Son muchos los helmintos que desde el punto de vista funcional podrían considerarse xenoinjertos, en especial los que emigran a través de los tejidos. Cabe destacar, sin embargo, que no son rechazados con gran rapidez por el sistema inmunitario mediado por células . En general, los antígenos de los helmintos parecen inducir de manera preferente respuestas de Th2 . Sin embargo pueden darse respuestas de Th1 y en consecuencia , las células T citotóxicas pueden atacar a los helmintos que se adentran mucho en la mucosa intestinal o que pasan por etapas hícticas prolongadas. Los linfocitos sensibilizados deprimen las actividades de los helmintos por dos mecanismos , **primero** desarrollan una reacción inflamatoria del tipo de hipersensibilidad retardada, la cual tiende a atraer a las células mononucleares al lugar de la invasión larvaria, y hace que el ambiente local se vuelva insuficiente para el crecimiento o para la migración. **Segundo**, los linfocitos citotóxicos pueden destruir a las larvas (Tizard 1998) (15).

7.3. RESPUESTA INMUNE EN CISTICERCOSIS

El cisticerco emplea varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir por largos periodos , entre los mecanismos propuestos se pueden mencionar : 1) secreción de antígenos inmunodominantes para desviar a los anticuerpos lejos de la superficie ("cortina de humo") , 2) enmascaramiento de la superficie con moléculas del hospedero, 3) modulación o supresión de la respuesta inmune del hospedero, 4) establecimiento del parásito en hospederos inmunosuprimidos y 5) alojamiento en lugares inmunológicamente privilegiados , como el sistema nervioso (9).

En la cisticercosis humana , la respuesta humoral es principalmente mediado por IgG sugiriendo una parasitosis de largo tiempo , esta inmunoglobulina es predominante entre los anticuerpos anti-cisticerco , los cisticercos presentan abundante IgG del hospedero asociada a su superficie,

hay evidencia respecto a la síntesis local de IgG específicos en el cerebro , sin embargo estas moléculas tampoco se relacionan con el daño , en los cisticercos hay anticuerpos humanos contra el glicocálix , componentes del citoplasma de los citones tegumentales , antígenos del estroma y del sistema ductural, pero no se ha encontrado anticuerpos contra el tegumento del canal espiral ,ni del músculo de las ventosas del escólex (16).

En la cisticercosis meníngea , una de las formas relativamente benignas de la enfermedad la reacción inflamatoria es en general escasa y el infiltrado está compuesto por linfocitos , células plasmáticas y epitelioides , pocas veces células gigantes y rara vez se observan eosinófilos. En contraste en el caso de la cisticercosis meníngea cisternal una de las formas más graves , la reacción inflamatoria está constituida por numerosas células inflamatorias entre las que se identifican linfocitos , células plasmáticas , algunos cuerpos de Russell , células epitelioides , numerosas células gigantes , pocos son polimorfonucleares y eosinófilos . En el infiltrado celular de la cisticercosis humana casi no hay eosinófilos , lo cual ha sido explicado por el hecho de que la eosinofilia es un fenómeno temprano (17).

Debido a la cronicidad de la cisticercosis , es que la respuesta humoral es heterogenea por las Inmunoglobulinas IgA e IgM encontradas en el suero y líquido cefalorraquídeo y los antígenos diferentes que son reconocidos por ellos , los anticuerpos IgE no han sido encontrados aunque niveles séricos de IgE no específicos están elevados . La presencia de alguna clase de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo o el suero y la ausencia en otros fluidos del mismo paciente, sugiere que la barrera de sangre del cerebro no es dañado por el parásito en muchos casos , esto es importante para la sobrevivencia del parásito, porque esos alojados en "sitios inmunológicamente privilegiados" como el ojo o el sistema nervioso central, podrían sobrevivir mucho más tiempo que los localizados en tejidos sistémicos como los músculos (15).

El patrón de respuesta celular demuestra que en los pacientes con neurocisticercosis la tasa de CD 4+ / CD 8+ no es significativamente diferente, siendo la cisticercosis una infección de largo plazo en la mayoría de casos se da una respuesta proliferativa por las células del tipo Th2, que estaría más relacionado a la sobrevivencia del parásito. El rol del balance del perfil Th1/Th2 (Linfocitos T Helper 1/ linfocitos T Helper 2) sobre la resolución de la infección no es claro en la enfermedad de humanos. Una respuesta Th1 destructiva/ Th2 permisiva ha sido reportado, pero en la búsqueda directa de citocinas Ostrosky- Zeichner et al. encontraron incrementado los niveles de IL-1 e IL-6 en el líquido cefaloraquídeo de pacientes con Neurocisticercosis inflamatoria. Ellos encontraron que la IL-5 está incrementado; La IL-2 estaba presente en 58% de los casos, mientras IFN gamma, IL-4 e IL-10 fue encontrado en 11%, 10% y 14% de los casos respectivamente (15).

La reacción que destruye el parásito en humanos y cerdos es mediado por una granulomatosis, inflamación rica en eosinófilos, seguido por una resolución conducido por linfocitos y macrófagos, probablemente suscitado por Th2 y luego por una respuesta celular, los cisticercos están rodeados por eosinófilos que están especialmente cercanos a la superficie del tegumento. Los productos de secreción y excreción de cisticercos viables de *Taenia solium* matan eosinófilos pero no a macrófagos in vitro. Sugeriendo que el parásito vivo ejerce una acción antieosinófilos que incluiría la supresión de una respuesta celular de Th2 y no de Th1. En conclusión durante la tercera fase muy tardía de la interacción inmune cisticercos-hospedero se esperaría primero un cambio a Th2 IL-4/ IL-5, para atraer eosinófilos y destruir al metacéstode. Esto podría estar seguido por una inmunidad concomitante con activación de macrófagos por una respuesta tipo Th1 (15).

El cisticerco se instala dentro del cerebro, médula espinal y ojo, todos aquellos que pueden ser considerados "sitios inmunológicamente privilegiados", el sistema nervioso central difiere de otros tejidos, por la presencia de la barrera sanguínea cerebral que previene la recirculación linfocitaria convencional; La expresión inducible más que constitutiva de moléculas de MHC clase I y II; y la presencia de células especializadas que ejecutan funciones inmunológicas efectoras. Esas características pueden explicar la única interacción entre el sistema nervioso central y el inmune y la resistencia del parénquima cerebral a la diapédesis de leucocitos. Por la firme encapsulación fibrosa que rodea al cisticerco, particularmente en tejidos no neurológicos, imposibilita formar una barrera física o inmunidad, hasta que factores humorales ganan acceso a los fluidos internos del cisticerco y el desafío quimioterápico o muerte de cisticerco es seguido por inmediata infiltración intensa de células inflamatorias (15).

8. TRATAMIENTO

La caracterización precisa de la enfermedad, en lo que respecta a viabilidad de los quistes , la intensidad de la respuesta inflamatoria del hospedero y la ubicación de las lesiones, es de fundamental importancia , son cruciales para el establecimiento de una terapia adecuada para la neurocisticercosis.

8.1. DROGAS CESTOCIDAS.

Tanto el praziquantel como el albendazol son potentes drogas cestocidas. El **praziquantel** es una isoquinolina que ha sido utilizada para el tratamiento de la neurocisticercosis humana. Estudios posteriores demostraron que el praziquantel condiciona la desaparición del 60% a 70% de los cisticercos parenquimatosos luego de un curso de 15 días de tratamiento a dosis de 50 mg/kg/día . El **albendazol** es un imidazol con potente efecto cestocida , inicialmente se utilizó en dosis de 15 mg/kg/día por 30 días; sin embargo la

duración del tratamiento puede ser reducida a 8 días con iguales resultados. El albendazol destruye el 75% a 90% de cisticercos parenquimatosos y ha probado ser superior al praziquantel según diversos estudios comparativos, no solo por su mejor porcentaje de destrucción de quistes parenquimatosos sino por su capacidad de destruir quistes subaracnoideos y por su menor costo, un aspecto importante ya que la cisticercosis usualmente afecta a gente de bajos recursos económicos (18).

Para considerar la opción de realizar tratamiento cestocida , se debe establecer si los quistes son únicos o múltiples , si son viables , si están en proceso de degeneración o son calcificados ; por su ubicación estableceremos si son quistes parenquimatosos , subaracnoideos , intraventriculares y por último la reacción inflamatoria y vasculitis presentes . Los **quistes viables únicos o múltiples** deben ser sometidos a tratamiento cestocida , excepto que por su exagerado tamaño y accesibilidad puedan ser candidatos a tratamiento quirúrgico . **Quistes calcificados o en proceso de degeneración** se espera a que se inactiven en hasta doce semanas y no requieren tratamiento. Aquellos **quistes plenamente parenquimatosos** deben ser tratados. Los **quistes subaracnoideos e intraventriculares** deben ser sometidos a cirugía , rara vez a tratamiento cestocida de inicio , pero sí se recomienda éste luego de la cirugía , sobre todo en la derivación ventricular .En los pacientes que cursan con encefalitis y angitis cisticercólicas y quienes cursan con aracnoiditis se recomienda el uso de dexametasona y diuréticos osmóticos.(19).

8.2. TRATAMIENTO SINTOMÁTICO.

Las drogas antiepilépticas son utilizadas en un gran número de enfermos con neurocisticercosis. En pacientes con epilepsia secundaria a calcificaciones , la administración de una droga antiepiléptica de primera línea (carbamazepina, fenitoína o fenobarbital) usualmente produce un control adecuado de las crisis. Los pacientes con quistes viables deben

recibir primero un curso de tratamiento con drogas cestocidas para lograr un control posterior de crisis con drogas antiepilépticas. Recientemente se ha demostrado que la administración de praziquantel disminuye los niveles séricos de fenitoína y carbamazepina, hecho que puede condicionar descontrol de crisis convulsivas en pacientes con neurocisticercosis tratados con praziquantel . No hay estudios similares con el albendazol . Los corticosteroides son drogas frecuentemente utilizadas en pacientes con neurocisticercosis. Como el uso de dexametasona (24-32 mg/día) para reducir el edema cerebral que acompaña a encefalitis cisticercosa junto a diuréticos osmóticos (manitol, 2 mg/kg/día) para lograr un adecuado control de síntomas (18).

9. METODOS DE CONTROL DE CISTICERCOSIS.

La OMS en la XII Reunión Interamericana instauró un Programa de Vigilancia y Control , priorizándose actividades de educación a la comunidad, capacitación de personal de salud interinstitucional , desparasitación a grupos de población de áreas identificadas como de mayor riesgo , desarrollar campañas educativas orientadas a la población productora y consumidora, vendedoras de los mercados y personas que se encargan del sacrificio legal o ilegal de cerdos, sobre todo a nivel domiciliario, tomando en consideración que el universo de población que se dedica a esta forma de negocio es muy alta, debido a la facilidad con que se puede ejercer esta actividad, por la situación económica y desempleo que impacta en la sociedad. (20)

Para controlar la cisticercosis se pueden emplear los siguientes medios:

.- Tratamiento notificación y vigilancia de los casos : Desde un punto de vista clínico, las personas con neurocisticercosis suelen presentar síntomas neurológicos inespecíficos como la epilepsia, para los que debería existir en los sistemas de salud un tratamiento de casos adecuado, para practicar un diagnóstico diferencial y rápido en centros de atención sanitaria periféricas en

áreas con pocos recursos así como el tratamiento y derivación al siguiente nivel asistencial.

