

4 03081

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH

“LOS ANTIGENOS DEL CISTICERCO DE *Taenia solium*: ASPECTOS BASICOS Y APLICACION EN EL DIAGNOSTICO CLINICO Y EN ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS”

T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A :  
MARIA DOLORES CORREA BELTRAN

Tutores

Principal: Dr. Ana Flisser Steinbruch  
Dr. Adolfo Martínez Palomo  
Dr. Juan Pedro Lactette

México, D. F.

Mayo de 1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

262466



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

*A mis hijos*

*EDUARDO y DANIELA,*

*con*

*AMOR*

*GRACIAS POR TRAER LUZ A MI VIDA*

*A DIOS N.S., POR EL DON DE LA VIDA*

## AGRADECIMIENTOS

Este documento es el resultado del trabajo y el apoyo de un gran número de personas, con quienes estoy en deuda. Gracias a:

Mi familia por su amor y apoyo incondicional: Raul †, Naty, MariNaty, Aurora, Isabel, Alejandra, Raul, Mac, Juan Carlos, Beto, Raul, Horacio, Aurorita†, Nestor†, Chio, Ale, Bety, Eduardo, Lulú, Isabel, Diego, Andrea, Betito, Sebastián, Rodrigo, Raul y Raulin.

Con enorme cariño y respeto a la Dra. Ana Flisser, tutora principal, por su afecto, apoyo y energía.

Con admiración y aprecio a mis tutores

Dr. Adolfo Martínez-Palomo y Dr. Juan Pedro Laclette.

Así mismo, agradezco a los miembros del Comité de sinodales, por su disposición para leer este documento y por sus valiosas sugerencias:

Dra. Patricia Tato, Dr. César González, Dr. Julio Sotelo,

Dr. Rolando Hernández, Dr. Enrique Ortega

Mi familia académica-profesional: Yola, Ame, Tere, Raque, Zoila, Toño, Juan Antonio, Edith, Jorge Luis, Olga, Rick, Héctor, Isa, Gil, Chelo, Clau, Diana, Jorge, Hilda, Armando, Juan Carlos, Rosalba, Alejandro, Roberto, Magda, Juan Gerardo, Memo, Chelo

Mis hermanas de espíritu: Dennise, Caty, Yael, Gina y Tania†

Mis hijos de espíritu: Frida y Ferchis

Dr. Alejandro Escobar mi compañero y amigo, quien leyó una versión preliminar de este documento de manera desinteresada. Sus observaciones fueron de mucho valor.

Al INDRE, paraíso en el que he trabajado durante 10 años. Gracias a todo el personal por su frescura, ganas de aprender, de trabajar y de servir. En particular algunos seres han estado más cerca:

Julio Meneses, Lucina Gutiérrez, Carmen Guzmán, Fernando González, Susana Balandrano, Alicia Aguilar, Mario Torres, Sergio Ibañez, Andrés Velasco, Lucy Rosales, Carmelita Badillo, Yola Islas, Silvia Díaz, Adrián Flores, Mauricio Gómez, Alberto Carreto, Víctor Juárez, Pedro David González, Irma López, Alfonso Esqueda, Irma Hernández, Celia González, Luis Ángel Sapián, Arturo Vazquez, Carlos Badillo, Paty y Lety Gómora,

Al Dr. Eduardo Álvarez, quien dedicó parte de su valioso tiempo para leer y hacer sugerencias al documento, pero quien, sobre todo, me ha impulsado durante meses para que finalice este proceso.

*La tesis es el resultado de experimentos llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud. Algunos de estos estudios fueron financiados por la Organización Panamericana de la Salud (AMR92/12427), el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD, Mex 93/007/01) y la Comunidad Europea (CII-CT940081).*

# CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| <b>RESUMEN</b> .....   | 1   |
| <b>INTRODUCCION</b> .....  | 3   |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | 5   |
| ASPECTOS HISTORICOS .....  | 5   |
| ASPECTOS BIOLOGICOS.....   | 6   |
| LA RELACION HUESPED-PARÁSITO.....  | 10  |
| ASPECTOS CLÍNICOS .....  | 18  |
| INMUNODIAGNÓSTICO .....  | 20  |
| ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS .....   | 25  |
| <b>JUSTIFICACION</b> .....   | 32  |
| <b>HIPOTESIS</b> .....   | 33  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 33  |
| <b>MÉTODOS</b> .....   | 34  |
| GRUPOS ESTUDIADOS .....  | 34  |
| MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....  | 36  |
| MÉTODOS DE LABORATORIO .....   | 37  |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 45  |
| PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES .....   | 45  |
| BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS EN SUERO Y LCR DE PACIENTES Y CERDOS.....                                    | 56  |
| DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN SUEROS DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES ENDÉMICAS .....                      | 65  |
| <b>DISCUSION</b> .....   | 69  |
| ANTÍGENOS INDICADORES DE VIABILIDAD Y ANTÍGENOS INDICADORES DE PROCESO DE MUERTE PARASITARIA ..... | 70  |
| ANTÍGENOS DEL HUÉSPED EN LOS ANTÍGENOS DEL PARÁSITO .....  | 72  |
| ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE ESPECIE .....   | 75  |
| ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE ESTADIO .....   | 75  |
| PRESENCIA DE COMPLEJOS INMUNES .....   | 77  |
| ¿CUANTOS ANTÍGENOS DISTINTOS HAY EN LAS MUESTRAS?.....   | 79  |
| ¿ANTÍGENOS SECUESTRADOS?.....  | 83  |
| ¿AUSENCIA DE ANTÍGENOS O PROBLEMAS TÉCNICOS? .....   | 84  |
| DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS EN POBLACIÓN ABIERTA EN ZONAS ENDÉMICAS.....                            | 86  |
| ¿PARA QUÉ DETECTAR CASOS CON CISTICERCOSIS ACTIVA? .....   | 88  |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | 90  |
| <b>ABREVIATURAS EMPLEADAS</b> .....  | 107 |
| <b>SUMMARY</b> .....   | 108 |
| <b>APÉNDICE. PUBLICACIONES PRESENTADAS</b> .....   | 109 |

## RESUMEN

La mayoría de los métodos inmunológicos para el diagnóstico de la cisticercosis en seres humanos y en animales, se basan en la demostración de anticuerpos específicos en el suero o el líquido cefalorraquídeo. Aunque estos métodos han sido útiles, la presencia de anticuerpos específicos no siempre está relacionada a una parasitosis activa, que puede ser puesta en evidencia más directamente por ensayos que detecten antígenos parasitarios. La demostración de antígenos puede ser útil en la clínica, para ayudar en el seguimiento del tratamiento médico, y en estudios epidemiológicos para identificar casos de cisticercosis activa, lo que por un lado, permitiría encontrar sujetos a ser tratados o vigilados médicamente, antes de que presenten sintomatología severa, y por otro, nos permitiría medir la magnitud de la transmisión en una comunidad.

En esta tesis se presentan los resultados de diversos esfuerzos dirigidos a la búsqueda de antígenos del cisticerco de *Taenia solium*: su identificación, su relación con las características clínicas de los casos y su uso en diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos en comunidades donde la teniosis y la cisticercosis son endémicas.

Los resultados indicaron que la diversidad de antígenos presentes en las muestras es restringida. Existe un grupo predominante de antígenos cuyo peso molecular es de alrededor de 200 kDa, aunque se pueden encontrar otros cuatro antígenos de otros pesos moleculares con baja frecuencia. Esta aparente escasez de antígenos puede deberse a que estén formando complejos inmunes, o que se encuentren secuestrados en los tejidos del huésped.

Por otro lado, se encontró que entre los productos de excreción de los cisticercos, hay moléculas del huésped: un anticuerpo monoclonal inducido con antígenos de excreción y

secreción, reaccionó con componentes de suero humano, probablemente fibrinógeno. Se sabe que estos parásitos tienen componentes de la respuesta humoral del huésped en la superficie y que los endocitan, pero en este estudio obtuvimos evidencia de que los procesan a péptidos más pequeños, posiblemente porque los emplean para alimentarse.

Al analizar la presencia de antígenos por ELISA y por inmunoelectrotransferencia, se encontró que su detección depende del número, tipo y localización de los parásitos. En la cisticercosis calcificada no se detectan antígenos; esto permite proponer que efectivamente la presencia de antígenos está relacionada con una cisticercosis activa. Sin embargo, los ensayos usados hasta ahora no nos han permitido detectar pacientes con lesiones únicas, que representan el 50% de los casos. Por ende, debe mejorarse su sensibilidad.

De los resultados obtenidos en dos estudios en comunidades endémicas, se sugiere que la identificación de antígenos en suero es útil para encontrar casos de neurocisticercosis. Se encontró una fuerte asociación entre la presencia de antígenos con la de crisis convulsivas de aparición tardía. En uno de los estudios, además, se confirmó el diagnóstico de cisticercosis por tomografía computada en dos de tres personas positivas a la prueba. Los resultados sugieren que las técnicas que detectan antígenos sirven para detectar casos activos en comunidad abierta.



## INTRODUCCION

La cisticercosis es una enfermedad compleja y heterogénea, y su estudio en el plano inmunológico ha permitido la identificación de los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, de los elementos del sistema inmunológico que confieren inmunidad y de los mecanismos evasores del parásito. Esta información puede ser útil para establecer medidas de intervención que resulten en la alteración del equilibrio de la parasitosis en beneficio del huésped, o en su defecto, pueden evitar que se tomen medidas costosas, que no ayuden al control de la enfermedad. Por otro lado, el conocimiento de la respuesta inmune se ha usado también para estandarizar diversos métodos para la confirmación diagnóstica de casos clínicos y para estudios epidemiológicos. En los últimos 40 años ha habido un gran esfuerzo en la adaptación de métodos inmunológicos para la confirmación diagnóstica de la cisticercosis mediante la demostración de anticuerpos específicos en el suero o el líquido cefalorraquídeo (LCR) (revisado en Correa y col., 1994; Flisser y Larralde, 1986; Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). Aunque hay algunos estudios cuyos resultados ponen en duda la utilidad de estos métodos para el diagnóstico (Ramos-Kuri y col., 1992; García y col., 1994), en general se puede considerar que en casos clínicos, la presencia de anticuerpos, especialmente en el caso de LCR, suelen ser buenos indicadores de enfermedad. Para estos casos es muy importante tener una prueba de alta sensibilidad, y contar con una prueba confirmatoria más específica.

La problemática del diagnóstico es más compleja para los estudios epidemiológicos, pues normalmente la prevalencia de la enfermedad es baja, y los métodos que detectan anticuerpos en este tipo de poblaciones han demostrado presentar bajo valor predictivo positivo (VPP) para la detección de casos, aun utilizando técnicas que no dan reacciones cruzadas (Schantz y col.,

1994). Posiblemente esto se deba al hecho de que la presencia de anticuerpos circulantes no confirma la presencia de una infección activa, sino sólo sugiere contacto con el parásito. Estos métodos, sin embargo, permiten identificar focos de transmisión y estudiar factores de riesgo asociados (Díaz-Camacho y col., 1990, 1991; García y col., 1991; García-Noval y col., 1996; Sarti y col., 1988, 1992, 1994; Schantz y col., 1992, 1994).

La identificación de antígenos es un mejor indicador de la presencia del parásito vivo. Por ello, hace algún tiempo se inició una línea de investigación enfocada en la estandarización de un método de diagnóstico mediante la determinación de antígenos. En los primeros estudios, incluidos en este trabajo, se usaron anticuerpos monoclonales producidos por otro grupo de investigación. Los resultados obtenidos nos indujeron a realizar, de manera paralela, tres tipos de esfuerzos. Por un lado, iniciamos la producción de anticuerpos monoclonales contra el metacéstodo. En este documento se describen los resultados de dos de estos esfuerzos. Además de los aspectos relacionados al diagnóstico, estos experimentos nos permitieron observar aspectos básicos de la relación huésped-parásito. Por otro lado, se estudió la diversidad de antígenos presentes en muestras de suero y LCR de casos con diferentes características clínicas, como el número y la localización de los parásitos. En tercer lugar, se iniciaron estudios para evaluar los ensayos de captura de antígenos en comunidades endémicas.

La tesis tiene un formato tradicional: en la sección de antecedentes se revisa información de la literatura con relación a diferentes aspectos de la enfermedad. Tanto la sección de metodología como la de resultados contienen la información completa, misma que es analizada y comparada con los resultados de otros grupos de investigación en la sección de discusión. Finalmente, en el apéndice se anexan las publicaciones que sustentan el trabajo.

## ANTECEDENTES

### *ASPECTOS HISTORICOS*

La historia del conocimiento de la de cisticercosis fue descrita por Nieto en 1982. El texto que sigue se basa en esa revisión.

La cisticercosis fue reconocida primero por los antiguos griegos. Fue en los tiempos de Aristóteles en los años 384-332 a.C., en su "Historia de los animales" en donde se describe por primera vez la enfermedad en cerdos; sin embargo ellos no entendieron la naturaleza de esta parasitosis. Aristófanes de Atenas sugirió que el ser humano podría ser examinado de igual forma que los cerdos, es decir, forzándolo con un objeto a mantener la boca abierta y entonces sacarle la lengua para observar si se encontraba algún cisticerco en ella. Esta forma de diagnóstico para el caso de la cisticercosis porcina es utilizada hasta nuestros días.

La cisticercosis en cerdos fue asociada a la teniosis humana por Van Beneden en 1853, cuando le dio huevos de *Taenia solium* a un cerdo y tiempo después encontró numerosos cisticercos en todo su cuerpo. Kuchenmeister en 1855 demostró la asociación entre el desarrollo de la solitaria y el del cisticerco, cuando dio de comer carne con cisticercos a varios reos condenados a muerte, y observó la presencia de la forma adulta en el intestino después de la autopsia. Yoshino, en 1933, describió con gran detalle, el primer desarrollo de la cisticercosis en cerdos y también definió que se expulsan de 1 a 5 proglótidos grávidos por día después de que él mismo ingirió cisticercos y siguió su propia infección durante dos años.

La neurocisticercosis (NC) humana fue reportada primero por Rumler, en 1558, quien la describió como un tumor en la duramadre del cerebro de una persona epiléptica. Después Panarolus, observó cisticercos similares en el cuerpo calloso del cerebro de un sacerdote y

Wharton, encontró gran número de cisticercos a los cuales describió como glándulas en el tejido adiposo y muscular de algunos soldados. La enfermedad no fue considerada como una parasitosis hasta 1697, cuando Malpighi descubrió su naturaleza y describió el escólex; Goeze ignorante de estos reportes, examinó cerdos con cisticercosis e identificó su naturaleza helmíntica.

La clasificación genérica de "*Cysticercus cellulosae*" fue dada por Zeder y por Rudolphi, pero fue abolida cuando se conoció que el cisticerco era el metacéstodo de *T. solium*; sin embargo, el término de cisticerco tipo celuloso continua siendo usado de manera trivial para describir al organismo de este tipo encontrado en cerdos y en seres humanos.

Otra aportación importante de mediados de este siglo provino del seguimiento de un gran número de soldados británicos que vivieron en la India, y adquirieron neurocisticercosis. El hallazgo principal fue que el tiempo que transcurre entre la infección y la aparición de síntomas es, en promedio, 7 años, pero puede ser hasta de 30 (Dixon y Lipscomb, 1961).