.- Identificación y tratamiento de individuos que son fuente directa de contagio : Personas portadoras de tenias adultas y de sus contactos cercanos, educación en materia de higiene y la mejora del saneamiento interrumpirán o reducirán el ciclo de transición directa entre personas.

.- El tratamiento universal o selectivo con praziquantel (10 mg/kg de masa corporal) ha reducido de manera significativa la prevalencia de la teniasis humana en áreas con parasitismo endémico por *T. solium*, el tratamiento debe ir acompañado de **medidas veterinarias**, como la mejora de la inspección y el control de la carne, la mejora de la cría de cerdos y de su inspección, y el tratamiento de los animales infestados.

.- Entre las medidas complementarias para prolongar los efectos de los programas específicos están: **la provisión de agua limpia y de saneamiento, y la educación sanitaria** acerca de la transmisión de los parásitos y de la manera de mejorar los hábitos de higiene y las condiciones sanitarias de personas y animales (1)

.- Para los cuidadores del ganado : educación y conocimiento sobre el ciclo de vida del parásito, mantenimiento del ganado en un lugar adecuado, evitar el contacto de los animales con basura humana.

.- Para las municipalidades : Los métodos de control en los mercados deben complementarse y fortalecerse , introducir medidas estrictas especialmente en los sacrificios de los animales en las granjas familiares , aplicar medidas de saneamiento para evitar el uso de aguas contaminadas provenientes de la ciudad para regar lo cultivado hecho común en las zonas aledañas de la ciudad de La Paz (21).

10 . DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS.

10.1.HEMOGRAMA.

Constituye un examen de control según el cual se pueden observar las siguientes características en el frotis sanguíneo: debido a que el parásito se aloja dentro del Sistema Nervioso Central ocasiona quistes parasitarios, granulomas, calcificaciones, cambios del tamaño y la morfología de cavidades ventriculares, edema alrededor de los quistes, infartos cerebrales, quistes intraventriculares y combinaciones de estas; observándose de esta manera en el microscopio lo siguiente: proliferación de eosinófilos y macrófagos, que empiezan o inician el ataque contra el parásito, y células típicas de reacciones granulomatosas como células gigantes multinucleadas y epiteloides. Además se observan linfocitos y células plasmáticas en tejidos más alejados. (18).

10.2. ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN

Tanto la TAC (Tomografía Axial Computarizada) como la RM (Resonancia magnética) facilitan el diagnóstico de la neurocisticercosis ya que permiten visualizar el número y localización de los parásitos así como su estadio evolutivo , los hallazgos de TAC y RM en la neurocisticercosis parenquimatosa dependen del grado de viabilidad de los cisticercos. De estos hallazgos, los más característicos son las lesiones quísticas bien definidas en las que es posible identificar el scolex en su interior y las calcificaciones puntiformes múltiples. Las lesiones anulares (únicas o múltiples) no son específicas y representan un problema diagnóstico. Diversas entidades, incluyendo abscesos cerebrales, tuberculomas y neoplasias primarias o secundarias del sistema nervioso pueden cursar con lesiones similares en TAC o RM.

La TAC y la RM en pacientes con neurocisticercosis meníngea suelen revelar hidrocefalia, captación anormal del contraste en las leptomeninges basales, quistes subaracnoideos e infartos cerebrales. Con excepción de las lesiones quísticas, la mayoría de los hallazgos de neuroimagen en la neurocisticercosis meníngea no son específicos y pueden observarse en otro tipo de infecciones del sistema nervioso. Los cisticercos ventriculares se visualizan como lesiones quísticas que distorsionan el sistema ventricular y producen hidrocefalia asimétrica. Estos quistes suelen ser isodensos con el LCR y no se aprecian bien con TAC, por lo que suele ser necesaria la administración de medio de contraste intratecal para confirmar el diagnóstico. La RM permite una mejor visualización de estas lesiones ya que el escolex puede ser identificado .

La RM es mejor que la TAC para el diagnóstico de la cisticercosis, especialmente en pacientes con lesiones quísticas en la base del cráneo, tallo cerebral, cavidades ventriculares y médula espinal. Sin embargo, una limitación importante de la RM es su mala resolución para detectar pequeñas calcificaciones parenquimatosas. Debido a que muchos pacientes con epilepsia y neurocisticercosis presentan calcificaciones como única evidencia de la enfermedad, la práctica exclusiva del RM puede condicionar errores diagnósticos. La TAC es el método de imagen de elección para el estudio de pacientes con probable neurocisticercosis, la RM debe reservarse para aquellos casos con TAC normal o en los que el aspecto tomográfico de las lesiones no sea concluyente. (18)

10.3. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS.

Son pruebas destinadas a la detección de anticuerpos anticisticercos en sangre, saliva y LCR, entre las que destacan la reacción de fijación de complemento, el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y el inmunoblot , la positividad de dichas pruebas se relaciona directamente con la viabilidad y la localización de los cisticercos .(18)

Después del uso por décadas de la reacción de Weimberg y de la inmunolectroforesis de antígenos crudo total, preparados a partir de las larvas, como pruebas orientadoras de la sospecha clínica, el ELISA los sustituyó con sensibilidad y especificidad muy altas. ELISA muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos de inmunodiagnóstico más usados actualmente para detectar cisticercosis. (22)

10.3.1. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).

La técnica inmunoenzimática forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan trazadores para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. El ELISA, se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro. (23)



*Fig 6 . Existen bastantes KITS comerciales disponibles y por tanto pueden realizarse estudios serológicos sin necesidad de grandes medios .
FUENTE : Dr.Sanchez Viscaíno J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina [http: //www.inia.es/ciex/inicio.htm](http://www.inia.es/ciex/inicio.htm)*

Actualmente el ELISA es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico serológico de distintas enfermedades infecciosas, es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en poco tiempo estudios sobre grandes poblaciones de manera sencilla y económica, presenta además buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados. (23) Se han adaptado varios tipos del método ELISA tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos:

10.3.1.1. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "Sandwich". La placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá la muestra (suero), que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción.(24)



Fig 7. Fases de la técnica Elisa Sandwich. (1) Un anticuerpo monoclonal o policlonal anti antígeno suele estar ya unido a la placa. (2) se incuba con la muestra problema. (3) se añade el conjugado. (4) por último el sustrato. Todos los pasos van precedidos de incubaciones y lavados.

FUENTE : Dr.Sanchez Viscaíno J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina . <http://www.inia.es/ciex/inicio.htm>

10.3.1.2. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS

Para la determinación de anticuerpos específicos frente a un determinado antígeno se utilizan normalmente las siguientes modalidades del método ELISA:

- ELISA DE COMPETICIÓN.
- ELISA INDIRECTO.

a. ELISA DE COMPETICIÓN.

Este sistema es muy utilizado para la detección de anticuerpos específicos. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compite con él. Los pasos siguientes es la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura (23).

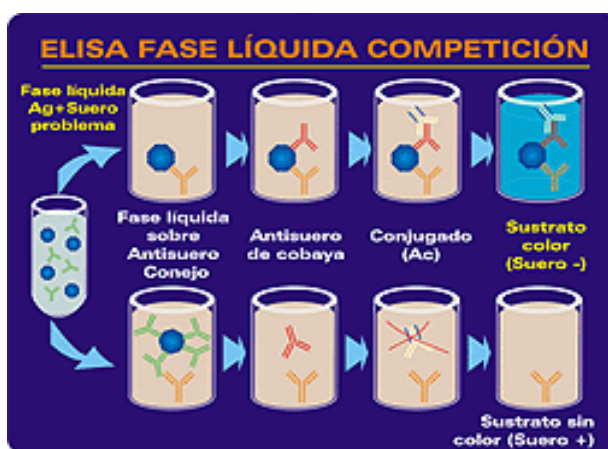


Fig 8. Fases de la Técnica Elisa de competición. (1) Se incuba el suero problema con el antígeno. (2) La mezcla anterior se deposita sobre los pocillos donde previamente se ha fijado un suero anti antígeno (3) se añade el conjugado. (4) después, el sustrato. En este caso la ausencia de color sería positivo.

FUENTE : Dr.Sanchez Viscaíno J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina . <http://www.inia.es/ciex/inicio.htm>

b. ELISA INDIRECTO

Método utilizado para la determinación de anticuerpos , consiste en la inmovilización a la placa de ELISA del antígeno (en los Kits ya viene fijado) del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales , bacterianas o de parásitos , incluso virus completos ; es mucho mejor utilizar exclusivamente las proteínas de interés inmunológico y no todas las proteínas antigénicas. Los pasos siguientes son la adición del suero problema, incubación y lavado, adición del conjugado, incubación y lavado, finalizando con la adición del sustrato, el frenado de la reacción y la lectura (23).



Fig 9. Fase de la técnica Elisa indirecto. (1) El antígeno se pega a la placa (2) Se añade el suero problema. (3) posteriormente, el conjugado. (4) y por último, el sustrato.

FUENTE : Dr.Sanchez Viscaíno J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina . <http://www.inia.es/ciiex/inicio.htm>

10.3.2. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS- PAGE).

Electroforesis es la migración de moléculas cargadas en solución como respuesta a la presencia de un campo eléctrico . La electroforesis es ampliamente usada para estudiar propiedades de especies cargadas en solución , y como una técnica de separación , este es un método de fraccionamiento y determinación del peso molecular de estructuras proteicas,es una técnica reconocida por su alta sensibilidad y como herramienta analítica , la electroforesis es rápida , sensible y simple. La velocidad de migración depende principalmente de la fuerza del campo, de la carga, forma , masa y tamaño de la molécula , así como de la fuerza iónica , viscosidad y temperatura del medio en el que las moléculas se estén moviendo (25).

10.3.2.1. MATRICES DE SOPORTE

Generalmente la muestra es corrida en matrices como papel , acetato de celulosa , geles de almidón , agarosa o poliacrilamida . La matriz inhibe la difusión osmótica , así como el mezclado producido por convección térmica , además provee un registro del proceso electroforético ya que puede marcarse y usarse para mediciones, autoradiografía o almacenamiento . Las matrices de soporte más ampliamente usadas (agarosa y poliacrilamida) proveen además, un medio para separar moléculas por tamaño, ya que son geles porosos y pueden actuar como tamices moleculares . (26)

10.3.2.2. GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se obtiene polimerizando monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) en cadenas largas y entrecruzándolas con un compuesto bifuncional como $\text{N}, \text{N}' -$

metilenbisacrilamida ($(\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2))_2$), usualmente llamada bisacrilamida). La polimerización es iniciada mediante la adición de persulfato de amonio o riboflavina, y se usa N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina (TEMED) como acelerador del proceso de polimerización. Ambos iniciadores de polimerización generan radicales libres, el persulfato de amonio espontáneamente en solución (enlace peróxido), y la riboflavina mediante foto descomposición. El tamaño de poro efectivo de los geles de poli(acrilamida) depende inversamente de la concentración de acrilamida, y se usan geles con concentraciones de acrilamida desde 2.5% (moléculas con peso mayor de 10^6 Da) hasta 30% (polipéptidos con peso de ~ 2000 Da). Para una concentración de monómero dada, las propiedades del gel varían con la proporción de agente entrecruzador usado, al aumentar éste el tamaño de poro decrece, alcanzando un mínimo cuando representa un 5% de la cantidad total de monómero. (27)

10.3.2.3. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas son compuestos anfotéricos (poseen carga positiva y negativa), su carga neta está determinada por el pH del medio en el que están suspendidas. En una solución con un pH por encima de su punto isoeléctrico, una proteína tiene una carga neta negativa y en un campo eléctrico migra hacia el ánodo, mientras que migrará hacia el cátodo a pHs por debajo de su punto isoeléctrico. La carga presente en una proteína es independiente de su tamaño y varía de una proteína a otra, por lo tanto, la separación electroforética de proteínas bajo condiciones no desnaturizantes se realiza en virtud de su carga y tamaño. (26).

En la separación de proteínas bajo condiciones desnaturizantes se utiliza el dodecil sulfato de sodio (SDS) detergente aniónico que desnaturiza proteínas “envolviendo” el esqueleto polipeptídico; la unión SDS-proteína es a una relación de masas 4:1. El SDS confiere carga negativa al polipéptido en relación a su longitud, usualmente se

debe reducir los puentes disulfuro de las proteínas para permitir la unión cuantitativa del SDS , esto se lleva a cabo en caliente con 2-mercaptoetanol . En la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) , la migración está determinada por el peso molecular del polipéptido y no por la carga eléctrica. (25)

10.3.2.4. SISTEMAS DE BUFFER CONTINUOS Y DISCONTINUOS

Un sistema continuo tiene un gel de separación sencillo y usa el mismo buffer en los tanques y en el gel , en un sistema discontinuo, un gel de poro grande y no restrictivo , llamado gel de apiñamiento, es colocado en la parte superior del gel de separación o también llamado gel de resolución . Cada gel está hecho con un buffer diferente, y el buffer de los tanques es diferente al de los geles (26).

La mayor ventaja de los sistemas de buffer discontinuos sobre los continuos es que pueden agregarse volúmenes relativamente grandes de muestras de proteína diluída a los geles sin comprometer la resolución, esto se debe a que las proteínas son concentradas en zonas extremadamente estrechas durante su migración en el gel de apiñamiento. La resolución alcanzada con un sistema discontinuo es muy superior a la obtenida con sistema continuo (27).

10.3.2.5. pH

Los límites prácticos de pH para realizar la corrida en geles de poliacrilamida (PAGE) están entre pH 3 y 10 , ya que algunas reacciones hidrolíticas (como desaminación) ocurren a pH extremos . La elección del pH para PAGE depende de dos consideraciones : a pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas a separar , la diferencia de carga entre ellas es grande , aumentando la posibilidad de separación, sin embargo al ser pequeña la carga , los tiempos de corrido

son largos , llevando a un aumento en el ensanchamiento de banda . En SDS-PAGE los complejos polipéptido-SDS están negativamente cargados en un rango amplio de pH, por lo tanto el pH no es crítico (26).

10.3.2.6. MARCAJE DE LAS BANDAS

Las bandas pueden ser evidenciadas mediante tinción con colorantes, revelado “fotográfico”, autorradiografía o con marcaje fluorescente . En la tinción con colorantes se utilizan : Negro Amido , Fast Green o Azul de Coomassie cuyas soluciones son aptas para la tinción de proteínas , sus límites de resolución son 1 ug de proteína por banda . La resolución disminuye cuando la proteína no es adecuadamente fijada , especialmente en aquellas de bajo peso molecular , entonces se utiliza ácido tricloro acético , ácido sulfosalicílico . El Azul de Coomassie , forma uniones electrostáticas con grupos NH₂ y uniones no covalentes con regiones no polares de las proteínas , este colorante es usado en ácido acético y metanol , detectando bandas de 0,1 ug de proteínas aproximadamente (28).

III. ANTECEDENTES.

La cisticercosis se manifiesta cuando los cisticercos después de ser ingeridos , por acción de los jugos gástricos evaginan y atraviesan la pared estomacal y se diseminan a los diferentes órganos del cuerpo. La significación patológica varía de acuerdo a la ubicación , siendo la de mayor relevancia a nivel del sistema nervioso central (neurocisticercosis) por los graves daños que causa debido al número de cisticercos que pueden alojarse, el tamaño que estos pueden adquirir, las reacciones que estas pueden ocasionar, o su ubicación en estructuras vitalmente sensibles de la masa cerebral pudiendo ser mortal, representa una de las parasitosis mas frecuentes del sistema nervioso, su diagnostico se basa en datos clínicos, de imagen y de laboratorio entre los cuales destacan los basados en pruebas inmunológicas , el ELISA muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos de inmunodiagnóstico más usados actualmente para detectar cisticercosis (22).

En el año 1988 se llevo a cabo un estudio realizado por Naomi Iihoshi en el Instituto de INLASA (Instituto nacional de Laboratorios en Salud) en el cual se estandarizó una técnica de inmunodiagnóstico para cisticercosis en base a antígeno soluble de *Cisticercus cellulosae* validado para prueba indirecta de ELISA, preparado según la técnica de E. Coltorti , se trabajó con líquido vesicular y cisticercos sin líquido vesicular en número de 100 obtenidos de carne fresca, homogeneizados con 10ml de H₂O destilada, esta preparación se isotonizó con 2ml de PBS 6 veces concentrado , luego se sometió a la acción del desmembrador sónico y después fue centrifugado , el sobrenadante (8ml) fue separado para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry que dio 4700ug/ml .

El procedimiento de la técnica de ELISA indirecta fue el siguiente : se fijo el antígeno a la fase sólida a concentración 25ug/ml en tampón carbonato pH 9,6 y se colocó 100 ul en cada pocito , se realizaron diluciones seriadas de los sueros problema (1/64; 1/256 ; 1/1024 ; 1/4096) con la solución de PBS pH 7,4 y Tween 20 al 0,5% . Se prepararon diluciones mínimas para el suero control negativo 1/64 ; 1/256 , y dilución del suero control positivo 1/1024 , se colocó 100 ul de dilución de suero a cada pocito .

El conjugado de anti Ig humana (anti Ig G,A,M) con POD fue diluido utilizando como solvente PBS pH 7,4 luego se añadió 100ul de éste a cada pozo , la revelación enzimática se realizo con tampón cítrico pH 3,5 y solución madre de ABTS 0,5 M se detuvo la reacción enzimática con ácido fluorhídrico 0,1M , se realizaron las lecturas en lector ELISA a 405nm en matrix a rango 0,2 y en DO . Se estandarizó la técnica con sueros positivos y negativos de pacientes con cisticercosis, antes confirmada por otras técnicas de inmunodiagnóstico como IFI (Inmunofluorescencia Indirecta), y HAI (Hemoaglutinación Indirecta), y también realizada la TAC , biopsias y autopsias ; la positividad o negatividad de cada suero, fue titulado por medio de 8 diluciones sucesivas (1/32 a 1/4096), la prueba se realizo por repetición para obtener un título con mayor exactitud . Confirmados los títulos de las muestras se seleccionó una muestra positiva (dilución 1/512 con suero negativo) y una negativa como controles.

La interpretación de las lecturas del micrométodo fue según criterio de E,Coltorti , la dilución que se tomó como límite de reactividad y no reactividad fue de 1/256 , si la lectura de un suero daba título 1/256 la interpretación era compatible , las diluciones superiores a ésta fueron consideradas como reactivas y las lecturas o diluciones inferiores como no reactivas .

Se validó la técnica trabajando con 243 muestras, para la determinación de anticuerpos anticisticercosis , se encontraron 18 muestras reactivas con títulos significativo para cisticercosis (17 con título 1/512 y 1 con título 1/1024), también se encontraron 41 sueros con título compatible (título 1/256), la frecuencia de cisticercosis fue 7,4% (reactivos), 16.87% de casos compatibles, estos resultados demostraron la base fundamental para plantear el desarrollo de este tema, ya que demostró la magnitud del problema y necesidad de establecer un sistema de vigilancia epidemiológica ,de control y tratamiento (29).

Otro estudio fue realizado por Roxana Carrasco en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), de la ciudad de La Paz 1990, en el cual se compararon 3 pruebas aplicadas al diagnóstico de neurocisticercosis: ELISA, (Ensayo Inmunoenzimático), IF (Inmunofluorescencia),y HAI (Hemoaglutinación Indirecta).

El antígeno soluble (extracto salino total) fue obtenido según J.M.Costa para la técnica de ELISA se trabajó con *Cisticercus cellulosae* en número de 50 los cuales fueron resuspendidos en 5ml de H₂O destilada y homogeneizados a 4°C, ultrasonificados a 40Khz por 4 periodos de 30seg, isotonzados con 5ml de solución de ClNa 1,7% y finalmente centrifugados, el sobrenadante obtenido constituyó el antígeno salino donde se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, correspondiente a 4,7 mg/ml (4700ug/ml) (30).

La técnica de ELISA se realizó según Arambulo, se utilizaron placas de poliestireno sensibilizadas con 0,2ml (200ul) de antígeno soluble a una concentración de 20ug/ml en tampón carbonato – bicarbonato pH 9,6 se colocaron 0,2ml de sueros a cada pocito, suero control (+) (proveniente de un paciente con NCC comprobada por clínica y laboratorio, con título 1/160 para ELISA), suero control(-) (proveniente de una persona sana que dio no reactivo a ELISA, IFI, HAP para cisticercosis), los sueros problema diluciones 1/20;1/40;1/80....1/640 con tampón PBS pH 7,2 Tween20; conjugado anti IgG humana marcada a la peroxidasa a título de 1/5000 volumen de 0,2ml a cada pozo, se reveló la reacción por adición de 0,2ml de sustrato constituido por 0,005% de H₂O₂ y 0,008% de ácido 5 amino salicílico. Se detuvo la reacción con NaOH 0,1 N. Las lecturas se hicieron en lector ELISA a longitud de onda de 410nm.