### **ASPECTOS BIOLÓGICOS**

*T. solium* es un céstodo cyclophilydeo conocido comúnmente como "solitaria" en su forma de gusano adulto y en la forma de metacéstodo como "cisticerco". Este parásito es un céstodo hermafrodita con 3 estadios de desarrollo, dos de ellos parasitarios -adulto y metacéstodo- y uno que se encuentra en el ambiente -huevo- que contiene al embrión. En la figura 1 se esquematiza el ciclo de vida, el cual inicia con la forma adulta, que vive por periodos prolongados en el intestino delgado del ser humano (huésped definitivo) y se adquiere al consumir carne de cerdo insuficientemente cocida infestada con cisticercos viables. En el estómago del huésped, las enzimas y sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito que

evagina y se ancla en la pared intestinal por medio del órgano de fijación llamado escólex; éste cuenta con un ganglio nervioso y dos tipos de estructuras para fijarse al intestino, 4 ventosas y una doble corona de ganchos llamada rostelo. Después, continúa una parte delgada y alargada denominada cuello, a partir del cual se desarrolla el estróbilo; ésta es una región constituida por cientos de segmentos llamados proglótidos, que llega a medir entre 2 y 6 metros conformando un gusano adulto en aproximadamente 4 meses. Los proglótidos son de tres tipos: inmaduros, maduros y grávidos. Los que se encuentran más cercanos al cuello son los más jóvenes o inmaduros: continúan los maduros, cada uno de los cuales puede considerarse como un órgano de reproducción independiente pues ahí ocurre la fecundación y la producción de embriones. Los proglótidos más lejanos al escólex son los grávidos y contienen miles de huevos que son expulsados del intestino con las heces fecales, generalmente dentro de los mismos proglótidos.

Este parásito se alimenta a través del tegumento que es la capa superficial de los proglótidos, ya que carece de sistema digestivo desarrollado. El ciclo continúa cuando las heces que contienen los huevos son consumidas por el cerdo, huésped intermediario natural. Los huevos son microscópicos, miden aproximadamente  $30\mu\text{m}$  de diámetro; cuando son inmaduros están rodeados de una capa celular llamada vitelo, el cual, a su vez, rodea una estructura denominada embrióforo, que consiste en una serie de bloques proteicos que se encuentran unidos entre sí por una proteína cementante. Hacia adentro se encuentra la membrana oncosférica que cubre a la oncosfera o embrión hexacanto llamado así porque tiene tres pares de ganchos. Cuando los huevos entran al estómago del cerdo son activados por acción de las enzimas gástricas e intestinales, y se liberan los bloques embriofóricos debido a que se digieren la proteína cementante y la membrana oncosférica.

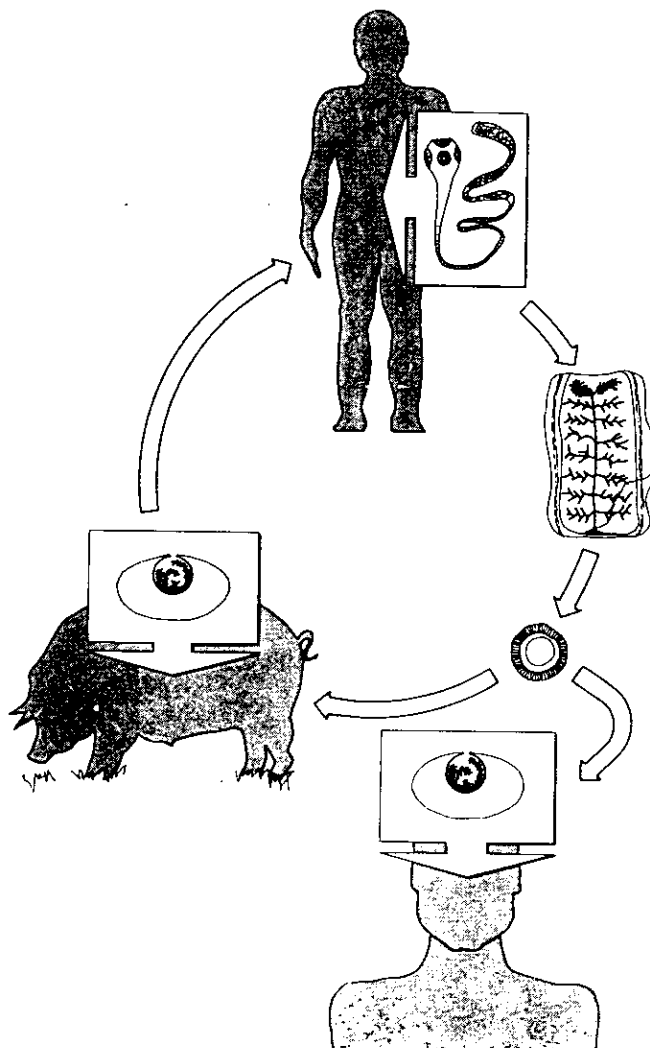


Figura 1. Ciclo de vida de *T. solium*. El adulto o tenia, se hospeda en el intestino delgado del ser humano, y produce los proglótidos grávidos, llenos de huevos, que se liberan con las heces al ambiente. El huésped intermediario, el cerdo, o accidentalmente el ser humano, se infectan por la ingestión de los huevos, los que después de aproximadamente 3 meses se desarrollan en cisticercos o metacéstodos. El ciclo se completa cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida contaminada con cisticercos, que al entrar en el aparato digestivo evaginan y se anclan en la pared intestinal para desarrollarse en adulto en 4 meses (tomado de Flisser, Madrazo y Delgado, 1997).

Los embriones, con la ayuda de sus ganchos y su actividad enzimática, pueden adherirse a la pared intestinal y atravesarla hasta llegar al torrente circulatorio o linfático, y por esta vía son difundidos a diversos órganos y tejidos como músculo, sistema nervioso central (SNC), ojo, o tejido subcutáneo (Atias, 1991). Ya establecidos, aumentan de tamaño y se diferencian convirtiéndose en cisticercos.

El cisticerco tipo celuloso es una estructura que mide de 0.5 a 1.5 cm, y por lo tanto, fácilmente visible; está compuesto de una vesícula que contiene fluido vesicular y al escólex invaginado. La membrana plasmática en la superficie de la pared vesicular está aumentada por una serie de proyecciones digitiformes llamadas microtricas. A través de esta superficie ocurre el intercambio metabólico e inmunológico entre el huésped y el parásito. En el cerdo produce poco daño aparente. El ciclo se completa por el consumo de la carne de cerdo contaminada con cisticercos viables por el ser humano y el desarrollo de una nueva tenia.

El ser humano adquiere la cisticercosis cuando accidentalmente consume alimentos o agua contaminada con huevos de *T. solium*, debido al fecalismo al aire libre, sobre todo en zonas rurales. También es posible que el individuo con teniosis se infecte a sí mismo, actuando así como huésped intermediario.

Existe una variedad morfológica especial de cisticerco sólo encontrado en el encéfalo de los seres humanos, denominado cisticerco racemoso; éste es una vesícula lobulada, que semeja un racimo de uvas (Rabiela-Cervantes, 1989). Al microscopio, se descubre que no existe escólex y que sólo consta de una pared vesicular muy desarrollada. El cisticerco de tipo racemoso parece ser una transformación del celuloso, pues se han descrito formas intermedias entre ambos tipos (Rabiela y Flisser, 1990). Las causas de este fenómeno se desconocen, pero sólo ocurre en los

parásitos que se localizan en las cavidades o en el espacio subaracnoideo y se asocia a una patología más grave y a una reacción inflamatoria mayor (Macías y Hernández Peniche, 1966; Rabiela-Cervantes, 1989).

## ***LA RELACION HUESPED-PARÁSITO***

### **La teniosis**

*T. solium* es un parásito que produce dos infecciones muy diferentes entre sí, tanto desde el punto de vista morfológico y patológico, como de la relación huésped-parásito. La teniosis es una parasitosis intestinal, mientras que la cisticercosis es una infección tisular. Los componentes del huésped que uno y otro estadio encuentran en su nicho ecológico, son distintos. La relación entre el metacéstodo y su huésped ha sido más estudiada que la del adulto pues, como se mencionó, el ser humano es el único huésped definitivo. Se han desarrollado modelos de teniosis en animales, pero la mayoría de éstos se han utilizado para estandarizar métodos de diagnóstico inmunológico de teniosis (Allan y col., 1990, 1992). Sólo recientemente se han iniciado estudios acerca de la interacción huésped-parásito en esta fase. Se ha observado que hámsteres infectados producen anticuerpos de clase IgG e IgA a las pocas semanas de infección. En cuanto a la reacción inflamatoria, se ha visto que los animales que no se tratan con corticoesteroides presentan gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares, especialmente células cebadas, cuya presencia ha sido relacionada con la expulsión del parásito adulto del intestino (Monroy-Ostria A y col., 1993).



## La cisticercosis

Debido a que es un parásito tisular, una de las características importantes del metacéstodo de *T. solium* es su interacción con el huésped en la interfase. Debido a que carece de sistema digestivo, los fenómenos metabólicos e inmunológicos entre huésped y parásito ocurren en esa zona. Por ello se ha estudiado la presencia de algunos componentes de la respuesta inmune a este nivel.

El ambiente en el que sobrevive un cisticerco en el tejido del huésped intermediario natural (el cerdo) y el accidental (el ser humano) tiene componentes de la respuesta humoral y de la celular. Hace varios años, Willms y Arcos (1977) demostraron la presencia de IgG porcina en la superficie de los cisticercos, mientras que se encontraron varias clases de inmunoglobulinas y C3b en la superficie de los cisticercos obtenidos de seres humanos (Correa y col., 1985). También se ha descrito una reacción inflamatoria compuesta por varios tipos celulares, entre los que destacan los eosinófilos y los macrófagos. Los primeros son los responsables de la destrucción del parásito después del tratamiento con drogas cestocidas, como el prazicuantel o cuando hay un “envejecimiento” de la interacción huésped-parásito. Los macrófagos se han involucrado en la limpieza de *debris* celulares. En esta reacción también se han observado linfocitos y células plasmáticas, lo que sugiere que existe la producción de anticuerpos y de linfocinas en el nivel local (Aluja, 1989; Flisser y col., 1990 a).

En relación con el efecto del complemento sobre los cisticercos se ha encontrado que los cisticercos son susceptibles al ataque del complemento *in vitro* (Correa y col., 1987). Todos estos datos indican que el metacéstodo está rodeado de componentes del sistema inmunológico y

sugieren que no es resistente a su ataque; por lo tanto, debe contar con mecanismos de evasión mientras la relación huésped parásito está en equilibrio.

Entre las hipótesis que existen con respecto a la evasión de la respuesta humoral, se encuentra la presencia de un receptor para la fracción Fc de las inmunoglobulinas. En este sentido, tanto los trabajos realizados en cerdos, como en seres humanos hacen suponer que las inmunoglobulinas adsorbidas a la superficie parasitaria podrían estar unidas a través de esta fracción (Willms y Arcos, 1977; Correa y col., 1985). Los estudios realizados por Hayunga y col. (1989) con el metacéstodo de *T. taeniaeformis*, y por Ambrosio con *T. crassiceps* (1994), indican que los cisticercos endocitan inmunoglobulinas (Igs), aunque no existe evidencia de que este proceso sea mediado por un receptor. Se tiene evidencia inmunoquímica de la presencia en el extracto crudo de *T. solium*, de un componente que une Igs y fragmentos Fc con 100 veces mayor avidéz que Fabs y que no une albúmina (Mandujano y col., 1990). En el modelo de *T. crassiceps*, Kalinna y MacManus (1993) purificaron y secuenciaron una molécula que se unió a IgG, y encontraron homología total con la paramiosina de *Schistosoma mansoni* y *T. solium*, lo que, de acuerdo a los autores, sugiere que esta molécula es multifuncional para evadir la respuesta del huésped. Sin embargo, debido a la estrategia utilizada por los autores, y a la afinidad de la paramiosina por el C1q (ver párrafo siguiente), este resultado pudo deberse a un artefacto.

Con respecto a la evasión del ataque del complemento, existen trabajos muy detallados del grupo de Lacleste y col. (1987, 1991, 1992), que han demostrado que el AgB, o paramiosina, es capaz de inhibir al C1q, pues tiene afinidad por la colágena (Plancarte y col., 1983), y por ende puede unirse a la parte colagénica de esta molécula (Lacleste y col, 1992). Incluso, en la actualidad se ha mapeado esta actividad inhibitoria, que se concentra en la porción amino terminal

(JP Laclette, comunicación personal). Es posible que el cisticerco produzca otras sustancias que inhiben al complemento, pues en ensayos de hemólisis tradicionales con un extracto carente de antígeno B, se encontró inhibición de la actividad del complemento (Gómez García, 1993). Hammemberg y Williams (1978) identificaron hace varios años un factor anti-complementario en extractos del metacéstodo de *T. taeniaeformis*, pero su composición química estaba relacionada con el ácido siálico.

Un análisis ultraestructural en la cisticercosis porcina, cuando los metacéstodos se observan en buen estado, reveló que algunos de los eosinófilos cercanos a la superficie tegumentaria están “degranulando” (Willms y Merchant, 1980); otra interpretación posible de la imagen es que estén siendo dañados por productos parasitarios. Con el fin de evaluar si el cisticerco produce sustancias que tienen un efecto lítico sobre eosinófilos, se llevaron a cabo experimentos de incubación de eosinófilos y macrófagos con extracto crudo o productos de excreción y secreción (ES) del metacéstodo *in vitro*. Se encontró que solamente los productos ES frescos afectan la viabilidad de los eosinófilos, mientras que ni los productos ES conservados en congelación ni el extracto crudo somático (EC) tuvieron efecto sobre su viabilidad. Por otro lado, no se observó efecto sobre la viabilidad de los macrófagos con alguno de los productos mencionados (Medina Escutia, 1992; Alvarado Rodríguez, 1995). Estos datos sugieren que los cisticercos liberan una sustancia lábil que daña a los eosinófilos cercanos, lo que les permite mantenerse libres de su ataque. Probablemente, cuando el equilibrio de la relación huésped-parásito se rompe, por efecto de tratamiento o la edad de los cisticercos, éstos dejan de producir la sustancia litica, y entonces son atacados por los eosinófilos.

Otro mecanismo de evasión propuesto es la producción de sustancias inmunosupresoras, tal como la molécula rica en RNA de bajo peso molecular, que disminuye la resistencia de los ratones a la infección por *Salmonella typhimurium* (Molinari y col., 1989), afecta la proliferación de linfocitos estimulados con concanavalina A *in vitro* (Molinari y col., 1990; Tato y col., 1995), y la reacción inflamatoria alrededor de cisticercos implantados de manera subcutánea en ratones (Tato y col., 1995). Recientemente también se describió el efecto de esta sustancia sobre la producción de interleucinas por linfocitos (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) y por macrófagos (TNF- $\alpha$ ) (Arechavaleta, Tato, Molinari, 1998). En este sentido es interesante mencionar que la frecuencia de linfocitos poliploides en los cerdos con cisticercosis es mayor a la de los animales no infectados, y, cuando los primeros son tratados con prazicuantel, la frecuencia de esta alteración cromosómica baja a los niveles de los animales no infectados (Flisser y col., 1990b). Por otro lado, algunos estudios con casos humanos sugirieron que los pacientes con cisticercosis presentan una menor respuesta proliferativa a mitógenos *in vitro*, que personas sanas (Correa y col., 1989c).