Durante la estandarización de la técnica se determinó la concentración adecuada de antígeno, realizando diluciones del mismo a diferentes concentraciones 5; 10; 20; y 40 ug/ml, siendo seleccionada la concentración 20ug/ml ya que permitió apreciar mejor la positividad y negatividad de las muestras, se hicieron diluciones seriadas del suero control (+) (1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320; 1/640; 1/1280), tres diluciones mínimas del suero control (-) (1/20; 1/40; 1/80). Se determinó el título significativo de las muestras positivas (19) y negativas (78) frente a controles (+) y (-) realizando diluciones en tampón PBS pH 7,2. 1/20; 1/40, 1/80; 1/160; 1/320; 1/640. Siendo interpretado como reactivo (+) para cisticercosis a partir del título 1/20.

Se determinó como valor umbral 0.28 de densidad óptica en suero, para cuya determinación se utilizaron 78 muestras de sueros de individuos aparentemente sanos.

la positividad se consideró a partir de densidades ópticas por encima de 0.30 , títulos iguales o superiores a 1/20 correspondientes a pacientes con la infección comprobada por debajo de este valor se encontraron los controles sanos . La Sensibilidad y Especificidad de la técnica de ELISA fue 89.5% y 100% respectivamente. El extracto salino total del antígeno tuvo el rendimiento esperado, su preparación fue a partir de 50 cisticercos enteros , los resultados mostraron buena correlación entre los títulos de anticuerpos anti cisticercos *cellulosae* detectados por las técnicas de ELISA e IF (30).

En el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) , Flórez AC y Laguado JG el año 2000 desarrollaron un trabajo cuyo objetivo fue comparar el rendimiento técnico de dos pruebas Inmunoenzimáticas para el diagnóstico de cisticercosis, una de ellas comercial ELISA RIDASCREEN y la otra estandarizada en este Instituto .

Se utilizaron 49 muestras positivas y 41 negativas para anticuerpos IgG anti – cisticercos , los resultados fueron analizados respecto a valor predictivo positivo y negativo (VPP y VPN), sensibilidad, especificidad ; al optimizar el punto de corte para la población de estudio el método ajustó a 0.180 unidades de Absorbancia (450 nm), la prueba de ELISA estandarizada en INS dio una sensibilidad de 100% y especificidad 97,6% , con respecto a sensibilidad de 95% , especificidad 66%, VPP 76%, VPN 93% para la técnica RIDASCREEN. En esta evaluación de la técnica RIDASCREEN se concluyó que constituye una alternativa como apoyo diagnóstico y vigilancia epidemiológica, cuyos resultados positivos e indeterminados pueden ser confirmados en el INS mediante la técnica ELISA, teniendo en cuenta que como todas las pruebas inmunológicas son un complemento importante de los estudios de neuroimagen para confirmar o descartar la cisticercosis (31).

El Instituto de Inmunología Clínica en la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela evaluó un extracto antigénico de *Cysticercus cellulosae* en la detección de anticuerpos en pacientes con neurocisticercosis , con el objetivo de seleccionar antígenos inmunorrelevantes para el diagnóstico de la neurocisticercosis por medio de ensayo inmunoenzimático y electroforesis en gel de poliacrilamida para *immunoblotting* . Se utilizaron 30 sueros; 10 de pacientes con NCC confirmada y 20

sin NCC, de los cuales 11 eran de pacientes con otras enfermedades neurológicas y 9 de controles sanos: 3 mezclas de sueros con resultados negativos para ELISA, 4 de pacientes residentes en áreas no endémicas . A partir de quistes de *Cisticercus cellulosae* se obtuvo extracto antigenico total de *C. cellulosae* para lo cual primeramente fueron congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizados y resuspendidos en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 y se desintegro mediante ultrasonido en baño de hielo por 6 períodos de 60 s cada uno con intervalos de 60 s, a una intensidad de 20 Hz, luego fueron centrifugados a 5 000 g por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La Técnica inmunoenzimática (ELISA) se realizó en placas de poliestireno en cada orificio se colocó 1 μg del antígeno , se realizaron diluciones a partir de 1/100 de los sueros , el conjugado usado fue anti-IgG humana-peroxidada en dilución de 1:1 000. La intensidad de color se registró como densidad óptica (DO) en lector ELISA a longitud de onda de 492 nm (32).

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue realizada según Laemmli la cantidad de proteínas que se colocó en el gel preparativo de 45 mm de largo fue de 300 μg . para la separación de proteínas entre un rango de 10 a 200 kDa se prepararon geles en gradiente a una concentración de poliacrilamida de 5 a 20 %. En la corrida electroforética se separaron las siguientes fracciones 13 , 14 ,18 , 21, 24 , 32, 50 y 88 KDa ,en el *immunoblotting* de sueros de pacientes con NCC, las fracciones reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgG presentes en el suero fueron las siguientes : de 18 kDa (42 %), 50 y 13 kDa (29 %) y 88, 32, 24, 21 y 14 kDa (13 %). Simac y otros también encontraron que las proteínas de 13 y 14 kDa de *C. cellulosae* tienen una elevada reactividad inmunogénica con sueros y LCR, las cuales fueron consideradas como marcadores potentes de la cisticercosis cerebral activa. Por otro lado, Feldman y otros encontraron a la fracción de 50 kDa entre la más reconocida por el suero y la saliva de pacientes con NCC . Los resultados de este trabajo reportan la inmunodominancia y la alta especificidad de los péptidos de bajo peso molecular. (32).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La cisticercosis es una de las parasitosis más peligrosas que afecta al hombre, tiene un importante impacto médico-social y económico, especialmente cuando su localización es el sistema nervioso central, Bolivia se encuentra entre los países con alta prevalencia de cisticercosis por ser un país en vías de desarrollo, siendo los departamentos más afectados Chuquisaca, Cochabamba, La Paz, y Tarija. Este problema se acentúa al constituirse la crianza de cerdos una actividad a la que acceden muchas personas de escasos recursos, por ser una tarea sencilla y al alcance de su economía pero lo hacen de manera tradicional y doméstica, carente de apoyo técnico e inspección sanitaria por parte de las alcaldías y en lo que respecta a cría y faenado de cerdos.

La importancia de esta parasitosis radica cuando los cisticercos invaden el cerebro humano (cerebro, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal) causando deterioro y daño en toda su estructura, la repercusión no es comparable con lo que produce cuando se localiza en los músculos, por lo cual es necesario diagnosticarla a tiempo. La sospecha diagnosticada de cisticercosis puede reforzarse con la detección de anticuerpos específicos que indiquen la exposición previa a antígenos de *T. Solium*. por medio de la técnica ELISA, la ausencia de tales anticuerpos tiene un elevado valor predictivo, en cuanto a lesiones neurológicas no-cisticercósicas se refiere.

Para el diagnóstico de cisticercosis se pueden realizar estudios de imágenes, como TAC y RM, en lesiones intraventriculares la utilidad de la TAC es limitada; en estos casos la RMN puede ser más útil, sin embargo una desventaja es su mala resolución para detectar pequeñas calcificaciones además de su elevado costo razón por la cual no es accesible para la mayoría de las personas con esta afección; En base a lo planteado se concluye que es necesario el empleo de pruebas inmunológicas como

complemento para confirmar el diagnóstico de cisticercosis sobre todo si las técnicas de imagen no están disponibles o sus resultados no son concluyentes , en la actualidad en nuestro medio se emplea de modo rutinario para el diagnóstico de cisticercosis la combinación de dos pruebas : TAC y ELISA , considerando que este inmunodiagnóstico tiene la gran ventaja de ser un procedimiento de bajo costo y la presencia de anticuerpos específicos anticisticerco confirman la enfermedad.

V. JUSTIFICACIÓN.

La neurocisticercosis constituye la más importante de las enfermedades neurológicas humanas de origen parasitario y la más frecuente, generando morbilidad considerable, siendo una de las principales causas de epilepsia con graves consecuencias sociales, físicas y psicológicas. El diagnóstico de esta enfermedad es de vital importancia, se basa en la combinación de datos clínicos de imagen y de laboratorio entre los que se destacan los inmunológicos como el ELISA, método empleado con mayor frecuencia en nuestro medio como prueba complementaria .

Se plantea desarrollar una técnica Inmunoenzimática en base a extracto antigénico obtenido y procesado en nuestro laboratorio , con la finalidad de aportar una alternativa diagnóstica cuyos resultados constituyan un complemento para otros exámenes : clínico , de laboratorio como Inmunofluorescencia , exámenes de gabinete electroencefalograma o estudios por imagen como TAC ; por otra parte considerando que al ser estandarizada la prueba en nuestro laboratorio , el costo de la misma será considerablemente menor por lo que llegará a ser de real utilidad y apoyo al diagnóstico en especial para la población de escasos recursos . Además que la preparación del extracto antigénico de *Cisticercus cellulosae* se podrá realizar de manera sencilla y se podrán obtener grandes cantidades de antígeno de cisticerco ya que la obtención de cisticercos de *Taenia solium* están al alcance de nuestros medios debido a que se recolectan a partir tejido muscular de cerdo infectado decomisado por zoonosis .

VI. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

Coadyuvar al diagnóstico de cisticercosis a través del desarrollo de una prueba inmunoenzimática (ELISA) en base a extracto antigénico total de *Cisticercus cellulosae*.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Preparar antígeno salino soluble a partir de cisticercos de *Taenia solium* presente en tejido de cerdo y evaluar el rendimiento.
2. Optimizar la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de cisticercosis utilizando el antígeno preparado.
3. Evaluar la técnica inmunoenzimática optimizada (ELISA) mediante la determinación de Sensibilidad y Especificidad , relacionando resultados con tomografía axial computarizada prueba gold estándar.
4. Identificar los pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo de cisticercos.

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

TIPO DE ESTUDIO

Diseño de Investigación : Test diagnóstico.

POBLACIÓN.

La población estuvo constituida por 50 pacientes de 15 a 65 años de edad, que mediante solicitud de prueba de ELISA para cisticercosis, acudieron al laboratorio SELADIS, 25 de los cuales no presentaban la enfermedad y los 25 restantes fueron pacientes con cisticercosis confirmada, internados en el Hospital de Clínicas de la ciudad de La Paz. Se recolectaron las muestras durante el periodo de Abril 2002 a Abril 2003, el método de muestreo fue de tipo no aleatorio, de caso consecutivo. La población de estudio fue determinada mediante proceso de selección en base los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Casos :

* Pacientes hospitalizados en la unidad de Neurología y Neurocirugía del Hospital de Clínicas de la ciudad de La Paz , entre las edades de 15 a 65 años, con diagnóstico confirmado de neurocisticercosis mediante estudios de neuroimagen Tomografía Axial Computarizada, Electroencefalogramas , pruebas inmunológicas ELISA en líquido cefalorraquídeo y suero, Inmunofluorescencia .

Controles:

* Individuos aparentemente sanos y personas con resultado negativo para Neurocisticercosis mediante las pruebas citadas anteriormente.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN :

Casos:

* Pacientes con neurocisticercosis en fase inactiva (no hospitalizados).

Controles:

* Personas que acudieron a SELADIS solicitando otros exámenes de laboratorio.

C. METODOLOGÍA.

1. MATERIAL Y MÉTODOS.

1.1. MATERIAL :

- Micro placas de polivinilo con capacidad de 96 pozos .
- Micro pipetas de 100 ul , 200 ul.
- Pipetas de 1 ,2, 5, y 10 ml
- Probetas de 100 y 250 ml.
- Vaso de precipitados de 500 ml
- 50 Tubos de hemólisis y colectores

1.2. REACTIVOS:

- PBS (buffer fosfato salino) PH 7,4 0,1 M
- Tampón carbonato/bicarbonato PH 9,6 0,1 M
- Conjugado antiinmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa
- Sustrato OPD (orto fenilen diamina)- H₂O₂.
- Tampón citrato fosfato 0,1 M
- Acido sulfurico 2 N .
- Leche descremada
- Tween 20
- Solución acril/bisacrilamida
- Trisma base
- EDTA (etilendiaminotetra acético) 0,2 M
- SDS (dodecil sulfato) 10% y 20%
- Glicina
- Persulfato de amonio 10%
- Fosfato básico disódico 0,2M
- Azul de bromofenol
- Azul de Coomasie R-25
- Metanol p.a.
- Ac. Acético glacial p.a.

1.3. EQUIPOS

- Centrifugadora
- Desmembrador sónico
- Lector ELISA
- Equipo de electroforesis vertical (MV120 Mini vertical gel system)
- Incubadora

2. **PROCEDIMIENTO.**

2.1. OBTENCIÓN DE LOS SUEROS.

- Mediante punción venosa se obtuvo la cantidad de sangre requerida pasándola después a un tubo de hemólisis identificado con los datos del paciente.
- Luego que la muestra coagulara se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos.
- El suero fue separado en tubos previamente identificados siendo después llevados a -20°C para conservar las muestras.

2.2. PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE A PARTIR DE CISTICERCOS

Se realizó la preparación del extracto antigénico total en base a la técnica indicada por E. Coltori (29) con algunas modificaciones:

- Se extrajeron los cisticercos de tejido muscular de cerdo.
- Luego fueron homogenizados con 5 ml de agua destilada, a éste producto se añadieron nuevamente 5 ml de agua destilada.
- Luego se llevó a isotonicidad añadiendo 2ml de PBS 6 veces concentrado .
- Se sometió a la acción del desmembrador sónico en baño de hielo durante 10 minutos al 50% del poder del equipo por intervalos de 30 segundos y 30 segundos en reposo.
- Se dejó 2 horas a 4°C y después se centrifugó de 1000 a 1500 rpm a 4°C por 20 minutos.

- El sobrenadante fue separado para determinar la cantidad de proteínas por el método de rojo ponceau .
- El volumen final del antígeno obtenido fue 5ml , de los cuales 3 ml fueron lícuotados y conservados a -20°C para su empleo posterior en el ensayo Inmuno Enzimatico.
- Los 2 ml restantes de antígeno fueron concentrados utilizando una bolsa de diálisis sumergida en polietilenglicol (PEG). El volumen final fue 400 ul que se alicuotaron ,y almacenaron adecuadamente para su uso en la corrida electroforética.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE METODO DEL ROJO PONCEAU

- Se determino la concentración proteica trabajando por duplicado con muestra de antígeno puro y diluido 1/5 con agua destilada.
- 5- Se tomaron 0,2 ml de cada muestra (extracto antigénico puro y diluido) , 0,2 ml de estándar para proteínas (albúmina sérica bovina) y se colocaron en tubos de hemólisis respectivamente .
- Se añadió a cada tubo 1 ml del reactivo rojo ponceau, se mezcló cada solución y luego se centrífugo a 3000 rpm por 10 minutos.
- Desechando el sobrenadante se resuspendió el precipitado con 2,5 ml de NaOH 0,2M.
- La densidad óptica de las muestras fue determinada mediante lectura en espectrofotómetro a 560 nm
- La concentración proteica en el antígeno fue **2590 ug /ml** (259 mg/dl) determinado según cálculos : DO de muestra 0.437 entre DO del estandar 0.675 , por 80 (concentración St) , por 5 (factor de dilución) .
- El extracto antigénico concentrado dio : **12 948 ug /ml** de concentración proteica (DO muestra / DO St x 80 x 5) por 5 (Nº de veces concentrado) .

2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) INDIRECTO.

- Conocida la concentración proteica del extracto antigénico, se realizó la titulación del mismo por duplicado, en microplacas de polivinilo de 96 pozos, a diferentes concentraciones: 12,5 ug/ml; 25 ug/ml y 50 ug/ml, para determinar la concentración óptima.

- Simultáneamente se determinó la dilución óptima de las muestras, empleando para esto un **suero control positivo**, seleccionado respecto a diagnóstico de cisticercosis confirmada mediante clínica, laboratorio (ELISA, IFI) y TAC. **Suero control negativo** proveniente de un individuo aparentemente sano, negativo para cisticercosis mediante las pruebas mencionadas anteriormente.

- Se trabajó con suero control (+) en títulos: 1/25; 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200. Suero control (-) títulos: 1/25; 1/50; 1/100; 1/200

- Una vez determinadas las condiciones de la prueba se procedió a analizar las muestras.

2.5. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO INDIRECTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS(23)

2.5.1. ESQUEMA.



Fig8. Fase de la técnica Elisa indirecto. (1) El antígeno se pega a la placa (2)Se añade el suero problema. (3) posteriormente, el conjugado. (4) y por último, el sustrato .

FUENTE : Dr.Sanchez Viscaño J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina . <http://www.inia.es/ciix/inicio.htm>

2.5.2 PROCEDIMIENTO.

1) SENSIBILIZACION DE PLACAS

- Se colocó a cada pozo 100 ul del antígeno diluido a concentración 25 ug/ml con tampón carbonato-bicarbonato PH 9,6 que permite mantener las condiciones adecuadas del medio y proporciona la carga negativa necesaria para la fijación a las placas . Luego fue incubada a 37 °C por 30 min (cubriendo la placa en cada incubación).

2) LAVADO

- Se desechó el contenido de la placa y se procedió al lavado de cada pocito con 200 ul de PBS (tampón fosfato –salino) PH 7,4 – Tween , escurriendo el líquido remanente del lavado sobre papel absorbente . El tampón PBS mantiene la fuerza iónica y PH dando al medio las condiciones de reacción . Tween permite la eliminación del material no pegado específicamente al pozo.

3) BLOQUEO

- Se añadió leche descremada al 5% en PBS 0,1 M , 200 ul a cada pozo con el fin de bloquear los sitios reactivos restantes , evitando de esta manera reacciones inespecíficas , luego fue incubada la placa a 37° C por 60 min.

- Al cabo de los 60 min se lavó cada pozo con 200 ul de PBS PH 7,4 – Tween desechando en cada lavado el contenido de los pozos se realizaron 4 lavados.

4) FIJACIÓN DEL SUERO

- Se colocaron 100 ul de muestra a diluciones: 1/25 ; 1/50 ; 1/100 ; 1/200 ; 1/400 ; 1/800 en PBS-Tween , mas los controles (+) y (-) a respectivamente. Los controles permiten evaluar la reproducibilidad de la prueba brindando confiabilidad de resultados.

- Se incubó la placa a 37°C por 60 min al cabo de los cuales se realizaron 4 lavados sucesivos con 200 ul de PBS-Tween desechando el contenido de los pozos en cada lavado se dejó escurrir después el líquido remanente sobre papel absorbente. El lavado nos permite eliminar las inmunoglobulinas que no se pegaron al antígeno.

5) CONJUGADO

- Se diluyó el conjugado anti Inmunoglobulina (anti Ig G,A,M) – POD (peroxidasa) en PBS -Tween y se colocó 100 ul de éste a cada pozo.
- Luego se incubó la placa a 37°C por 60 min después de los cuales se realizaron los 4 lavados correspondientes con 200 ul de PBS-Tween , de igual manera que en los anteriores pasos , desechando y escurriendo el líquido remanente .

6) SUSTRATO

- 5 minutos antes de concluir la incubación anterior se prepara la solución del sustrato añadiendo H₂O₂ al cromógeno OPD en tampón citrato-fosfato.
- Se colocó 100 ul de sustrato a cada pozo y se dejó 5 min en reposo a temperatura ambiente para que ocurra la reacción Enzima – Sustrato.

7) SOLUCION DE PARADA

- Se añadió 50 ul de ácido sulfúrico 2 N a todos los pocitos para detener la reacción Enzima –Sustrato.
- Luego se llevó la placa al lector ELISA (Sigma) para determinar las absorbancias de las muestras a 492 nm . Una muestra fue considerada positiva cuando presentó densidad óptica igual o superior al punto de corte (cut off) .

2.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE- SDS)

2.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- 2 ml del antígeno salino soluble de cisticerco fueron concentrados cinco veces, colocándolo en una bolsa de diálisis, que fue sumergida en polietilenglicol (PEG).
- El volumen final de antígeno concentrado fue de 400 μ l cuya concentración proteica dio 12587 μ g/ml. El cual fue alícuotado y almacenado en cantidades de 50 μ l para su empleo en la corrida electroforética.
- Se realizaron 2 diluciones seriadas 1/10 del antígeno concentrado en tampón de muestra (10 μ l Ag concentrado / 90 μ l tampón) y una dilución 1/2 de antígeno sin concentrar (50 μ l Ag / 50 μ l tampón).

2.6.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE PROTEÍNAS DE PESO MOLECULAR CONOCIDO (MARCADOR).

- Se seleccionaron 5 proteínas en función a su peso molecular (PM), de tal manera que se tenga un rango de que vaya de bajo a alto PM.
- Se utilizaron las siguientes proteínas de peso molecular conocido como marcadores:

PROTEINA	PESO MOLECULAR
Ribonucleasa A	13 700 Da
Aldolasa	158 000 Da
Catalasa	232 000 Da
Tiroglobulina	669 000 Da
Azul dextran	2 000 000 Da

- Se pesó 0,01 g de cada proteína y fue diluida en 1ml de tampón de muestra, la solución de cada proteína fue alícuotada.
- Luego se preparó una solución patrón en base a todas las proteínas tomando 10 μ l de cada una, de la solución patrón final se hizo una dilución 1/2 y un dilución seriada 1/5 y 1/10.

2.6.3 PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

- Se preparo gel de poliacrilamida al 8% según el siguiente protocolo (24).