Los cisticercos que se alojan en el SNC podrían sobrevivir por periodos más prolongados que aquellos localizados en otros órganos, debido a que este órgano tiene cierto privilegio de la respuesta inmunológica (Barker y Billingham, 1977). Esta puede ser la razón por la que los parásitos pueden sobrevivir por periodos de 7 a 30 años en esta localización antes de ocasionar problemas neurológicos (Dixon y Lipscomb, 1961), y que la interfase observada, desde el punto de vista inmunológico, sea muy heterogénea entre diferentes pacientes con cisticercosis (Correa y col., 1985; Rabiela-Cervantes, 1989). Probablemente en los casos humanos, la relación huésped parásito sea de mayor duración, y diferente para cada caso, y de ahí derive la heterogeneidad encontrada.

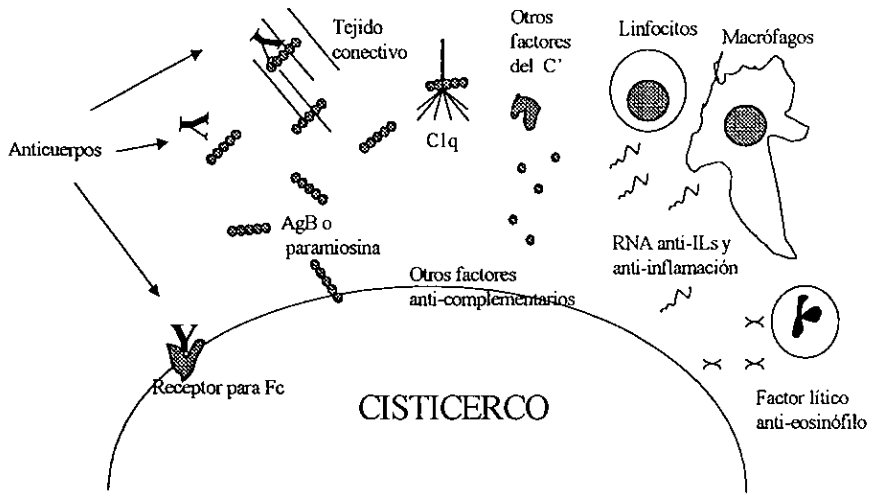


Figura 2. Algunos mecanismos de evasión inmune propuestos para el metacéstodo de *T. solium*.

En resumen, el cisticerco establecido en el tejido del huésped debe contender con diversos componentes de la respuesta humoral y celular para mantener el equilibrio; los mecanismos que se han sugerido, se esquematizan en la figura 2.

## **La respuesta inmunológica en el nivel sistémico**

La presencia de anticuerpos específicos en suero, LCR y saliva de los enfermos o los animales infectados fue demostrada hace bastante tiempo; estos estudios han estado ligados a la estandarización de métodos de diagnóstico pero también han revelado algunas características importantes de la respuesta inmune. Uno de los hallazgos más claros con respecto a la respuesta inmune humoral contra el cisticerco es que es heterogénea: el patrón de reconocimiento antigénico varía mucho entre pacientes probado por inmunolectroforesis (IEF) hace años y por inmunolectrotransferencia (IET) más recientemente (Flisser y col., 1980; Larralde y col., 1989). Esta respuesta es más homogénea cuando se usa una fracción de glicoproteínas (GPs) aisladas con lectina de lenteja (Tsang y col., 1989).

Con relación a las clases de anticuerpos, se ha encontrado que la IgG predomina (Flisser y col., 1980; Espinoza y col., 1986), lo que sugiere que cuando se presentan síntomas, este organismo tiene algún tiempo de estar en contacto con su huésped. También se han encontrado anticuerpos de otras clases: la IgM y la IgA se encuentran en cierta proporción de los casos, pero los anticuerpos específicos de clase IgE prácticamente no son detectables, a pesar de la demostración de niveles elevados de IgE total (Gorodezky y col., 1987).

Uno de los aspectos interesantes de la respuesta inmune en la cisticercosis es la compartimentalización del SNC con relación al resto del organismo, pues existe evidencia de síntesis intracraneal de anticuerpos de clase IgG en casos de neurocisticercosis (Cho y col., 1988); además, se pueden encontrar casos con anticuerpos de alguna clase exclusivamente en LCR o en suero (Espinoza y col., 1986). Estos hallazgos sugieren que la barrera hemato-encefálica

permanece inalterada, o se restaura después de un cierto periodo después de la infección en muchos de los casos.

El papel de los anticuerpos y del complemento en la protección o la destrucción de los diferentes estadios de *T. solium* no se conoce. El único modelo en el que se ha analizado la cinética de aparición de anticuerpos es el de *T. taeniaeformis* en ratones (Mitchell GF, 1982). La cinética de aparición de anticuerpos varía con la cepa del ratón, siendo más rápida en los animales resistentes; además los experimentos de transferencia pasiva mostraron que por lo menos en la rata el complemento y los anticuerpos tipo IgG2a son los componentes protectores (Williams y col., 1981). Más aun, se demostró transferencia pasiva de protección a través del calostro, mediada principalmente por IgA e IgG2a (Lloyd y Soulsby, 1978; Williams, Engelkirk y Lindsay, 1982). Por ende, la evidencia indica los anticuerpos y el complemento son los factores protectores que operan durante los primeros días de infección, antes de que el metacéstodo desarrolle los mecanismos para evadirlos. En los seres humanos por supuesto no existe un estudio cinético, pero los mecanismos de evasión que se han sugerido (ver componentes en la interfase) indican que el parásito, para sobrevivir debe evadir tanto los anticuerpos y el complemento como los componentes celulares de la respuesta inflamatoria.

El papel de la respuesta inmune celular sistémica es todavía menos claro, pues se hay pocos datos en la literatura. Ostrosky-Zeichner y col. (1996) demostraron que se producen IL-1 e IL-6 en el LCR de pacientes con cisticercosis que presentan reacción inflamatoria, aunque se desconoce si esta reacción es antígeno-específica, y si es en beneficio o detrimento del huésped. Algunos datos de proliferación celular y de producción de interleucinas por linfocitos periféricos de 40 pacientes y 40 testigos sanos, sugieren que existe respuesta contra el EC y el antígeno B

puro, así como algunos péptidos de éste; se puede demostrar la producción de IL-10 e IL-4 por lo menos en la mitad de los casos; se está analizando la producción de otras interleucinas (Medina, Morales, Correa y col., datos no publicados).

## ***ASPECTOS CLÍNICOS***

### **Sintomatología y tratamiento**

El daño que produce el cisticerco al ser humano cuando se establece en el SNC es variable: cierta proporción de los casos de NC humana son asintomáticos y sólo son identificados en estudios de autopsia (Macías y Hernández-Peniche, 1966; Rabiela-Cervantes., 1989). Entre los casos sintomáticos hay una enorme heterogeneidad en las manifestaciones clínicas, que pueden ser desde perturbaciones sensoriales o motoras leves, hasta la presencia de crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana, debido a la obstrucción de la circulación de LCR, que en ocasiones provoca la muerte (revisado por Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). La cisticercosis ocular, después de la cerebral, es la que más trastornos ocasiona, incluyendo ceguera (Cárdenas, 1992). En contraste con la humana, la cisticercosis porcina ha sido objeto de escasas descripciones clínicas, principalmente porque no induce alteraciones o son muy leves, a pesar de que en el cerdo esta parasitosis es frecuentemente masiva y afecta el SNC (González y col., 1987).

Hace muchos años la única opción de tratamiento de la neurocisticercosis humana era la quirúrgica, que a menudo era sólo de tipo paliativo y pocas veces se lograba la extracción del cisticerco (Escobedo, 1988). En la actualidad existen algunos medicamentos con efecto cestocida. Los más utilizados y estudiados en cuanto a su mecanismo de acción son el prazicuantel y el



albendazol (Sotelo y col., 1989). El uso de estas drogas ha sido de gran ayuda, sobre todo en casos con cisticercosis parenquimatosa y subaracnoidea. Actualmente, sin embargo, existe una polémica importante entre los clínicos. Una escuela opina que el tratamiento es de gran ayuda para los pacientes pues evita que las lesiones se calcifiquen y, por ende, se generen crisis convulsivas (Vázquez y Sotelo, 1992). Por otro lado, algunos autores refieren que los pacientes deben ser vigilados pero no tratados, pues han observado la desaparición espontánea de las lesiones, y aseguran que el tratamiento acelera una reacción inflamatoria muy severa, que es más benigna si se deja que ocurra de manera natural (Miller y col., 1983).

### **Diagnóstico clínico**

El problema principal del diagnóstico de la enfermedad cerebral, es debido lógicamente a la importancia e inaccesibilidad de este órgano. Afortunadamente, hace ya varios años empezó a utilizarse la tomografía computada (TC) para el diagnóstico de la cisticercosis humana por imagen (Rodríguez Carbajal y Boleaga-Durán, 1982). Este método revolucionó el diagnóstico de la neurocisticercosis pues permitió identificar casos quísticos sin necesidad de intervenciones dolorosas y peligrosas al paciente y mostró ser muy sensible en casos de localización subaracnoidea y parenquimatosa. Los pacientes con cisticercosis quística en los ventrículos pueden ser diagnosticados por este método sólo con el uso de medios de contraste en el LCR. En ocasiones esta técnica permite observar al escólex del parásito. Más recientemente, se empezó a utilizar la resonancia magnética (RM)(Ramos y col., 1986). Esta técnica presenta una mejor resolución y proporciona una imagen comparable a un corte anatomopatológico con lo que se

puede localizar una lesión y determinar su etiología con alta precisión. Desafortunadamente, estos dos últimos métodos de diagnóstico son inaccesibles para la mayoría de la población debido a su alto costo, especialmente para usos epidemiológicos.

En los cerdos no se ha descrito una signología que pueda permitir el diagnóstico clínico de la cisticercosis. La única herramienta que se usa en los rastros es la observación directa de los cisticercos, mediante un corte en los músculos tríceps y músculo ancóneo. El problema principal es el sacrificio de cerdos sin inspección sanitaria, pues en México la matanza clandestina es todavía frecuente. Por ello se ha hecho tema de investigación aplicada a la estandarización de métodos inmunológicos.

## ***INMUNODIAGNÓSTICO***

### **Determinación de anticuerpos en seres humanos**

Desde hace varias décadas se estandarizaron métodos inmunológicos para la determinación de anticuerpos en el LCR o en el suero de los pacientes (Nieto, 1948; Flisser y col., 1980; Diwan y col., 1982; Espinoza y col., 1986; Sotelo, 1987). A partir de entonces se han desarrollado múltiples pruebas inmunológicas que determinan la presencia de anticuerpos [revisado en 1986 por Flisser y Larralde y recientemente por Flisser, Madrazo y Delgado (1997)]. Algunas pruebas se utilizan como método de rutina para el apoyo del diagnóstico clínico. En general, se considera que la presencia de anticuerpos en el LCR confirma el diagnóstico de pacientes con síntomas o imágenes de TC o de RM compatibles con NC. La mayoría de las pruebas inmunológicas que se realizan utilizan un extracto crudo de los metacéstodos obtenidos

de carne de cerdo infectada, pero se han encontrado reacciones cruzadas con otros parásitos (Espinoza y col., 1986; Larralde y col., 1989; Vaz y col., 1997). Se han usado algunas fracciones puras o enriquecidas que disminuyen las reacciones cruzadas con otros parásitos; un ejemplo es el antígeno B, un antígeno inmunodominante que elimina las reacciones cruzadas contra algunos parásitos, pero que no permite el diagnóstico diferencial entre cisticercosis y varias helmintiasis, entre ellas, la hidatidosis (Espinoza y col., 1986) probablemente de reacción cruzada con otras enfermedades por céstodos, pues es un antígeno presente en muchos miembros de este Phylum (Olivo y col., 1988). Existe un método, estandarizado por Tsang y col. (1989) consistente en una IET que utiliza una fracción enriquecida con GPs del metacéstodo que contienen manosa; algunas de las GPs son específicas para el diagnóstico de cisticercosis, esto es, sólo dan reacción positiva con muestras de pacientes con cisticercosis. Una ventaja especial de este método es que es más sensible en suero que en LCR; además es un método que ha sido probado con muestras de saliva con bastante éxito (Feldman y col., 1990). La IET-GPs ha sido reproducida con éxito por diferentes grupos, que lo han valorado en poblaciones diferentes y en condiciones también distintas. La sensibilidad y la especificidad parecen ser cercanas al 100%. Además, esta prueba se puede utilizar para el diagnóstico de cisticercosis en cerdos vivos; en este sentido es interesante el hallazgo de la presencia de anticuerpos IgM contra bandas de alto peso molecular en las fases iniciales de infecciones experimentales en estos animales (Tsang y col., 1991). La desventaja principal de la IET-GPs es que requiere de cierto grado de equipamiento en el laboratorio que la ejecuta, y necesita de la preparación de las GPs, lo que es laborioso y requiere pericia en el laboratorio, su costo es elevado y su uso restringido. Una alternativa es el uso del extracto crudo buscando dos bandas de 8 y 26 kDa para hacer el diagnóstico específico (Larralde y col., 1989),

esto baja los costos de la prueba que usa las GPs. Cabe mencionar que recientemente se encontró que la GP 24 del método de Tsang reacciona con anticuerpos purificados con la banda de 26 kDa del EC y viceversa (Rodríguez-Canul y col., 1997). La utilidad de las pruebas basadas en la determinación de anticuerpos en grupos de pacientes neurológicos ha sido cuestionada, pues se ha observado un bajo VPP (Ramos- Kuri y col., 1992).

### **Búsqueda de anticuerpos en animales**

Existen algunos estudios de diagnóstico de cerdos por métodos inmunológicos. Se han probado varias pruebas como la inmunodifusión, la *IEF*, el ELISA, y más recientemente la IET con GPs (Cheng y Ko, 1991; Pathak y col., 1994; Rhoads y col., 1987; Tsang y col., 1991). Las bajas sensibilidades encontradas en los primeros años con los métodos de precipitación mejoraron con los ensayos inmunoenzimáticos. En algunos ensayos se han encontrado antígenos de peso molecular definido que son específicos para el diagnóstico de cisticercosis por *T. solium* (Pathak y col., 1994; Tsang y col., 1991). Un estudio muy interesante fue hecho en Perú con cerdos (Tsang y col., 1991): la sensibilidad de la IET-GPs es cercana al 100% en los animales infectados naturalmente; por otro lado, en infecciones experimentales encontraron la aparición de anticuerpos IgG contra las bandas diagnósticas 4 semanas después de la infección. Sin embargo, encontraron una respuesta específica de anticuerpos IgM contra un componente de 90kDa a los 14 días, lo que podría usarse para realizar diagnóstico más temprano.