REACTIVO	GEL DE CONCENTRACIÓN (10 ml)	GEL DE SEPARACIÓN (10 ml)
- Acril bisacrilamida	1,2 ml	2,8 ml
- Tampón de concentración	0,9 ml	-
- Tampón de separación	-	2 ml
- SDS 20%	33,5µl	33,5µl
- TEMED	7 µl	7 µl
- Agua destilada	5 ml	2,5 ml
- Persulfato de amonio 10%	67 µl	67 µl

(*)Preparación de reactivos ver anexos

- Primero se preparó la solución del gel separador dejando por 30 minutos a 37°C , luego se vertió la solución del gel concentrador se colocaron los peines en ambas placas , y se llevó nuevamente a 37°C por 30 minutos.
- Se colocaron 10 ul de glicerina a las diluciones de muestra y patrón , y fueron sembradas en volumen de 30ul en el gel según el protocolo de corrida siguiente :

Nº de POZO	---	1	2	3	4	5	6	7	8	--
DILUCIÓN	---	1/2 ;	1/5	1/10	---	1/2 ;	1/10	1/10	---	
		Patrón de proteínas				Antígeno sin concentrar		Antígeno concentrado		

- El voltaje de corrida fue 196 Voltios y 25 mAmp durante una hora con treinta minutos (cámara y accesorios para electroforesis vertical :MV120 mini vertical gel system).
- Al cabo del tiempo citado se aplicó sobre el gel, el colorante (azul brillante de Coomasie durante 30 minutos y se reveló mediante cambios sucesivos del colorante (Ácido acético glacial /metanol y agitación continua.

VIII. RESULTADOS.

1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO SALINO TOTAL

Se determinó la concentración proteica del extracto antigénico salino total de cisticercos mediante la técnica de Rojo ponceau para proteínas, la concentración antigénica fue 2590 ug/ml, determinada mediante los siguientes cálculos:

	DO 1	DO 2	X
Estándar	0,677	0,673	0,675
Ag (puro)	0,909	0,890	0,899
Ag (1/5)	0,438	0,436	0,437

$$\frac{\text{DO(M)} \times \text{C (St)}}{\text{DO (St)}} = \text{C (M) mg/dl}$$

$$\text{DO M} = 0,437$$

$$\text{DO St} = 0,675$$

$$\text{C St} = 80 \text{ mg/dl}$$

$$\frac{0,437 \times 80}{0,675} \times 5 = 2590 \text{ mg/dl}$$

2. OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Se estableció que el título óptimo del antígeno corresponde a concentración 25 ug/ml permitiendo una efectiva sensibilización de las placas, porque a la misma el Control (+) positivo mostraba valores de densidad óptica claramente distinguibles de los valores de densidad óptica del Control (-) negativo. Se trabajó con suero patrón (+) titulado mediante las siguientes diluciones 1/25 ; 1/50 ; 1/100 ; 1/200 ; 1/400 ; 1/800 ; 1/1600 ; 1/ 3200 .Suero control (-) : 1/25 ; 1/50 ; 1/100 ;1/200.

3. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE (CUT OFF) PARA LA TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA .

Se determinó el punto de corte (cut off) en base a los datos de absorbancias obtenidas de las 25 muestras de sueros de individuos sin cisticercosis (negativos) el valor del punto de corte fue establecido con el promedio \bar{X} de absorbancias de los sueros negativos (-) mas 2 desviaciones estandar D.S.

TABLA N° 2

TABLA N° 2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE (CUT OFF)

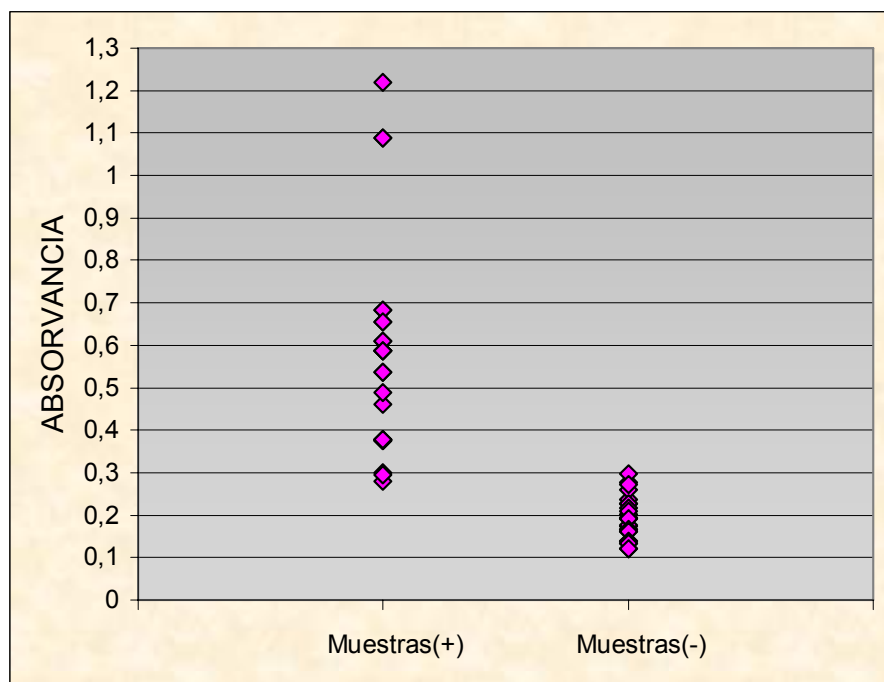
Número de sueros	=	25
Promedio \bar{X}	=	0,204
Desviación Estandar (D.S)	=	0,02
Punto de corte (cut off)	=	$\bar{X} + 2 \text{ D.S.}$
		= 0,204 + 2 (0,02)
Cut off = 0,244 unidades de absorbancia		

4. VALORES DE ABSORBANCIA PARA CISTICERCOSIS POSITIVA Y NEGATIVA

En la figura se muestra la dispersión de datos de absorbancia de las muestras (-) negativas con respecto a las de muestras (+) positivas según diagnóstico de cisticercosis, establecidos por ELISA. Los valores de absorbancia se ven más dispersos y elevados en las muestras de suero de pacientes con cisticercosis.

GRAFICO N° 1

GRAFICO N°1 ABSORBANCIA DE MUESTRAS SEGÚN DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS



5. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO SIGNIFICATIVO DE POSITIVIDAD PARA ELISA

Según las absorbancias obtenidas como resultado del ELISA para sueros reactivos y no reactivos para cisticercosis , se puede observar que a partir o por encima de la D.O. 0,30 se encuentran los títulos iguales o superiores a 1/200 que corresponden a los pacientes con cisticercosis comprobada ; Por debajo de la D.O. 0,30 y 1/200 se encuentran los controles sanos. TABLA N° 3

TABLA N° 3 DETERMINACIÓN DEL TITULO SIGNIFICATIVO DE POSITIVIDAD PARA ELISA

ELISA D.O.	TÍTULOS			
	1/200	1/400	1/800	1/1600
0,10 – 0,14	-	-	-	-
0,15 – 0,19	-	-	-	-
0,20 – 0,24	+/-	-	-	-
0,25 – 0,29	+	-	-	-
0,30 – 0,34	+	-	-	-
0,35 – 0,39	+	+	-	-
0,40 – 0,44	+	+	-	-
0,45 – 0,49	+	+	+	-
0,50 – 0,54	+	+	+	-
0,55 – 0,59	+	+	+	-
0,60 – 0,64	+	+	+	+
0,65 – 0,69	+	+	+	+
mayor 0,70	+	+	+	+

6. VALORES DE ABSORBANCIA SEGÚN ELISA PARA DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS .

Establecidas las condiciones adecuadas para Ensayo Inmunoenzimático se procedió a evaluar las muestras , la prueba se efectuó sobre 25 sueros (+) Positivos confirmados para cisticercosis se obtuvieron absorbancias comprendidas entre 0.290 y 1.22 cuyo promedio fue 0.559 ; Las muestras (-) Negativas en número de 25 , dieron absorbancias que oscilaron entre 0.121 y 0.226 con un promedio de 0.204 . TABLA N°4

TABLA N° 4 VALORES DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN A DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS

ELISA	Nº SUEROS	X	ABSORBANCIA MÁXIMA	ABSORBANCIA MÍNIMA
SIN CISTICERCOSIS (-)	25	0.204	0.226	0.121
CON CISTICERCOSIS (+)	25	0.559	1.22	0.290

7. DISTRIBUCIÓN DE LA FRECUENCIA DE TÍTULOS

Los 50 sueros positivos y negativos distribuidos según títulos determinados según el Ensayo Inmunoenzimático. TABLA N°5

TABLA N°5 DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS SEGÚN TITULO

ELISA	TITULO						
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
N° DE MUESTRAS (+)	0	0	0	13	7	3	2
N° DE MUESTRAS (-)	6	12	6	1	0	0	0

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TÉCNICA INMUNO ENZIMÁTICA OPTIMIZADA.

Para validar los resultados obtenidos en ambas poblaciones se procedió a análisis estadístico mediante determinación de Sensibilidad y Especificidad de la Técnica dando como resultado 92 % y 88 % respectivamente. Valor predictivo positivo (VPP) 88.5% y Valor predictivo negativo (VPN) 92% TABLA N° 6

TABLA N° 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TÉCNICA INMUNO ENZIMÁTICA OPTIMIZADA .

ELISA	GOLD STANDARD (T.A.C.)		TOTAL
	CON CISTICERCOSIS	SIN CISTICERCOSIS	
(+)	23	3	26
(-)	2	22	24
TOTAL	25	25	50

SENSIBILIDAD	92%
ESPECIFICIDAD	88%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP)	88,5%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO (VPN)	92%

10. DISTRIBUCIÓN DE RESULTADOS SEGÚN NÚMERO PORCENTAJE

Según los datos expuestos en la tabla se puede ver que cinco son los resultados indeterminados, el valor de absorbancia de los mismos se halla en el rango de incertidumbre (0.252 - 0.278). TABLA N° 7

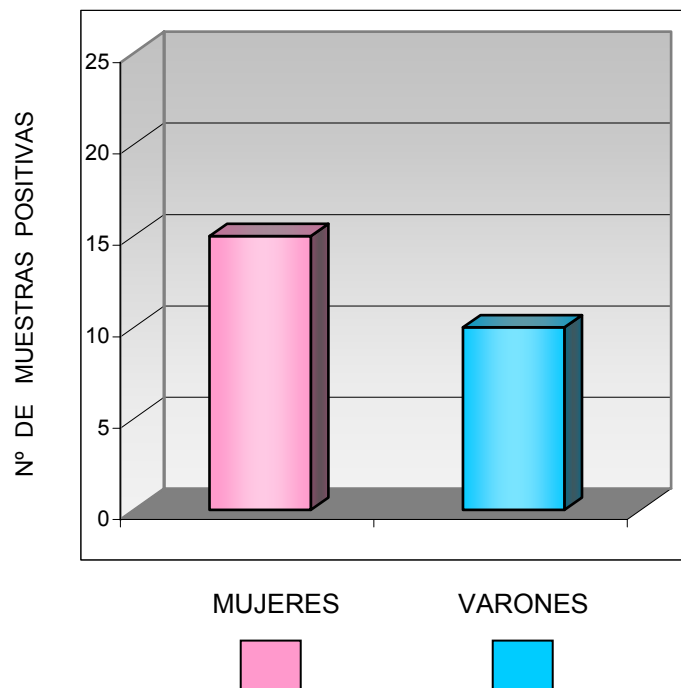
TABLA N° 7 RESULTADOS SEGÚN NÚMERO Y PORCENTAJE

RESULTADO	POSITIVO	INDETER- MINADO	NEGATIVO	TOTAL
N°	23	5	22	50
%	46 %	10 %	44 %	100%

11 . NUMERO DE RESULTADOS POSITIVOS PARA CISTICERCOSIS SEGÚN SEXO.