## **Búsqueda de antígenos en seres humanos y animales**

La búsqueda de antígenos de LCR se inició con la prueba de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con un suero hiperinmune de conejo anti-EC (Velasco y col., 1983). De acuerdo con los autores, se obtuvo una especificidad del 97% y una sensibilidad del 77%, la cual aumentó al 88% en la segunda muestra, después de haber aplicado tratamiento antiparasitario con praziquantel a los pacientes debido, posiblemente, a la liberación de antígenos ocurrida por la muerte y posterior lisis del parásito. Posteriormente, se usaron ELISA y Dot-ELISA directos, en los que se adsorbe la muestra a la placa, y se revela con un anticuerpo policlonal de conejo anti-EC, y un conjugado específico para IgG de conejo. La sensibilidad en este caso varía entre 59 y 75% (Estrada y Kuhn, 1985; Tellez-Girón y col., 1987). A partir de estos trabajos pioneros han surgido algunos otros con este mismo objetivo: demostrar la presencia de antígenos en el LCR de pacientes con cisticercosis. Se han probado sistemas con anticuerpos monoclonales o policlonales, y métodos más modernos de separación de proteínas, como el HPLC. Las sensibilidades observadas oscilan entre 11 y 93%, dependiendo del sistema empleado (ver discusión y tabla VII de esta tesis). Se ha propuesto que este tipo de diagnóstico es útil para el seguimiento del tratamiento médico (Yonghao y col., 1995).

En estos trabajos se han buscado antígenos principalmente en el LCR; solamente se han probado antígenos en suero de seres humanos en un grupo de pacientes con epilepsia y en sus familiares en Burundi, África (Newell y col., 1997), pero no encontraron asociación entre los seroantígenos y las crisis convulsivas.

Los estudios en animales han puesto de manifiesto que es posible detectar antígenos y que éstos son buenos indicadores de infección activa, pues aparecen en circulación alrededor de las 2 semanas después de la infección, en el caso de conejos con *T. pisiformis* (Craig, 1984), o 10 semanas en el caso de bovinos con *T. saginata* (Harrison y col., 1989; Brandt y col., 1992). Además, los antígenos desaparecen muy pronto después del tratamiento antiparasitario, mientras que los anticuerpos persisten en ausencia de parásitos vivos durante varias semanas. En estos estudios también se ha demostrado la presencia de complejos inmunes que aparecen con los anticuerpos, usualmente una o dos semanas después de aparecer los antígenos. En cerdos los datos son escasos. Brandt y col. (1992) demostraron la presencia de antígenos reactivos a un anticuerpo monoclonal AcMc específico contra *T. saginata* en el suero de cerdos infectados naturalmente.

Se sabe poco del mosaico antigénico presente en los fluidos de los animales o los seres humanos con esta infección, y nada acerca de la relación entre el número de parásitos o su localización y la presencia de antígenos. Los estudios que existen al respecto indican que en el LCR de pacientes hay dos antígenos de 190 y 230 kDa, que también están presentes en el fluido vesicular del metacéstodo de *T. solium* (Estrada, Almon-Estrada y Kuhn, 1989).

## ***ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS***

### **Datos sobre la magnitud del problema**

La cisticercosis humana es una enfermedad que tiene importancia desde el punto de vista de salud pública en varios países en vías de desarrollo. Afecta a países como la India en donde es endémica, así como a países de Europa Oriental y de América Latina (Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). Sin embargo, no deja de afectar a países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica, aunque su ocurrencia es esporádica o local (Earnest y col., 1987; Schantz y col., 1992).

En México existen diferentes regiones donde las condiciones socioeconómicas, biológicas y culturales propician la transmisión de esta enfermedad. Esta es una zoonosis que representa un problema de salud pública, debido a que ocasiona graves daños a la salud humana y sobre todo porque afecta a individuos en edad económicamente activa, lo que trae consigo incapacidad para desarrollar actividades normales y productivas, teniendo consecuencias económicas para la familia y la sociedad. Además, en el caso de la cisticercosis porcina ocurren pérdidas cuantiosas en la porcicultura, ya que la inspección se hace post-mortem, y si se encuentra un cisticerco, la carne se pierde porque se decomisa e incinera.

La neurocisticercosis es una de las pocas parasitosis que ocupan un lugar preponderante entre las enfermedades del SNC en México. Por medio del análisis de casos de autopsia, se ha reportado una prevalencia de alrededor del 2% (Villagran-Uribe y Olvera-Rabiela, 1989). Cabe señalar, que en estos estudios, la cisticercosis fue causa de muerte en sólo una fracción de los

casos. Sin embargo, los estudios hechos en soldados ingleses sugieren que los casos asintomáticos finalmente presentan problemas clínicos después de un tiempo que varía entre 1 mes y 30 años (Dixon y Lipscomb, 1961). Desafortunadamente no se tienen estudios de series de autopsias más recientes, por lo que la prevalencia de casos con NC confirmada por patología se desconoce en la actualidad.

A partir de 1979 la cisticercosis se convirtió en una enfermedad de notificación obligatoria en México, lo cual ha dado lugar a que se detecte con mayor frecuencia y que el número de casos de pacientes con cisticercosis sea más cercano a la realidad, pese a que la sub-notificación sigue siendo uno de los problemas principales para la valoración del problema. Los casos de cisticercosis son reportados a la Dirección General Adjunta de Epidemiología de la Secretaría de Salud donde se tienen registrados desde 1975 (Sarti, 1989).

En la década de los años 70 empezaron a ejecutarse estudios seroepidemiológicos en México. El primero de ellos se realizó con muestras de suero del Estado de Oaxaca, utilizando la prueba de hemaglutinación pasiva (HP), encontrándose que el 3.2% de los individuos presentaban anticuerpos anti-cisticerco (Goldsmith y col., 1971). En 1976 en Chiapas se encontró que la prevalencia de anticuerpos por IEF era más alta en los asentamientos más pequeños (8%) que en los más populosos (2 %), lo cual concuerda con un ciclo principalmente rural que mantiene la transmisión en forma endémica (Flisser y col., 1976). Posteriormente Woodhouse, Flisser y Larralde (1982) dieron a conocer los resultados de IEF realizada para el análisis de la primera Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE), basados en una muestra representativa de todas las entidades federativas del país, de todos los estratos socioeconómicos y de asentamientos rurales y urbanos, la cual fue elaborada por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en



1974. Empleando aproximadamente 20,000 sueros se obtuvo una seropositividad del 1%, siendo la zona del Bajío, con 5%, la de mayor prevalencia. Entre 1987 y 1988, se llevó a cabo la segunda ENSE con casi 70,000 sueros. La seroprevalencia global usando hemaglutinación indirecta (HI) fue del 1.2%, con diferencias significativas entre Estados que variaron de 0.06 % a 3.0 %. (Larralde y col., 1992)

También se han estudiado factores de riesgo de tipo biológico, geográfico, social, económico, cultural y educativo, asociados a la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en suero. En 1984 en "El Sótano", Hidalgo, se hizo una encuesta para investigar antecedentes de teniosis y padecimientos neurológicos compatibles con NC. Además se realizó determinación de anticuerpos anti-cisticerco en suero por ELISA, de huevos de *Taenia* por análisis coproparasitológicos y búsqueda de cisticercos en cerdos por medio de la palpación de lengua. Los resultados mostraron una seropositividad del 3.4%, observándose que en familias donde había una persona seropositiva había un portador de tenia o alguien con sintomatología sugerente de NC (Sarti y col., 1988). Este fue el primer estudio donde se demostró que la teniosis-cisticercosis tiene un mecanismo de transmisión en forma de conglomerados, esto es, se requiere del contacto cercano con una persona infectada con el parásito adulto para estar en alto riesgo de adquirir cisticercosis. Esto fue muy importante ya que, si bien no se descarta que la contaminación indirecta de aguas y alimentos con huevos de *Taenia* puede contribuir a la transmisión, no es el mecanismo principal. Dicha información ha tenido utilidad en la propuesta de estrategias de control. Otros estudios han confirmado estas primeras observaciones. En "El Salado" Sinaloa, se determinó la presencia de huevos de *Taenia* spp por el método coproparasitológico de Faust y la presencia de anticuerpos por ELISA, encontrándose huevos en el 3.3% de las muestras procesadas, y siendo la

seropositividad del 11%. En dicho estudio también se encontró que convivir con un individuo portador del parásito adulto representa un riesgo para tener anticuerpos en suero (Díaz-Camacho y col., 1990). En La Curva, Novalto, Sinaloa, encontraron resultados similares, ya que la prevalencia de huevos de *Taenia* spp fue del 1.2% y la de anticuerpos por ELISA del 11%.; cabe destacar que esta última cifra fue de 28% entre los convivientes (Díaz-Camacho y col., 1991). Otro estudio hecho en Angahuan, Michoacán, reveló una seroprevalencia de 4.9% por IET-GPs, que se observó incrementada con la edad, siendo la mayor en el grupo entre 46 y 55 años (Sarti y col., 1994). De estos últimos estudios se concluyó que existen varios factores ambientales y del comportamiento humano que favorecen la transmisión (Sarti, 1989).

En la actualidad existen diversos trabajos realizados en comunidades, rurales en su mayoría, no sólo de México, sino de otras partes de América Latina (García y col., 1991; García Noval y col., 1996; Sarti y col., 1988, 1992, 1994; Schantz y col., 1992, 1994, 1996, 1997), que básicamente han confirmado los hallazgos de los primeros estudios. La transmisión de *T. solium* es un fenómeno que requiere contacto estrecho entre los portadores del adulto y los huéspedes intermediarios susceptibles, el ser humano y el cerdo. El otro aspecto es que aparentemente la prevalencia de la cisticercosis y la teniosis están sumamente subestimadas cuando se toman en cuenta los datos oficiales, pues las prevalencias encontradas en estas comunidades siempre han resultado ser mucho mayores. Se confirma que los hábitos y las malas condiciones de vida favorecen la transmisión en población abierta.

Un aspecto que ha sido escasamente analizado es la utilidad de las pruebas serológicas en estudios epidemiológicos. Se puede concluir que una prevalencia alta de anticuerpos en una comunidad dada, está relacionada con una alta prevalencia de teniosis y cisticercosis porcina, por

lo que la determinación de anticuerpos en suero es de utilidad para encontrar focos de transmisión. Sin embargo, para la identificación de casos, sólo en una ocasión se ha evaluado el potencial del ELISA y la IET en el nivel de población abierta: a los individuos seropositivos se les realizó TC, encontrándose que el VPP del ELISA o la IET-GPs, fue menor al 30% cuando se tomaron en cuenta las lesiones compatibles con cisticercosis cerebral como “prueba de oro”. Si se quieren identificar casos de cisticercosis este valor predictivo es bajo (Schantz y col. 1994).

### **La erradicación de *T. solium***

La comprensión del ciclo de vida de *T. solium* es muy importante para el diseño de estrategias de control, pues de él se desprende que el punto clave es la eliminación del parásito adulto, la tenia, aunque la erradicación de la cisticercosis porcina también es importante, pues evita nuevos casos de teniosis. Se considera que la teniosis y la cisticercosis pueden erradicarse, pues *T. solium* presenta una gran especificidad por su huésped: el adulto parasita exclusivamente al ser humano, mientras que el cisticerco es alojado únicamente por el cerdo. Los hallazgos de los estudios epidemiológicos de la última década han justificado un cambio en la estrategia de control empleada anteriormente; ésta se basaba en una distribución aparentemente difusa de los casos, y, por ejemplo, no se habían encontrado factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos (Woodhouse, Flisser y Larralde, 1982). Esto incluso dio lugar a un estudio de control en el Ecuador, basado en el tratamiento masivo para teniosis en las comunidades (Cruz y col., 1989). Sin embargo, una comunicación personal con uno de los investigadores de este grupo (Proaño Juan), confirmó que, si bien la prevalencia de teniosis y cisticercosis porcina disminuyeron significativamente después de 6 meses de haber “intervenido” en la comunidad, a los dos años

habían regresado a las cifras originales. Por otro lado, durante un estudio realizado en nuestro país, en el que se evaluó el tratamiento masivo como estrategia de control, se encontró una adolescente que desarrolló problemas neurológicos al ser sometida a la droga en las dosis usadas para teniosis, pues tenía neurocisticercosis asintomática (Flisser y col., 1993). Como se trataba de un estudio de investigación este problema se resolvió rápida y efectivamente, pero cabe tener presente este tipo de situaciones durante la aplicación de esta medida de control en gran escala, ya que se podría producir el equivalente a una iatrogenia pública.

La propuesta aceptada actualmente se basa en dos aspectos importantes (Sarti y col., 1997): el primero es el mejoramiento de la infraestructura sanitaria aunado a la educación para la salud, involucrando en el proceso a los miembros de la comunidad, para que las medidas tengan un efecto multiplicador y estabilizador de la “intervención”. El segundo es la identificación de casos de teniosis humana y de cisticercosis porcina y su eliminación. La teniosis humana es tratada médicamente con facilidad y éxito, como se describió anteriormente. Para el caso de la cisticercosis porcina existen por lo menos tres alternativas propuestas: la primera consiste en la identificación de la carne de cerdo infestada y su decomiso; sin embargo, esta estrategia presenta el problema de generar grandes pérdidas económicas a los propietarios de los animales, quienes generalmente tiene recursos limitados, por lo cual crían a los cerdos en condiciones que favorecen la transmisión de la cisticercosis. Por ello se han considerado otras dos opciones: una es la detección de cerdos infectados vivos y su tratamiento con una droga cestocida con suficiente antelación a la matanza (Flisser y col., 1990 a,b; González y col., 1996). De resultar efectivo, se podrían reducir pérdidas económicas al productor de la carne, aunque no existen estudios “beneficio-costo” de esto. La otra alternativa es preventiva: varios grupos están produciendo y

probando vacunas con el fin de evitar la infección con huevos de *T. solium* (revisado en Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). Aunque es posible que se pueda contar con una vacuna altamente protectora, esta estrategia también debe ser evaluada socioeconómicamente, teniendo en consideración que su aplicación sería en comunidades con alto grado de marginación, donde precisamente se mantiene la transmisión por carecer de condiciones de infraestructura sanitaria, motivación y educación necesarias para prevenirla.

La eliminación de la cisticercosis humana no tiene impacto directo sobre el control o erradicación de *T. solium*. Sin embargo, el comportamiento por conglomerados de la transmisión permite proponer que la detección de casos de cisticercosis humana nos permite encontrar focos activos de manera indirecta. Por otro lado, la identificación de casos de cisticercosis humana activa, de teniosis humana y de cisticercosis porcina, constituyen la base de la vigilancia del efecto de la medida de control aplicada sobre la transmisión a nivel de las comunidades. Para ello el diagnóstico de laboratorio se convierte en una herramienta imprescindible.

## JUSTIFICACION

La demostración de anticuerpos en los fluidos orgánicos de un huésped del metacéstodo de *Taenia solium*, es un indicador de que el paciente o el animal ha estado en contacto con el parásito, y representa un apoyo al diagnóstico clínico y de imagen de casos con problemas neurológicos. Sin embargo, los anticuerpos no sólo existen cuando hay infección activa, por lo que su presencia únicamente indica un contacto del sistema inmune del huésped con el parásito. La presencia de antígenos en los fluidos corporales puede ser un indicador más directo de la presencia del parásito vivo, por lo que su detección tendría utilidad para apoyar el diagnóstico clínico de casos de cisticercosis activa y el seguimiento del efecto del tratamiento médico. Para estudios epidemiológicos la detección de antígenos, tanto en seres humanos como en porcinos, es un buen indicador de que la transmisión está ocurriendo en una comunidad. Además, permite encontrar casos susceptibles de ser sometidos a tratamiento u observación médica. Los pocos estudios enfocados a la búsqueda de antígenos han estado limitados a su búsqueda en casos clínicos y sólo en una investigación en el suero. Además, de los resultados publicados no puede conocerse cuantos antígenos distintos hay en las muestras, así como su relación con el tipo, número y localización de los parásitos.