Como se puede observar en el gráfico siguiente, del total de muestras positivas para cisticercosis 15 se dieron en pacientes mujeres siendo mayor el número de casos con respecto a los pacientes varones . GRAFICA N° 2

GRAFICA N° 2 NUMERO DE POSITIVOS PARA CISTICERCOSIS SEGÚN SEXO.

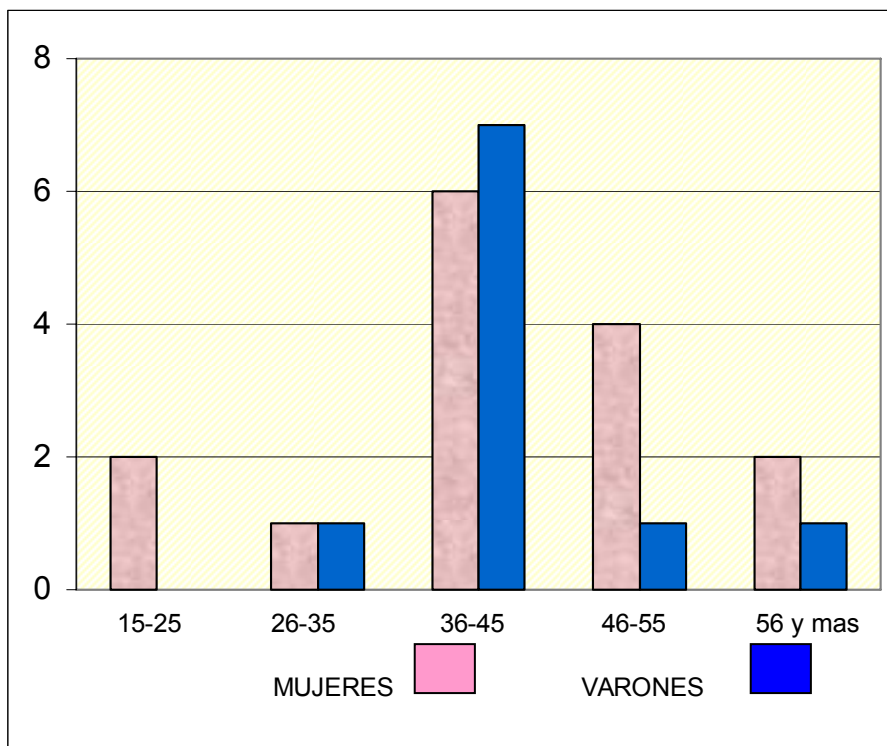


12. DISTRIBUCIÓN DE CASOS POSITIVOS SEGÚN SEXO Y EDAD

Del total de muestras analizadas la mayor frecuencia de cisticercosis se presentó en edades de 36 a 45 tanto en mujeres como en varones .

GRAFICO N° 3

GRAFICO N° 3 DISTRIBUCIÓN DE NUMERO DE CASOS SEGÚN SEXO Y EDAD

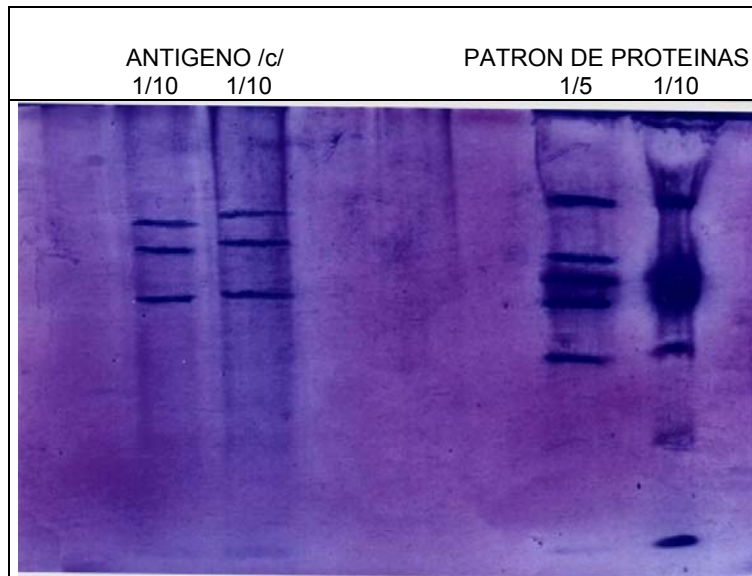


13. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR PROTEICO DEL ANTÍGENO DE CISTICERCO.

La separación de proteínas del extracto crudo de cisticerco por peso molecular, en gel preparado al 8 % y 2 diluciones seriadas de 1/10 del antígeno concentrado permitió la formación de 3 bandas las que corresponden a los siguientes pesos moleculares 13KDa ; 11KDa y 9KDa .

El gel preparado al 8% permitió buena resolución de bandas ya que se las puede diferenciar claramente : bandas de muestra y patrón. (FIGURA N° 10).

FIGURA N° 10 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE CISTICERCO POR ELECTROFORESIS EN SDS – PAGE.



IX . DISCUSIÓN

El extracto salino total de antígeno de *Cisticercus cellulosae* proveniente de *Taenia solium* fue evaluado mediante Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para determinar su rendimiento en el inmuno diagnóstico de la cisticercosis y establecer su utilidad como fuente antigénica ; El extracto antigénico salino total fue preparado según técnica de E. Coltorti con algunas modificaciones , se determinó como concentración proteica antigénica 2590 ug/ml dicha concentración fue aceptable para el desarrollo del ELISA, debe tomarse en cuenta que durante la preparación del extracto varios factores pueden influir en la concentración proteica final del antígeno tales como las condiciones ambientales : temperatura adecuada para que los cisticercos permanezcan frescos y no se deterioren ; tiempo de disección : la disección debe ser lo mas rápida y exhaustiva posible para mantener viabilidad y evitar la contaminación con carne del animal .

Con respecto a la determinación de las condiciones adecuadas para desarrollar la técnica ELISA se estableció que el título optimo del antígeno salino total correspondió a 25 ug/ml, tomando en cuenta que la bibliografía señala como concentración óptima el rango de 1 a 25 ug/ml para este tipo de antígenos , Iihoshi Nakahara (29) en trabajo similar utilizó 25 ug/ml para sensibilización de placas , Roxana Carrasco (30) determinó como concentración mas adecuada 20 ug/ml de extracto antigénico salino encontrándose éste valor dentro del rango lo planteado anteriormente .

En lo referente a las diluciones de suero empleadas durante la estandarización de la prueba se determinó que la dilución 1/200 , fue seleccionada como la más adecuada, por considerar que a partir de la misma se observaba clara diferencia entre control positivo y negativo , una vez estandarizada la prueba se analizaron las diferentes muestras positivas y negativas , pudiéndose evidenciar diferencias significativas de absorbancia entre ambos grupos, el punto del corte establecido fue 0,244 unidades de absorbancia, estableciendo de este modo que aquellos valores por debajo de 0,244 se consideraran

negativos, y aquellos valores mayores a 0,244 como positivos. El valor del corte establecido va relacionado con el trabajo ya mencionados anteriormente de Roxana Carrasco (30) que obtuvo como punto de corte 0,280 . Fue evaluada la técnica Inmunoenzimática optimizada mediante análisis estadístico , obteniéndose 92% de sensibilidad y 88% de especificidad ; estos resultados estarían en relación a los determinados por Carrasco R. (30) que encontró 89,5% de sensibilidad y 97% de especificidad utilizando extracto antigénico salino; Flores A.C.(31) encontro 100% de sensibilidad y 97% de especificidad ; En nuestro estudio se hallo 88,5 % de Valor predictivo positivo (VPP) y 92% de Valor predictivo negativo (VPN) resultados que se encuentran relacionados a los determinados por Flores A.C.(31) que encontró 95 % de VPP y 97% de VPN . En consecuencia el ELISA implementado con extracto antigénico salino total para el diagnostico con cisticercosis es satisfactorio y permite establecerla como una alternativa en el diagnostico de esta parasitosis . Por otro lado los dos pacientes que dieron falso negativo para ELISA , pueda deberse a que los mismos presentaban cisticercos calcificados además de haber recibido tratamiento desde hace mucho tiempo ,lo que quiere decir que un parásito no viable no produce la misma reacción inmunogénica respecto a la formación de anticuerpos a niveles detectables .

Se estandarizaron las condiciones adecuadas para llevar a cabo la corrida electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) , el antígeno salino de Cisticercos cellulosa tuvo que ser concentrado , para alcanzar la concentración adecuada de la corrida que fue de 126 ug/ml (1/100) , el gel de poliacrilamida fue preparado al 8% concentración adecuada porque permitió un buena resolución de bandas proteicas .

Tres de las bandas obtenidas en la separación antígeno salino de cisticerco presentan pesos moleculares aproximados a los obtenidos por Rossi Nineth et al en el año 2000 (21) las cuales son 11 y 13 kDa respecto a 13 y 14 KDa fracciones que presentaron reactividad en el caso de neurocisticercosis .

X. CONCLUSIONES

El Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) en base a extracto antigénico salino total de *Cisticercos cellulosae*, para el diagnóstico con cisticercosis es satisfactorio, ya que permite diferenciar muestras positivas de negativas, los resultados de sensibilidad y especificidad permiten establecerla como una alternativa en el diagnóstico de esta parasitosis.

1.- El antígeno salino preparado en base a cisticercos de *Taenia solium*, según la técnica modificada de E. Coltortí, fue validado para la técnica Inmunoenzimática ya que tuvo el rendimiento esperado.

2.- Para la optimización de la técnica Inmunoenzimática se determinó como concentración adecuada de antígeno 25 ug/ml permitiendo la sensibilización adecuada de las placas, la dilución 1/200 fue la más adecuada ya que a partir de la misma se puede hacer distinción de muestras positivas y negativas, tomando en cuenta que el punto del corte determinado fue 0,244 unidades de absorbancia, se encontraron 23 muestras positivas (+) para cisticercosis; 22 negativas (-), las muestras con resultado indeterminado pueden ser confirmados mediante pruebas adicionales.

3.- El rendimiento de la técnica inmunoenzimática fue valuada mediante la determinación de sensibilidad y especificidad, hallándose 92% y 88% respectivamente; VPP 88,5% y VPN 92%, que permite demostrar que esta técnica constituye un complemento importante a otras pruebas de diagnóstico de cisticercosis, principalmente para la TAC.

4.- Se establecieron las condiciones adecuadas para la corrida electroforética vertical mediante la cual se determinaron los pesos moleculares de tres fracciones proteicas 13KDa; 11KDa y 9KDa de las proteínas más representativas presentes en el antígeno con el cual se trabajó.