## **HIPOTESIS**

- Es posible detectar antígenos en el LCR y el suero de pacientes con neurocisticercosis activa, con mayor frecuencia en casos con cisticercosis múltiple.
- La detección de antígenos es una herramienta útil para la identificación de casos de cisticercosis activa en comunidades endémicas.

## **OBJETIVOS**

- Estandarizar un ensayo de captura de antígenos en LCR y suero para el inmunodiagnóstico de cisticercosis en seres humanos y cerdos.
- Analizar la presencia de antígenos en diferentes tipos de neurocisticercosis humana confirmada.
- Identificar los diferentes antígenos que pueden estar presentes en el suero y el LCR en casos de neurocisticercosis humana, y su relación con la localización, el número y el tipo de cisticercos.
- Determinar la utilidad de la detección de antígenos en suero para encontrar casos de cisticercosis activa entre individuos de poblaciones endémicas.

## **HIPOTESIS**

- Es posible detectar antígenos en el LCR y el suero de pacientes con neurocisticercosis activa, con mayor frecuencia en casos con cisticercosis múltiple.
- La detección de antígenos es una herramienta útil para la identificación de casos de cisticercosis activa en comunidades endémicas.

## **OBJETIVOS**

- Estandarizar un ensayo de captura de antígenos en LCR y suero para el inmunodiagnóstico de cisticercosis en seres humanos y cerdos.
- Analizar la presencia de antígenos en diferentes tipos de neurocisticercosis humana confirmada.
- Identificar los diferentes antígenos que pueden estar presentes en el suero y el LCR en casos de neurocisticercosis humana, y su relación con la localización, el número y el tipo de cisticercos.
- Determinar la utilidad de la detección de antígenos en suero para encontrar casos de cisticercosis activa entre individuos de poblaciones endémicas.



## MÉTODOS

### *GRUPOS ESTUDIADOS*

#### **Búsqueda de antígenos y anticuerpos en poblaciones de casos clínicos**

Grupo I. Se estandarizó el ensayo de captura con muestras de LCR de 30 pacientes con diagnóstico por imagen en TC simple y contrastada, o confirmados por cirugía, que presentaron anticuerpos por ELISA (Espinoza y col., 1986). Los testigos fueron 33 individuos con otros padecimientos neurológicos que ameritaron toma de LCR por otras razones. Tanto los casos como los testigos fueron pacientes del Departamento de Neurología y Neurocirugía del Centro Médico La Raza, IMSS (Miguel A. Sandoval e Ignacio Madrazo). Se determinó la presencia de antígenos mediante un ELISA de captura en el que se usaron 2 anticuerpos monoclonales producidos por Harrison y col. (1989), y dos anticuerpos policlonales producidos en cerdos por nuestro grupo de trabajo (Correa y col., 1989 a,b, ver Apéndice).

Grupo II. Constituido por pacientes con neurocisticercosis, diagnosticada por estudios de resonancia magnética y testigos similares a los del estudio anterior. Estos casos provinieron de la Clínica de Cisticercosis del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS (Jefferson Proaño y Ignacio Madrazo), de los que se conocía el tipo, localización y número de parásitos. A las muestras de LCR y suero obtenidas de estos pacientes se les hizo la determinación de antígenos por ELISA en dos ocasiones: un estudio preliminar con el AcMc producido por el Jim Allan (Correa y col., 1997, ver Apéndice), y un estudio con 103 casos y 65 testigos en los que se determinó la presencia de antígenos con dos sistemas de AcMc producidos por nosotros. Un subgrupo de estos casos fue estudiado por IET para identificar el número y peso molecular de los

antígenos presentes, tanto en suero como en LCR. En este último estudio se incluyeron muestras de suero de casos con otras enfermedades parasitarias: teniosis, hidatidosis, toxoplasmosis, triquinosis y toxocariosis (Mata-Ruiz y col., enviado, ver Apéndice).

Grupo III. Con el fin de determinar la utilidad de la determinación de antígenos para el diagnóstico de cisticercosis porcina se estudió un grupo de cerdos con cisticercos en lengua, y como testigos se emplearon animales provenientes de granjas altamente tecnificadas. El diagnóstico definitivo se estableció posterior a la necropsia, realizada para ambos grupos por Aline S. de Aluja (Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM). Se estudiaron las muestras con dos anticuerpos policlonales preparados por nuestro grupo y dos anticuerpos monoclonales (Rodríguez-del-Rosal y col., 1989, ver Apéndice)..

#### **Estudio transversal en población abierta:**

Grupo IV. Se llevó a cabo un estudio seroepidemiológico en una población abierta, semi rural, del Estado de San Luis Potosí, Municipio de Cerritos (Aranda-Alvarez y col., 1995, ver Apéndice). La población total era de 14,000 habitantes. Considerando una prevalencia de cisticercosis de 1.2%, según la última Encuesta Seroepidemiológica Nacional (Larralde y col., 1992), se determinó un tamaño de muestra de 900 individuos con el programa de cómputo EPI-INFO (CDC de Atlanta). El muestreo fue aleatorio simple, ajustando el número de individuos por localidad de manera proporcional al tamaño poblacional. A los individuos seleccionados se les hizo una encuesta que incluyó diversos aspectos de nivel de vida, hábitos alimentarios e

higiénicos. En este trabajo se probaron las muestras para antígenos usando anticuerpos policlonales de conejo contra un extracto crudo somático de cisticercos.

### **Búsqueda de antígenos en grupos de alto y bajo riesgo de una zona endémica**

Grupo V. Seleccionado del estudio epidemiológico que se llevó a cabo en tres comunidades de Morelos, México, dirigido por Elsa Sarti. Se emplearon 68 sueros de individuos que presentaban crisis convulsivas y 33 con teniosis, diagnosticada por medio de un ELISA para coproantígenos (Allan y col. 1990), y confirmada después del tratamiento cestocida. Estos grupos se consideraron de alto riesgo para cisticercosis. Se buscó un grupo de 133 individuos del mismo estudio epidemiológico, con el mismo rango de edad y la misma proporción de géneros y que no presentaran crisis convulsivas o teniosis. A los tres grupos se les determinó la presencia de antígenos por ELISA con anticuerpos policlonales (Correa y col., enviado, ver Apéndice), y por motivos de comparación, anticuerpos por IET-GPs (Tsang y col., 1989).

### ***MÉTODOS ESTADÍSTICOS***

Se llevaron a cabo análisis de asociación entre la presencia de antígenos en suero y la presencia de otros factores en los estudios de los grupos IV y V, utilizando la Razón de Momios como parámetro de asociación, y la Chi cuadrada, o Exacta de Fisher para verificar la significancia estadística de las asociaciones encontradas (Fleiss, 1983).

## **METODOS DE LABORATORIO**

### **Reactivos**

#### Preparación de extracto crudo (EC) de cisticercos de *Taenia solium*.

Se preparó un extracto salino crudo (EC), similar al descrito por Espinoza y col. (1986), preparándolo como sigue: los cisticercos se maceraron en un mortero y se añadió, por cada gramo, 0.5ml de agua destilada con los siguientes inhibidores de proteasas: fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) al 0.006%, para-hidroxi-mercuri-benzoato de sodio (PHMB) al 0.04%, L-1-tonsilamida 2-feniletíl-cloro-metil-cetona (TPCK) 50µg/ml, N-α-p-tonsil-lisina cloro-metil-cetona (TLCK) 50µg/ml. La formación de una suspensión homogénea se favoreció con 5 ciclos de congelación y descongelación de 15 min cada uno. Posteriormente se centrifugó a 20,000 xg durante 1 hora a 4°C. Al sobrenadante se le añadió 1/10 vol. de solución de fosfatos de sodio 0.1M, pH 7.2 (PB10x), y se guardó momentáneamente a 4°C; el precipitado se resuspendió en solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS), se sonicó dos veces a 7 Hz durante un minuto y se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente. Los sobrenadantes se mezclaron, y se les determinó la concentración de proteínas por el microensayo de Bradford (1976) empleando para esto un estuche comercial (Bio-Rad). El EC se fraccionó y se almacenó a -70°C hasta su uso.

### Preparación de los antígenos de excreción-secreción (ES) de cisticercos de *Taenia solium*

Los cisticercos fueron colectados, cuidando la integridad de la vesícula, y depositados en PBS estéril; se realizaron varios lavados en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, con PBS estéril suplementado con antibióticos concentrados (50 U/ml de penicilina G sódica y 50 µg/ml de estreptomina). Los cisticercos ya lavados fueron puestos en cultivo en medio RPMI (GIBCO) a 37°C; el medio se cosechó a las 18-24 horas y se añadieron inhibidores de proteasas para llegar a las concentraciones usadas para la preparación del EC. Los antígenos se concentraron por diálisis en membranas que excluyen moléculas mayores de 12 kDa y luego se dializaron contra PBS con inhibidores de proteasas, procediendo a determinar la concentración de proteínas, fraccionarlos y almacenarlos a -70°C, hasta su uso.

### Producción de anticuerpos policlonales (AcPc)

Se prepararon anticuerpos policlonales en cerdos y en conejos, utilizando el mismo protocolo de inmunización, a excepción de la dosis de antígenos: 5 y 1 mg de antígeno EC para cerdos y conejos, respectivamente, vía subcutánea, procurando inyectar en varias zonas cercanas a los ganglios dorsales. La primera dosis se inyectó mezclada con Adyuvante Completo de Freund (ACF); la segunda y la tercera dosis, con las mismas cantidades de antígenos que la primera, pero mezclados con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), se inyectaron por la misma vía. La cuarta y, en su caso, las subsiguientes dosis, fueron vía intramuscular en ausencia de adyuvante. A lo largo de la inmunización se midió la respuesta de anticuerpos por ELISA (ver más adelante). En

el momento en que el título de anticuerpos fue mayor a 1:50,000, los animales se sangraron a blanco por punción cardíaca. Los sueros fueron separados de la sangre de manera estándar, y almacenados a -70°C hasta la preparación de la fracción IgG (ver más adelante).

### Producción de anticuerpos monoclonales (AcMc)

HP10 y HP12. Los primeros anticuerpos monoclonales empleados en este trabajo fueron producidos por LJS Harrison y col., (1989). Estos anticuerpos eran de clase IgM y fueron producidos contra glicoproteínas de superficie del metacéstodo de *Taenia saginata*, presente también en *T. solium* (HP10), y contra un antígeno no caracterizado encontrado en el fluido vesicular de *T. solium* (HP12). Los anticuerpos fueron proporcionados en forma semi-pura: después de obtener líquido de ascitis de ratones Balb/c previamente inoculados con los hibridomas; por lo tanto, se llevó a cabo una precipitación con sulfato de amonio al 50%. Después de resuspender los anticuerpos en PBS y dializarlos exhaustivamente, se separaron dos fracciones, una de las cuales fue acoplada a biotina (ver producción de conjugados más adelante).

H7. El segundo anticuerpo monoclonal fue producido por Jim Allan y Philip Craig de Salford, Inglaterra: los ratones fueron inmunizados una sola vez por vía intraperitoneal con antígeno EC en presencia de ACF. Una semana después fueron desafiados con una segunda dosis de antígeno vía intravenosa y sacrificados 3 días después. Para la fusión celular se utilizó el mieloma X63Ag8.653 (Ag8). Los anticuerpos fueron tamizados por ELISA con un conjugado anti-IgM. Las líneas positivas fueron clonadas por dilución limitante. El hibridoma H7 se

seleccionó por ELISA y se definió que producía IgM y no reaccionaba de manera cruzada con *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Brugia malayi* u *Onchocerca volvulus*.

E7. Se prepararon anticuerpos monoclonales contra los ES del metacéstodo de *T. solium*, para lo cual se inmunizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de cinco a siete semanas de edad, con una primera dosis de 80 µg por animal, en presencia de ACF vía intraperitoneal, y tres dosis más de 40 µg cada una, a los 7, 14 y 21 días, por la misma vía con AIF. La última dosis de 40 µg se aplicó vía intravenosa, sin adyuvante al día 28, y tres días después se llevó a cabo la fusión celular utilizando el mieloma Ag8. Las líneas positivas fueron buscadas por medio de ELISA indirecto, usando un conjugado anti-inmunoglobulinas totales de ratón. Se clonaron las líneas positivas por dilución limitante, se expandieron en cultivo y se analizaron los sobrenadantes del cultivo por ELISA para determinar la subclase del anticuerpo.

4D9 y mezcla. En el segundo experimento de producción de anticuerpos monoclonales se repitió el protocolo descrito para el AcMc E7. La única diferencia fue que se usó el antígeno EC, en lugar de los ES para inmunizar a los animales.

#### Purificación de anticuerpos por afinidad.

La fracción IgG de todos los anticuerpos policlonales fue aislada por medio de una columna de afinidad de Proteína A de *Staphylococcus aureus* acoplada a Sefarosa (Sigma). Los sueros de los animales inmunizados se incubaron en la columna durante toda la noche a 4°C. La fracción inespecífica se eluyó con PBS pH 7.4, mientras que la fracción unida se separó de la columna con glicina 0.1M, pH 2.5. Las inmunoglobulinas se dializaron inmediatamente contra

PBS; se determinó la concentración de proteínas con el estuche comercial (Bio-Rad), se fraccionaron y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Una fracción de los AcMc fue acoplada a biotina (ver más adelante) y la otra utilizada para la captura en los ensayos inmunoenzimáticos correspondientes.

El AcMc H7 fue utilizado como sobrenadante de cultivo del hibridoma, por lo que no se purificó.

Los anticuerpos monoclonales de clase IgM se purificaron mediante una columna Affigel-Proteína A (Sigma), que retiene a la albúmina por carga eléctrica. La columna se equilibró con PBS, pH 8.2. El sobrenadante de cultivo fue tratado con NaOH 1M para ajustar el pH a 8.2 y se aplicó a la columna con un flujo de 0.6 ml/min. Las proteínas no adsorbidas se lavaron con la misma solución de equilibrio. La fracción rica en inmunoglobulinas fue eluida con solución de citratos 0.1M, pH 3.0, dializada contra PBS, cuantificada y fraccionada para su uso posterior.

#### Producción de conjugados con biotina

Algunos de los anticuerpos fueron acoplados a biotina siguiendo la técnica descrita previamente (Bayer, Skutelsky y Wilchek, 1979) ligeramente modificada. Las inmunoglobulinas se ajustaron a una concentración de 1.0 mg/ml y se dializaron contra solución de carbonatos 0.01M, pH 9.6. Cada mililitro de esta solución fue incubado en la obscuridad durante 4 horas con 200  $\mu\text{l}$  de una solución de dimetil sulfóxido que contenía 2 mg/ml del derivado N-hidroxi-metil-sulfóxido de biotina, y con agitación esporádica. Posteriormente se dializó exhaustivamente contra PBS, se fraccionó y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



## **ELISA para detección de anticuerpos producidos por cerdos, conejos y ratones**

La respuesta a la inmunización de los cerdos, conejos y ratones utilizados en estos trabajos fue evaluada por medio de ELISA. La estrategia general fue la misma, si bien las concentraciones de antígeno, las diluciones de las muestras de suero y los conjugados utilizados variaron de acuerdo al sistema.

Los pozos de las placas de ELISA se incubaron toda la noche a 4°C con 100 µl del antígeno (1 µg/ml de EC o 5 µg/ml de ES), en solución de carbonatos 0.01M, pH 9.6. Después de lavar exhaustivamente con 200 µl/pozo de Tween 20 al 0.05% en PBS (PBS-T), las placas fueron incubadas durante 1 h con 200 µl/pozo de solución bloqueadora, albúmina sérica humana o bovina al 0.1% en PBS-T, o bien, leche descremada (Sveltes) al 5% en PBS-T. Posteriormente, se añadieron 100 µl/pozo de la muestra de suero en diferentes diluciones hechas en PBS-T, para determinar el título de anticuerpos, y se incubaron a 37°C durante 1 a 2 h. Luego de lavar 5 veces con PBS-T se añadió el conjugado correspondiente (conjugados de peroxidasa anti-IgM, anti-IgG de ratón, anti-IgG de cerdo o anti-IgG de conejo), a la dilución óptima de trabajo, y se incubó a 37°C durante 1 a 2 h más. Después de lavar con PBS-T, se añadió la solución de substrato/cromógeno, que consistió en 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) / 4 mg de o-fenilendiamina (SIGMA) por cada 10 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1M. La reacción se detuvo con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La lectura de la placa se realizó en un lector de ELISA (Bio-Rad), a 490 nm.

## **ELISA para antígenos**

La determinación de antígenos se realizó con dos tipos de sistemas, uno homólogo y otro heterólogo. En todos los casos se incluyó una curva de diferentes concentraciones de antígeno de cisticerco en las placas, como testigo positivo de la reacción.

### Sistema homólogo

Los pozos fueron incubados con los anticuerpos policlonales (25 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) o monoclonales (2 a 10  $\text{ng/ml}$ ) disueltos en solución de boratos 0.1M, pH 8.6, durante toda la noche. Después de lavar exhaustivamente con PBS-T, se bloquearon los sitios reactivos libres con albúmina sérica bovina al 1.0% en PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras de suero y LCR fueron probadas a varias diluciones, resultando al final 1:3 y 1:9 las mejores para suero y 1:2 para LCR; todas fueron incubadas en PBS-T durante 2 h a 37°C. Después de lavar, se agregó el anticuerpo homólogo acoplado a biotina (el policlonal a 25 - 50  $\mu\text{g/ml}$ , y el monoclonal a 2 - 10  $\text{ng/ml}$ ) en PBS-T, incubándolos durante otras dos horas a 37°C. La reacción se reveló con estreptoavidina acoplada a peroxidasa (Sigma) a la dilución óptima en PBS-T, durante otras dos horas, a 37°C, y posteriormente con el mismo substrato descrito anteriormente.

### Sistema heterólogo

Con el anticuerpo monoclonal H7 se utilizó un sistema heterólogo. Aunque las reacciones y lavados fueron los descritos antes, hubo algunas diferencias: los anticuerpos de captura fueron AcPc de conejo a 25  $\mu\text{g/ml}$  y, después de las reacciones con las muestras y el anticuerpo monoclonal (sobrenadante de cultivo diluido 1:10,000), la reacción se reveló con un conjugado de

anticuerpos anti-IgM de ratón acoplados a peroxidasa, seguido de la solución substrato/cromógeno previamente descrita.

### **Inmunoelctrotransferencia para detección de antígenos de *Taenia solium***

Con el fin de identificar antígenos presentes en el LCR o el suero de casos de neurocisticercosis, se procedió a estudiar algunas muestras de casos confirmados por inmunoelctrotransferencia. Debido a la heterogeneidad en las concentraciones de proteínas de los LCR, se llevó a cabo la determinación de la concentración proteínas de cada LCR procedente de los casos y de un grupo de testigos. Se sometieron 50 µg de proteínas de cada muestra por carril de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 11%, en condiciones reductoras y no reductoras (Laemmli, 1970). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm de poro, de acuerdo al método de Towbin y col. (1979). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con leche descremada al 5% en PBS-T durante toda la noche a 4°C y luego de lavarlas con PBS-T, se incubaron con un antisuero de conejo hiperinmune contra el EC del cisticerco diluido 1:100 en PBS-T, durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Después de lavar, la reacción se reveló con un conjugado de peroxidasa acoplada a anticuerpos anti-IgG de conejo diluido 1:500, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% / 4,1-cloro naftol al 0.1% en PBS como solución substrato / cromógeno. La reacción se paró por lavados exhaustivos con agua.

## RESULTADOS

### PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se hicieron tres ensayos para producir AcMc. De ellos, en dos ocasiones se obtuvieron híbridos que produjeron anticuerpos contra antígenos del metacéstodo de *T. solium*. Los 2 ensayos se describen por separado a continuación:

#### Primer ensayo

En el primer experimento se indujo la producción de anticuerpos contra los productos de excreción-secreción (ES) del cisticerco. Se obtuvieron 6 líneas celulares que reaccionaron a los ES en ELISA (figura 3).

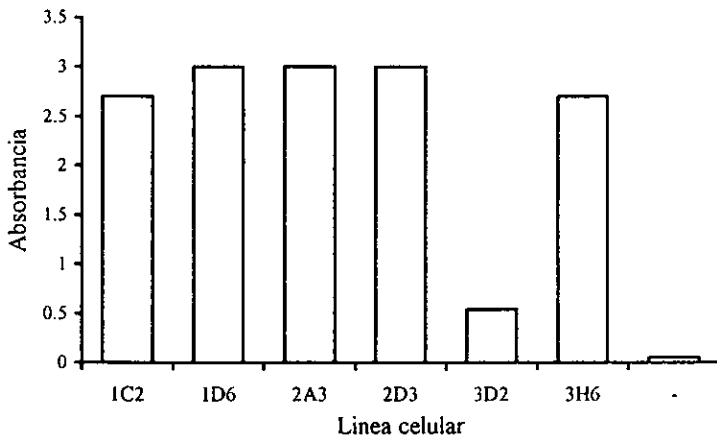


Figura 3. ELISA de captura de los anticuerpos producidos por las 6 líneas positivas contra los antígenos ES del metacéstodo de *T. solium*. El testigo negativo (-) fue el sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8 utilizado en la fusión celular.

Sin embargo, no todas las líneas fueron clonadas con éxito: cuatro de las líneas murieron durante el cultivo y otra perdió la capacidad de reaccionar durante la clonación. La línea restante fue clonada y subclonada; el nombre final de esta clona fue E7 y provenía de la línea 1D6; la clona produce anticuerpos de clase IgG1 (figura 4).

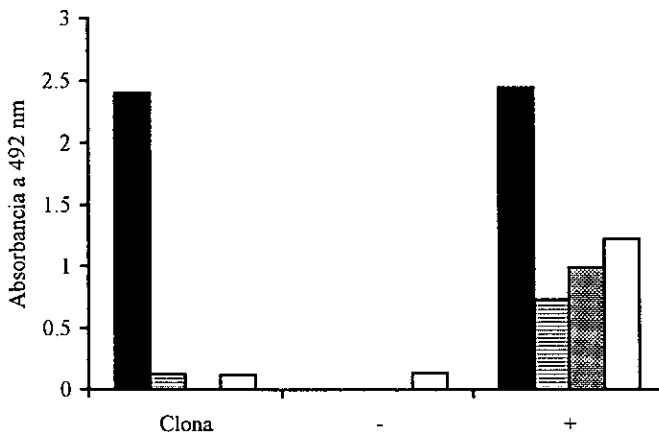
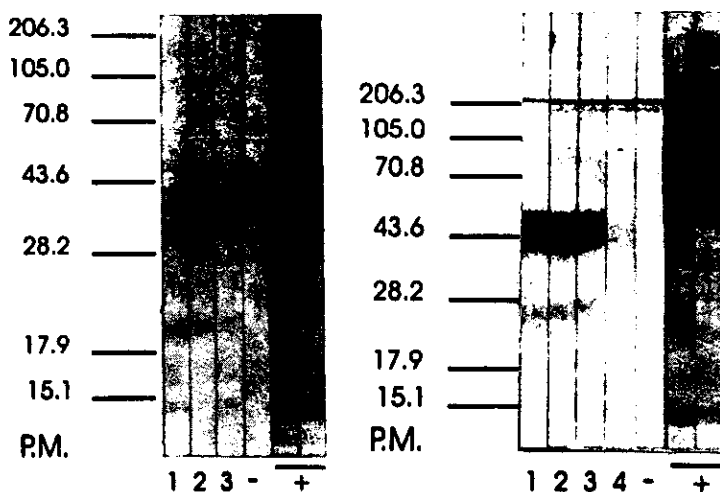


Figura 4. Determinación de la subclase del anticuerpo E7 reactivo con los ES del cisticerco de *T. solium*. Los conjugados empleados fueron específicos de IgG1 (barras moteadas), IgG2a (barras negras), IgG2b (barras grises), IgG3 (barras blancas). Los testigos corresponden al sobrenadante de cultivo de mieloma no productor de anticuerpos (-) y un suero positivo de ratón (+).

En ensayos de IET se observó que la clona E7 producía anticuerpos que reaccionan con bandas de bajo peso molecular, de 15, 20, 25 y 28 kDa en condiciones reductoras, y 3 bandas de 25, 43 y 50 kDa en condiciones no reductoras de los ES (figura 5). Se procedió a estandarizar un ELISA de captura de antígenos, usando el AcMc para captura y un AcPc de conejo para revelar.

En vista de que se obtuvo reacción positiva con algún componente presente en sueros normales de seres humanos y ausente en LCR (figura 6), se estudió la reactividad del anticuerpo en IET, usando como antígeno suero humano normal. Se observaron dos bandas de 70 y 100 kDa sólo en condiciones reductoras (figura 7).



*Figura 5. Inmunolectrotransferencia de la reacción del AcMc E7 contra los ES del cisticerco. A la izquierda se muestra el antígeno sometido a electroforesis en condiciones reductoras y a la derecha en condiciones no reductoras. Los carriles 1, 2, 3 y 4 tienen diferentes diluciones del sobrenadante de cultivo de la clona; el negativo (-) muestra la tira incubada con PBS en lugar del anticuerpo, mientras que los testigos positivos (+) corresponden a antisueros de ratón específicos contra el ES (primero) y el EC (segundo).*

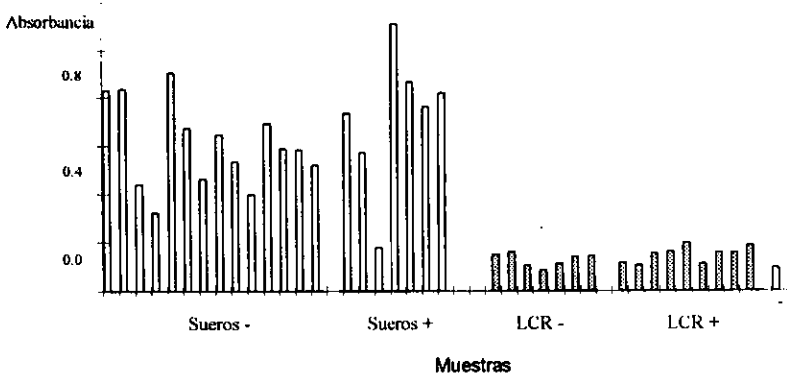


Figura 6. Ensayo de captura de antígenos usando el AcMc E7 frente a sueros y LCRs de pacientes (+) y testigos negativos (-). La barra de la extrema derecha (-) representa el valor obtenido usando PBS en lugar de las muestras.

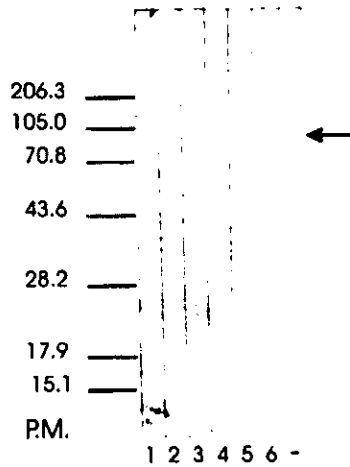
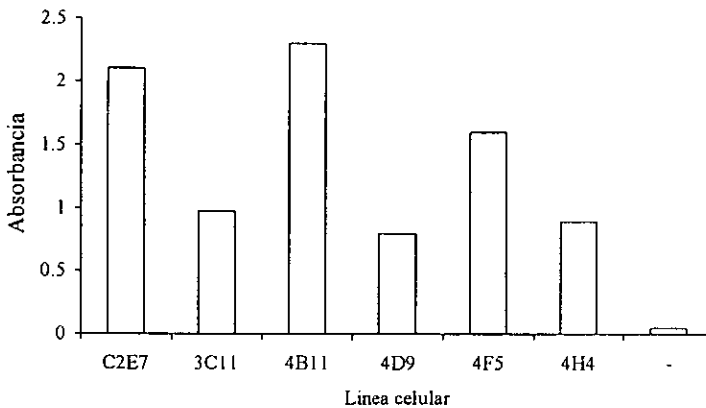


Figura 7. IET de suero humano normal sometido a electroforesis en condiciones reductoras y revelado con el AcMc E7 en 6 diluciones diferentes (carriles 1-6). El último carril (-) es el testigo incubado con sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8. La flecha señala dos bandas presentes sólo cuando se reveló con el AcMc, ausentes en la tira testigo.

Se probó su reacción con algunos antígenos puros de mamíferos habiendo respuesta contra el fibrinógeno humano obtenido de fuente comercial por ELISA (no se muestra). Estos resultados nos indicaron que el anticuerpo E7 reaccionaba con proteínas del huésped, por lo que este anticuerpo se descartó para fines de diagnóstico.

### Segundo ensayo

El siguiente intento para producir AcMc en contra de antígenos del parásito, se hizo inmunizando con el EC. Se obtuvieron 7 líneas positivas (figura 8), que fueron expandidas, clonadas y subclonadas; todas las clonas produjeron anticuerpos de clase IgM (figura 9).



*Figura 8. ELISA de captura de los anticuerpos producidos por las 6 líneas positivas contra el EC del metacéstodo de T.solium. El ensayo se reveló con conjugado anti-inmunoglobulinas totales de ratón. El testigo negativo (-) fue el sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8 utilizado en la fusión celular. Los resultados de la línea 5B4 no se muestran (ver adelante)*



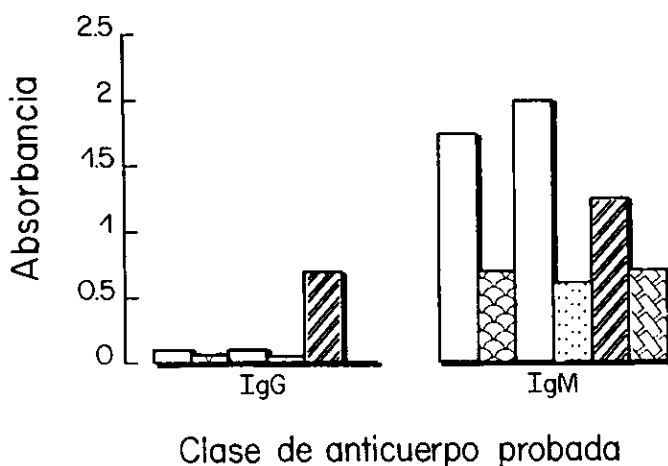


Figura 9. Determinación de clases de los anticuerpos monoclonales que reaccionaron con el EC del cisticerco de *T. solium*. Las clonas probadas, de izquierda a derecha, fueron: C2E7, 3C11, 4B11, 4D9, 4F5 y 4H4. Los resultados de la clona 5B4, eliminada, no se muestran (ver más adelante).