XII . BIBLIOGRAFÍA

- (1) Organización Mundial de la Salud, 56ª Asamblea Mundial de la Salud .Control de la Cisticercosis. 6 de marzo de 2003
- (2) Organización Panamericana de la Salud , Organización Mundial de la Salud . XII Reunión Interamericana a nivel ministerial en Salud y Agricultura . Control de la neurocisticercosis . São Paulo, Brasil. 2001.
- (3) Mediks , Grupo Angeles , Servicios de Salud. Cisticercosis. Info@mediks.com
<http://www.mediks.com/saludyvida/contacto.php>
- (4) Ministerio de salud y Previsión Social , Dirección general de epidemiología , Anuario epidemiológico .Teniasis Cisticercosis. Bolivia. 2000; 103-108.
- (5) Pontificia Universidad Católica de Chile, Escuela de Medicina , Dpto de neurología. Contribución a la Historia de la Cisticercosis cerebral. Vol XXI. 1994
- (6) Sarti Elsa . Teniasis y Cisticercosis . Salud Pública .México.1997 ; 39 (3) : 225 - 230 , 556-563.
- (7) Rugiero Elsa , Noemí Isabel N. Teniasis . En Atias Antonio. Parasitología Médica . 2ª ed . Santiago : Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. ; 1992 .p 194 –196 .
- (8) Botero D , Restrepo M. Parasitosis humanas . 3ªed . Medellín : Corporación para la investigación biológica ; 1997 . p 135-155 .
- (9) Del Brutto Oscar H , Sotelo J. Etiopatogenia de la Neurocisticercosis . Revista Ecuatoriana Neurológica . 1993 ; 2 : 22 32 .
- (10) Atias Antonio . Cisticercosis . En Atias Antonio . Parasitología Médica . 2ª ed . Santiago : Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. ; 1992 .p 355 –356 .
- (11) Santín García G , Cisticercosis, a la caza de la *Taenia solium* .UNAM. Facultad de Medicina . Organo Informativo del Dpto de Medicina Familiar.2000
- (12) Aranda E , Rada J . Teniasis . En Aranda E , Rada J . Parasitosis Intestinales . 1ªed .La Paz :Artes Gráficas Rocco ; 2002 . p 296 – 326.
- (13) Francisco Rigel – Ortiz , Mabel Vera – Pedro . Meningitis cisticercosa . Gaceta Médica. México ; 133 : 4.

- (14) Abbas Abul . Immunologia celular y molecular . 3ªed .1995.p 289 ;486-487.
- (15) Ccama Sullca Alberto . Persistencia de anticuerpos maternos contra cisticercosis porcina y su efecto sobre el EITB . Tesis Universidad Nacional Mayor de San Marcos . Perú .1999 . http://sisbib.unmsm.edu.pe/bib_virtual/tesis/Ccama.htm.
- (16) Obregón Henao Andrés, Gil Dora L., Gómez Diana I., Sanzón Fernando, Teale Judy M., Restrepo Blanca I.. The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD . Infectio 2002; 6(1): 7-15 . <http://www.infectio.org/v6n1/art1/1.htm>
- (17) Rose , Noel . El laboratorio en inmunología clínica. 2ª ed . 1986.p 52,524-527; 678- 681; 964-967.
- (18) Ciclo biológico de la *Taenia solium*. 2000.
mnemonica.org/docs/patologia/Neurocisticercosis.doc
- (19) Comité editor : Doctor La Forcada et al . Inmunología en el diagnóstico de Neurocisticercosis . Gaceta del Servicio de Neurología del Hospital de Clínicas de La Paz.2002;1(1).
- (20) Organización Mundial de la Salud , 55ª Asamblea Mundial de la Salud medios disponibles para controlar la Cisticercosis. Mayo.2002
http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/sa5523.pdf.
- (21) Revista Agricultura Urbana.Control de la Cisticercosis en áreas rurales y urbanas Noviembre. 2001. www.ipes.org/aguila/publicaciones .
- (22) Academia Biomédica Digital , MedicinaTropical. Limitaciones del Diagnóstico de la Cisticercosis humana . Venezuela. 1998.
<http://77caibo.ucv.ve/caibo/articulo/cisticer.htm>.
- (23) Dr.Sanchez Viscaíno J. M. Curso de introducción a la Inmunología porcina.
<http://www.inia.es/ciix/inicio.htm>
- (24) Tsang VCW, Brand JA , Boyer A E . An Enzyme -liked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human Cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989; 159: 50-59.

- (25) Universidad de Antioquia . Departamento de Química . CNQ-533 . Curso de Electroforesis Vertical para la separación de proteínas de suero humano en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). 2001. <http://mat.udea.edu.es/carloslopez/cnq533.html>
- (26) Rybicki Edward P. and Purves Maud . SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) in Coyne Vernon E , James M Diane , Reid Sharon J . and Rybicki Edward P. Molecular Biology Techniques Manual .University of Cape Town . 3ªed .1996 . <http://web.uct.ac.za/microbiology/western.htm.copper>
- (27) Marghni Ricardo . Inmunología e Inmunoquímica . 5ª ed . Buenos Aires :Médica Panamericana ; 1996 . p .906 –922.
- (28) Cortés Sánchez Maria Rosa . Estudio Inmunoquímico en leche de camélido andino lamus y glamus paca . Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andres .La Paz- Bolivia 1989.p 170.
- (29) Iihoshi Nakahara Naomi . Elaboración del antígeno soluble de *Cisticercus* para técnicas serológicas .Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés .La Paz-Bolivia.1988.
- (30) Carrasco Roxana , Ampuero Tania , et al .Comparación de técnicas del diagnóstico inmunoserológico de la Neurocisticercosis. En IBBA .Propuesta Universidad Mayor de San Andrés. Anuario 1989-1990. p195-206.
- (31) Flórez AC, Laguado JG. Evaluación y optimización del rendimiento técnico de la prueba Inmunoenzimática ELISA RIDASCREEN® *Taenia solium* Ig G. Instituto Nacional de Salud .Colombia . 2000
[w.ww.biogenix.com.co/internas/libreria/documentos/Resumen_Evaluacion_RIDASCREEN](http://www.biogenix.com.co/internas/libreria/documentos/Resumen_Evaluacion_RIDASCREEN).
- (32) Rossi Nineth , Rivas Ivan , Hernández Manuel y Urdaneta Haydeé . Inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis: estudio comparativo de extractos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* . Universidad de los Andes. Venezuela . REV CUBANA . 2000;52(3):157-64.

- (33) Escobar A . Patología de la Neurocisticercosis . En : Palacios E , Carvajal J .
Cisticercosis en el SNC . Springfield : Charles ,Thomas ; 1983 : 27-54 .
- (34) Lema Herrera Fresia Carolina .Evaluación de la especie *Raphanus sativus* como
fuente alternativa para la purificación de POD para su uso en Pruebas de
Inmunodiagnóstico . Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
Universidad Mayor de San Andrés .La Paz-Bolivia.1994.
- (35) Torrico Dunia ,Calla Jacqueline. Detección de anticuerpos contra Extracto Crudo
de Cerebro de Ratón en pacientes con esclerosis múltiple .BIOFARBO. Órgano
oficial del Colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia .1998; 6: 83-86.
- (36) Hernandez Sampieri Roberto , Fernandez Collado Carlos. Metodología de la
Investigación . 1ª ed. México:Mc Graw-Hill Interamericana ;1996 .p 393,472.
- (37) Escuela de Tutores . Módulo de Metodología de la Investigación Clínica .Facultad
de Medicina .Universidad Mayor de San Andrés .La Paz-Bolivia.1999.p 81- 94.
- (38) Rodríguez Mollinedo Sandra. Inmunoglobulina A secretora en saliva de niños .
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de
San Andrés .La Paz-Bolivia. 2003.

ANEXOS

PREPARACION DE REACTIVOS:

1) Solución de rojo ponceau:

Rojo ponceau	0,2g
Acido tricloro acético(ATA)	3g.
Acido sulfosalicílico	3g
Agua destilada	100 ml

2) Tampón carbonato- bicarbonato

Na HCO ₃	0,82g (50ml)
Na ₂ CO ₃	1,06g (50ml)
Agua destilada	100 ml

3) PBS (buffer fosfato-salino) Ph 7,4 0,1 M

ClNa	4,38 g
NaH ₂ PO ₄	2,15 g
Na ₂ HPO ₄	8,09 g
Agua destilada	1000 ml

4) Leche 5% en PBS 0,1M

Leche descremada	1 g
PBS 0,1M	20 ml

5) PBS 0,1M PH 7,4 –Tween

PBS 0,1M	50 ml
Tween	25 ul

6) Sustrato

*Tampon citrato-fosfato:

Sol A: Na ₂ HPO ₄ 0,2M	0,142 g	5ml H ₂ O d
Sol B: Citrato	0,096 g	5ml H ₂ O d
Volumen final		10 ml

*Peroxidasa (POD)	0,025 g
Peroxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	14 ul
Tampón citrato –fosfato	10ml

7) Acido sulfúrico 2N

8) Solución acril bisacrilamida

Acrilamida	30 g
N,N` metilen Bisacrilamida	0,79 g
Agua destilada csp	100 ml

Pasar por filtro de nitrocelulosa (Millipore 0,45 mm) y conservar en frasco color ámbar a 4 °C.

9) Solución tampón Tris 1,5 M Ph 6,8 (Solución tampón de concentración)

Tris	1,8165 g
SDS 0,4%	1,2 ml de SDS 10%
Agua destilada csp	30 ml

10) Solución tampón Tris 1,5M Ph 8,8 (Solución tampón de separación)

Tris	5,451 g
SDS 0,4%	1,2 ml de SDS 10%
Agua destilada csp	30 ml

11) Solución tampón de corrida .

Tris 0,025M	0,3 g
Glicina 0,19M	1,44 g
SDS 1%	0,1 g
Agua destilada csp	100 ml

12) Solución tampón de muestra

Tris 0,14M Ph 6,8	2,8 ml de Tris 0,5M Ph 6,8
Glicina 10%	1 g
SDS 2%	2 ml SDS 10%
EDTA 2 mM	
Azul de bromofenol (piscas)	
Agua destilada csp	10 ml

13) Solución de tñido de Azul de Coomasie

Azul brillante de Coomasie R-25 0,25%	0,125g
Metanol 50%	25 ml
Ac. Acético glacial 10%	5 ml
Agua destilada csp	50 ml

Orden de preparación :primero metanol, luego ac. acético y finalmente agua.

14) Solución de tñido

Ac. acético glacial 10%	10 ml
Metanol 10%	10 ml
Agua destilada csp	100 ml

HISTORIA CLINICA

<u>UNIDAD:</u> N° DE H.C.			
Ap.Paterno	Ap.Materno	Nombres	Edad
Procedencia	Dirección	Ocupación	
Diagnóstico de ingreso :			
Diagnóstico de egreso :			
Anamnesis y examen físico :			
Hallazgos significativos de laboratorio-Rayos "X" e interconsultas			
Evolución(en el hospital) –Complicaciones (si las hubo)			
Condición ,Tratamiento –Referencia final al dar de alta y pronóstico			