Debido a la experiencia anterior, además de llevar a cabo ensayos de reacciones cruzadas con otros parásitos (tabla I), se probó la reacción de las clonas contra suero humano y un extracto crudo de músculo de cerdo no infectado (figura 10). Seis de las siete clonas fueron específicas de género, ya que sólo reaccionaron con extractos o ES de tenias o de cisticercos de *T. saginata*, *T. solium* y *T. taeniaeformis*. Los anticuerpos secretados por la clona 5B4 reaccionaron con todos los antígenos probados, por lo que esta clona se excluyó del estudio. Cabe mencionar que tanto el EC como ES de adulto de *T. solium* fueron preparados de tenias de hámsteres infectados experimentalmente. La clona 4F5 perdió su capacidad de producir anticuerpos durante el cultivo, por lo que se continuó con 5 clonas los ensayos de estandarización para captura de antígenos.

Tabla I. Evaluación de reacciones cruzadas de los AcMc anti EC del cisticerco de *T. solium* por ELISA.

| Tipo y fuente de antígeno                             | Absorbancia obtenida con el anticuerpo: |      |      |       |      |      |     |
|---|---|------|------|-------|------|------|-----|
|   | 2E7                                     | 3C11 | 4B11 | 4D9   | 4F5  | 4H4  | 5B4 |
| EC cisticerco <i>T. solium</i>                        | 1.5                                     | 1.2  | 1.2  | 1.0   | 0.05 | 0.7  | 1.4 |
| EC adulto <i>T. solium</i>                            | 0.4                                     | 0.05 | 0.0  | 0.2   | 0.0  | 0.03 | 1.2 |
| ES** adulto <i>T. solium</i>                          | 0.6                                     | 0.02 | 0.01 | 0.1   | 0.01 | 0.05 | 1.7 |
| EC* adulto <i>T. saginata</i>                         | 1.2                                     | 1.15 | 1.4  | 1.5   | 0.25 | 1.3  | 0.6 |
| EC adulto<br><i>T. taeniaeformis</i>                  | 0.2                                     | 0.01 | 0.0  | 0.01  | 0.02 | 0.0  | 1.4 |
| EC cisticerco<br><i>T. taeniaeformis</i>              | 0.2                                     | 0.0  | 0.01 | 0.1   | 0.02 | 0.03 | 0.8 |
| EC <i>Macracanthorhynchus</i><br><i>hirrudinaceus</i> | 0.0                                     | 0.0  | 0.01 | 0.005 | 0.0  | 0.0  | 0.7 |
| EC <i>Fasciola hepatica</i>                           | 0.0                                     | 0.0  | 0.01 | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 0.9 |
| EC <i>Ascaris suum</i>                                | 0.01                                    | 0.0  | 0.02 | 0.0   | 0.0  | 0.0  | 1.2 |
| EC <i>Trichinella spiralis</i>                        | 0.08                                    | 0.0  | 0.01 | 0.0   | 0.0  | 0.02 | 1.4 |

\* EC: extracto crudo. \*\* ES Productos de excreción secreción

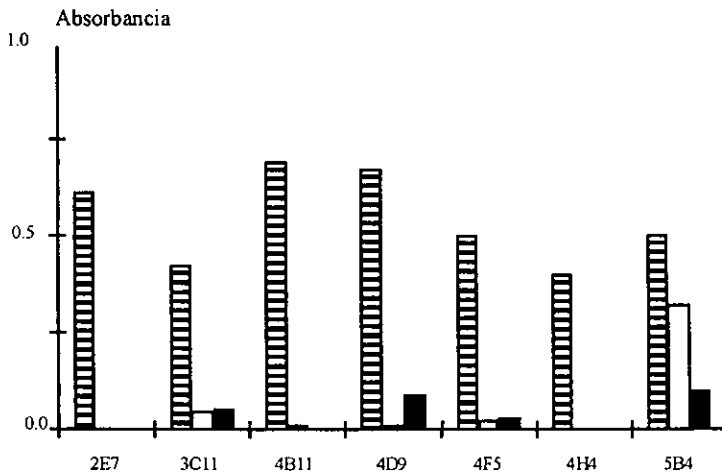


Figura 10. Evaluación de la reactividad de los anticuerpos contra el EC (barras rayadas), extracto crudo de músculo de cerdo (barras blancas) y suero humano normal (barras negras) por ELISA de captura de anticuerpos. Los tres antígenos fueron usados a una concentración de  $10 \mu\text{g/mL}$ .

A partir de los sobrenadantes de cultivo de estos hibridomas, se purificaron los anticuerpos de clase IgM por filtración en gel. Con los anticuerpos puros, se estandarizaron las condiciones óptimas para el sistema de captura de antígenos. Se realizaron ensayos tipo dosis-respuesta, usando los diferentes AcMc para capturar los antígenos y AcPc anti-EC de conejo marcado con biotina para revelar (figura 11). El anticuerpo 4D9 presentó una reactividad alta en comparación con los otros, mientras que el anticuerpo 4H4 no presentó un efecto dosis-respuesta, por lo que ya no fue usado para los ensayos con las muestras de casos. En resumen, quedaron 4 anticuerpos potencialmente útiles: 4D9, 2E7, 3C11 y 4B11. Se hicieron ensayos de captura de antígenos con el 4D9 solo y la mezcla de los otros 3 anticuerpos; como se observa en la figura 12,

hay un efecto aditivo de las respuestas individuales de éstos. Debido al efecto encontrado, los ensayos con muestras de pacientes se hicieron por un lado, con la mezcla de los 3 anticuerpos y, con el anticuerpo 4D9 solo.

Las 4 líneas restantes fueron evaluadas por IET, para determinar su patrón de reconocimiento (figura 13). En condiciones no reductoras, se observó que las clonas 2E7 y 4D9 reaccionaron con bandas de alto peso molecular, similar; en contraste las clonas 3C11 y 4B11 presentaron un patrón de reconocimiento único. Los anticuerpos de la clona 4B11 reaccionan cuando menos con 3 antígenos distintos en condiciones no reductoras, mientras la clona 3C11 reaccionó con una sola banda de aproximadamente 85 kDa. Los anticuerpos de la clona 4D9 son específicos para antígenos de peso molecular mayor a 150 kDa. Tanto esta clona como la 2E7 reconocen 3 moléculas de 45, 70 y 105 kDa en condiciones reductoras, mientras que las otras dos clonas dieron lugar a una banda principal cercana a 150kDa.

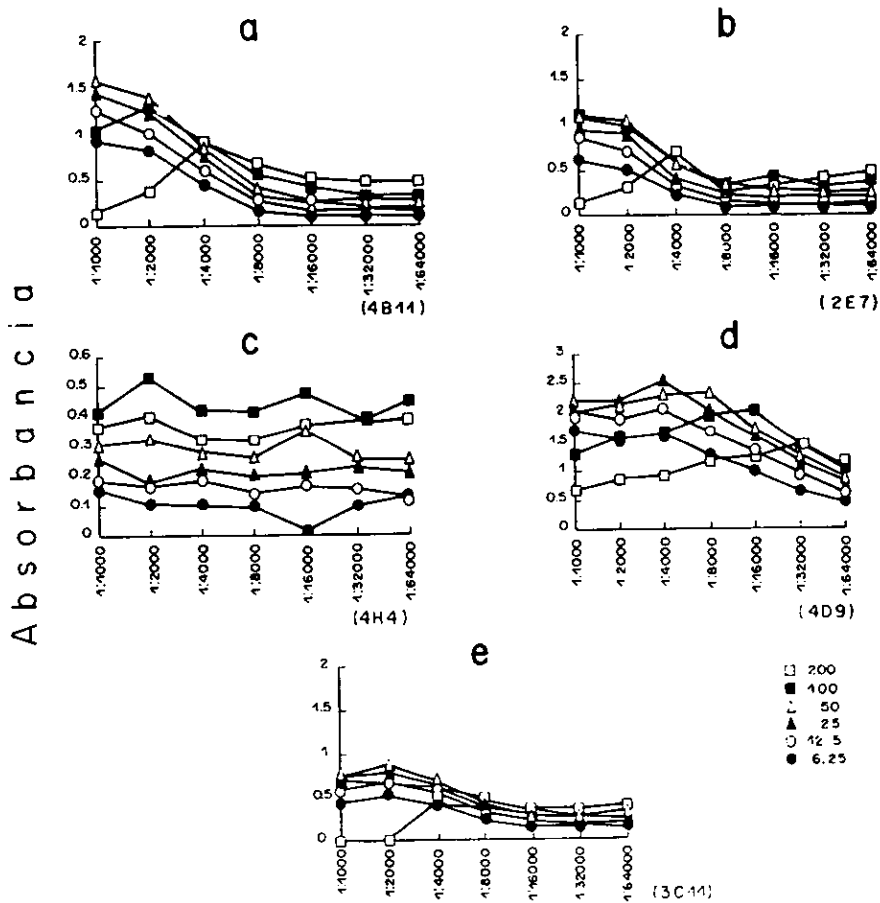


Figura 11. Ensayos de captura de antígenos con cada anticuerpo monoclonal. En el ensayo se colocaron diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal (concentración original 1 mg/ml) y después de los lavados y el bloqueo, se colocaron diferentes concentraciones de EC de *T. solium* (marcados en el recuadro en µg/mL). Después se reveló con un AcPc de conejo contra el EC, y un conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa.

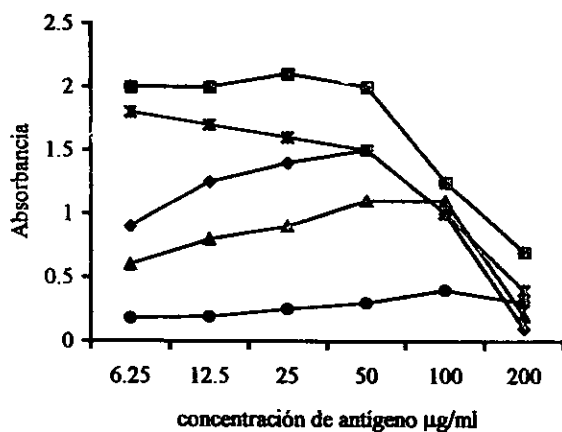


Figura 12. Ensayos de captura tipo dosis-respuesta, con los anticuerpos de las clonas 4D9 (cuadros), 2E7 (triángulos), 3C11 (círculos), 4B11 (rombos), o la mezcla de los 3 últimos (estrellas). Los ensayos fueron equivalentes a los descritos en la figura 12.

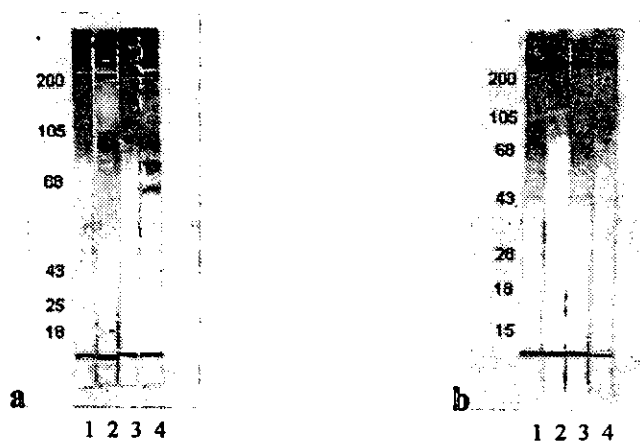


Figura 13. IET en condiciones no reductoras (a) y condiciones reductoras (b) del EC del metacéstodo de *T. solium*, revelado con los anticuerpos de las clonas 2E7 (1); 3C11 (2); 4D9 (3); y 4B11 (4).

## BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS EN SUERO Y LCR DE PACIENTES Y CERDOS

### Búsqueda de antígenos por ELISA

#### Ensayos con los AcMc HP10, HP12 y AcPc de cerdo

El primer ensayo de búsqueda de antígenos por ELISA se realizó con los AcMc HP10 y HP12, proporcionados por L Harrison y RME Parkhouse (Mill Hill, Inglaterra) y los AcPc anti-EC y anti-AgB, producidos por nuestro grupo en cerdos. El HP10 fue positivo con el 79% de los sueros de cerdos con infecciones naturales; este valor aumentó a 90% inmediatamente después de haber tratado a los animales con praziquantel (Rodríguez-del-Rosal, Correa y Flisser, 1989, ver Apéndice). El HP12 y ambos AcPc dieron resultados negativos con estas mismas muestras (figura 14). La especificidad obtenida con el HP10 fue del 100%.

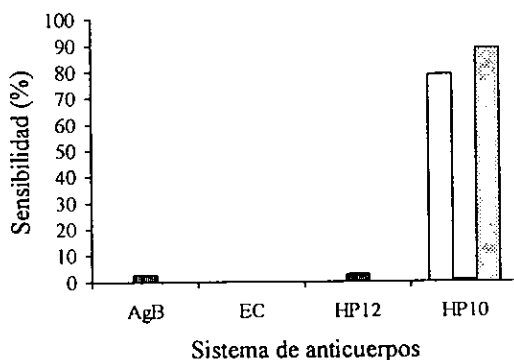


Figura 14. Determinación de antígenos en sueros de cerdos infectados naturalmente antes (barras blancas) y después de tratamiento con praziquantel (barras grises), así como de cerdos sanos (barras negras). Se usaron 4 anticuerpos: AgB: anticuerpos policlonales de cerdo contra el antígeno B; EC: anticuerpos policlonales de cerdo contra el extracto crudo del cisticerco; HP12: anticuerpos monoclonales contra un componente de fluido vesicular de *T. solium*; HP10: anticuerpos monoclonales contra un componente de superficie y excreción-secreción de *T. saginata*.

Para la cisticercosis humana se encontró una sensibilidad del 72% en LCR con el uso del AcMc HP10 (figura 15). La sensibilidad obtenida con otros anticuerpos fue de 14% a 48%. Por otro lado, sumando los resultados obtenidos con los diferentes sistemas, se observó que la sensibilidad puede llegar a un 93%. La especificidad en este ensayo fue del 100%, pues ninguno de los 24 casos con otros problemas neurológicos presentó valores por arriba del punto de corte (Correa y col., 1989a, 1989b, ver Apéndice).

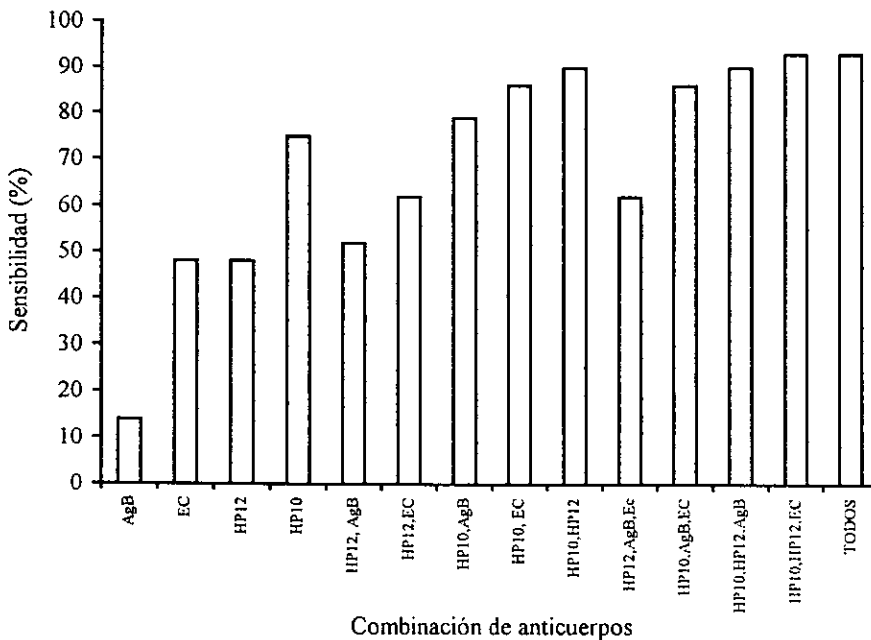


Figura 15. Determinación de antígenos en líquido cefalorraquídeo de seres humanos con neurocisticercosis. Se usaron 4 sistemas distintos de anticuerpos: AgB: anticuerpos policlonales de cerdo contra el antígeno B; EC: anticuerpos policlonales de cerdo contra el extracto crudo del cisticerco; HP12: anticuerpos monoclonales contra un componente de fluido vesicular de *T. solium*; HP10: anticuerpos monoclonales contra un componente de superficie y excreción y secreción de *T. saginata*. La sensibilidad cambia, si se usa dos, tres o los cuatro sistemas de anticuerpos en cada muestra.



### Ensayo con el AcMc H7

Con el fin de probar el potencial diagnóstico del anticuerpo monoclonal producido por Jim Allan (AcMc H7), se evaluaron muestras de LCR y suero de 25 pacientes con neurocisticercosis (tabla II). Se encontró una sensibilidad global de 52% en LCR y de 44% en suero, siendo más sensible en el caso de cisticercosis activa que en la inactiva, aunque no hubo diferencias significativas con relación al número de quistes. De hecho, en suero el ensayo fue más sensible en caso de lesión única que con lesiones múltiples.

*Tabla II. Determinación de antígenos en LCR y suero de pacientes con NC por ELISA de captura con el anticuerpo monoclonal H7*

| Número y tipo de cisticercos  | n  | Número de positivos |     | Número de positivos |     |
|-------------------------------|----|---------------------|-----|---------------------|-----|
|                               |    | en LCR              | (%) | en suero            | (%) |
| Calcificaciones               | 4  | 0                   | 0   | 0                   | 0   |
| Un quiste*                    | 5  | 3                   | 60  | 4                   | 75  |
| Varios quistes                | 16 | 10                  | 62  | 7                   | 44  |
| Total de cisticercosis activa | 21 | 13                  | 62  | 11                  | 52  |
| Total                         | 25 | 13                  | 52  | 11                  | 44  |

\* Dos de los casos tenían además calcificaciones.

### Ensayos con los AcMc 4D9, y la mezcla de AcMc

Se evaluaron 103 casos con NC y 65 casos de individuos con otros problemas neurológicos (Tabla III). Los sistemas de anticuerpos usados en los ensayos para captura de antígenos dieron muy baja sensibilidad: la más alta fue casi 13% en LCR, con el anticuerpo monoclonal 4D9, con una proporción de falsos positivos de 1.5% en esa misma muestra. Los anticuerpos de la mezcla detectaron antígenos en muy pocos sueros de casos con NC activa.

*Tabla III. Determinación de antígenos en suero y LCR de pacientes con NC y testigos*

| Grupo<br>tipo y número de<br>lesiones | n   | Porcentaje de muestras positivas a la detección de<br>antígenos con: |     |     |              |     |      |
|---------------------------------------|-----|--|-----|-----|--------------|-----|------|
|                                       |     | MEZCLA*  |     |     | 4D9          |     |      |
|                                       |     | suero<br>1:3   | 1:9 | LCR | suero<br>1:3 | 1:9 | LCR  |
| Testigos negativos                    | 65  | -  | -   | -   | 1.5          | 1.5 | 1.5  |
| NC<br>Calcificaciones                 | 5   | -  | -   | -   | -            | -   | 2.0  |
| NC<br>Un quiste                       | 31  | 3.2  | -   | 3.2 | 6.5          | 6.5 | 16.1 |
| NC<br>Quistes múltiples               | 67  | 1.5  | 3.0 | 1.5 | -            | -   | 4.5  |
| NC activa global                      | 98  | 2.4  | 1.5 | 2.4 | 3.2          | 3.2 | 10.3 |
| NC global                             | 103 | 1.8  | 1.1 | 1.8 | 2.4          | 2.4 | 12.7 |

\* La mezcla consistió de los anticuerpos monoclonales 2E7, 3C7 y 4B11

## **Búsqueda de antígenos por Inmunolectrotransferencia**

Se buscaron antígenos en el suero y el LCR de un grupo de pacientes con NC de diferentes tipos mediante IET (Mata-Ruiz y col., ver Apéndice). Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, en condiciones reductoras y no reductoras, y se revelaron con AcPc contra el EC, con el fin de poner en evidencia cualquier antígeno presente en las muestras.

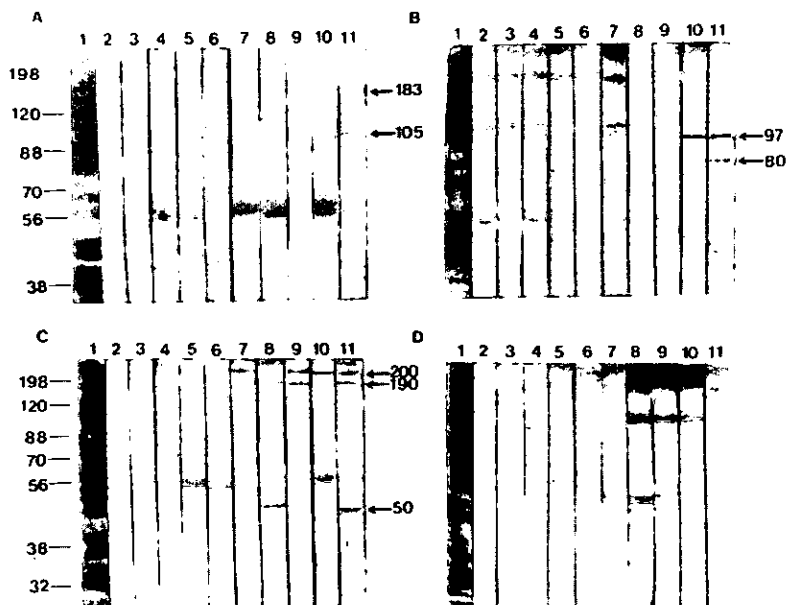
En la figura 16 se muestran las IET de los sueros y LCRs analizados; en algunas muestras de LCR se encontraron 3 bandas, solamente en condiciones reductoras. La banda dominante tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa; también se observaron dos bandas de 190 y 50 kDa en cierta proporción de las muestras. No se encontraron bandas en condiciones no reductoras.

Los sueros presentaron dos bandas de 183 y 105 kDa en condiciones reductoras y 2 bandas de 97 y 80 kDa en condiciones no reductoras. La banda de 183 kDa fue encontrada en las 2 muestras positivas.

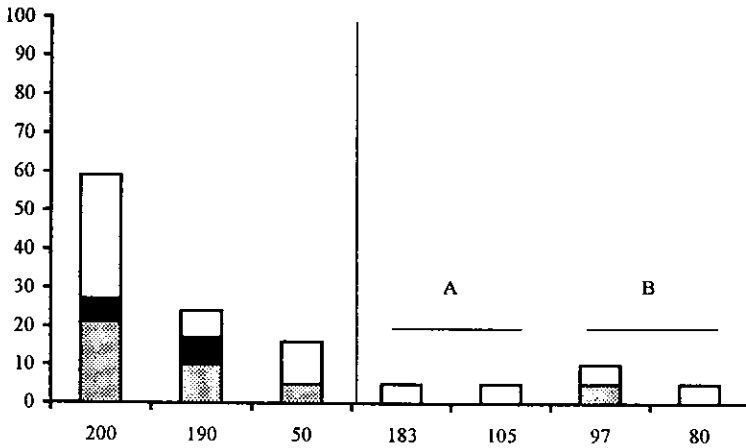
La frecuencia de las distintas bandas encontradas en LCR y suero, con relación a la localización y tipo de cisticercosis, se muestra en las figuras 17 y 18. Se observan antígenos en casos con cisticercosis localizada en el espacio subaracnoideo, en las cavidades cerebrales o en localizaciones mixtas, pero no con cisticercosis del parénquima. En casos con calcificaciones únicas o múltiples, o con quistes únicos, en presencia o ausencia de calcificaciones, no se detectaron bandas antigénicas.

Tres de las bandas encontradas en los sueros de pacientes con cisticercosis, también se encontraron en muestras de 2 pacientes con teniosis (tabla IV). Además, las muestras de

individuos con otras parasitosis presentaron antígenos de reacción cruzada, ausentes en las muestras de los casos confirmados de cisticercosis.



*Figura 16. Resultados representativos de IET para detección de antígenos. Las muestras de suero (A y B) y LCR (C y D) de casos de neurocisticercosis y testigos negativas se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras (A y C) y no reductoras (B y D). El carril 1 corresponde al antígenoFC; los carriles 2 y 3 a muestras de testigos negativos; el 4 y el 5 corresponden a muestras de casos con calcificaciones; el 6 a un paciente con 1 quiste y del 7 al 11 a casos con cisticercosis activa múltiple. Las flechas señalan las bandas detectadas. Los marcadores de peso molecular se marcan a la izquierda en kDa.*



*Figura 17. Frecuencia de las diferentes bandas encontradas en LCR (lado izquierdo) y suero (lado derecho) de pacientes con NC positivos en el IET de antígenos, con relación a la localización de los parásitos. En LCR se encontraron bandas solamente en condiciones reductoras; en suero, se encontraron bandas en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B). Los parásitos estaban localizados en parénquima (barras rayadas, no se encontraron), espacio subaracnoideo (barras grises), ventrículos (barras negras) o en varias localizaciones (mixta, barras blancas).*

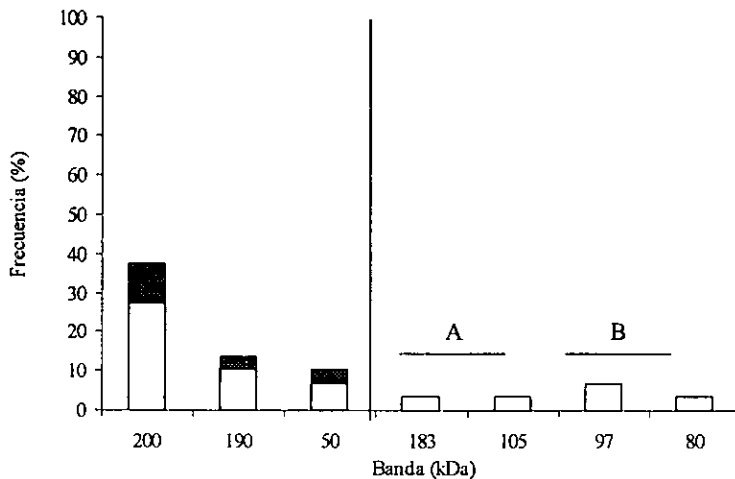


Figura 18. Frecuencia de las diferentes bandas encontradas en LCR (lado izquierdo) y suero (lado derecho) de pacientes con NC positivos en el IET de antígenos, con relación al tipo y número de parásitos. En LCR se encontraron bandas solamente en condiciones reductoras; en suero, se encontraron bandas en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B). Solamente se encontraron antígenos en algunos de los casos con cisticercosis quística múltiple, en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de calcificaciones concomitante.

*Tabla IV. Búsqueda de antígenos por IET en el suero de personas infectadas con diferentes parásitos.*

| Enfermedad                | n | Bandas en suero en condiciones: |     |     |     |               |    |     |     |
|---------------------------|---|---------------------------------|-----|-----|-----|---------------|----|-----|-----|
|                           |   | Reductoras                      |     |     |     | No reductoras |    |     |     |
|                           |   | 105                             | 128 | 137 | 183 | 80            | 95 | 110 | 120 |
| Cisticercosis (positivos) | 2 | 1                               |     |     | 2   | 1             | 1  |     |     |
| Teniosis                  | 3 | 2                               |     | 1   | 2   |               | 2  | 1   | 1   |
| Himenolepiosis            | 1 |                                 | 1   |     |     |               |    | 1   | 1   |
| Hidatidosis               | 1 |                                 |     |     |     |               |    |     |     |
| Larva migrans             | 4 |                                 | 1   |     |     |               |    |     |     |
| Triquinelosis             | 3 |                                 |     |     |     |               |    |     |     |
| Toxoplasmosis             | 1 |                                 |     |     |     |               |    |     |     |

## **DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN SUEROS DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES ENDÉMICAS**

### **Estudio transversal en Cerritos, San Luis Potosí**

Con el fin de evaluar la detección de antígenos en población abierta, se llevó a cabo un estudio en el Municipio de Cerritos, San Luis Potosí. Dicho Municipio tiene zonas urbanas y rurales y cuenta con 14,000 habitantes; se tomó una muestra de 954 individuos mayores de 14 años y se aplicó una encuesta enfocada a la búsqueda de diversos factores de riesgo. Se midió la prevalencia de antígenos por medio de un ELISA de captura de antígenos, usando anticuerpos policlonales de conejo, y también la de anticuerpos también por ELISA. Esto último con el fin de comparar a la comunidad con otras estudiadas previamente por otros grupos. Encontramos antígenos en 9 individuos, lo que permitió calcular una prevalencia del 1.0%. Así mismo se encontraron anticuerpos en 48 casos, dando una prevalencia del 4.8%. Los factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos, así como la frecuencia de la historia de expulsión de proglótidos, indicaron que la población está expuesta a la infección por *T. solium*, tal como ocurrió con otras comunidades estudiadas anteriormente (Aranda y col., 1995, ver Apéndice).

La presencia de antígenos en suero se encontró asociada solamente con crisis convulsivas de aparición tardía (Razón de momios=11.83; intervalo de confianza = 2.63-62.15;  $p < 0.01$  {exacta de Fisher}). De los 9 casos positivos a la presencia de antígenos, 3 aceptaron ser sometidos a un estudio de tomografía computada, y de éstos, dos presentaron lesiones compatibles con cisticercosis activa, según la lectura de un radiólogo especialista.



### Grupos de alto y bajo riesgo de una zona endémica.

Se llevó a cabo un estudio utilizando muestras de individuos que habitan en una zona endémica de cisticercosis, en Morelos. De esa población se escogieron dos grupos que consideramos de alto riesgo: uno compuesto por 68 individuos que presentaran crisis convulsivas de aparición tardía y otro de 33 personas con teniosis, diagnosticada por laboratorio y tratamiento. Se escogió un grupo de 133 testigos de la misma zona que tuviera una distribución de género y edad similares a la de los grupos de alto riesgo. Los sueros fueron analizados por ELISA para antígenos con AcPc de conejo, y para anticuerpos por IET-GPs (Tsang y col., 1989), para comparación. Si bien la frecuencia de antígenos y anticuerpos fue más alta en los grupos de alto riesgo que en el grupo testigo, la diferencia sólo fue significativa para el caso de los antígenos en el grupo de individuos con epilepsia (tabla V).

*Tabla V. Frecuencia de antígenos y anticuerpos en los grupos estudiados*

| Detección de: | Frecuencia en el grupo de: |           |       |          |       |
|---------------|----------------------------|-----------|-------|----------|-------|
|               | Bajo riesgo                | Epilepsia | p     | Teniosis | p*    |
| Antígenos     | 5.3                        | 19.1      | 0.014 | 14.3     | 0.037 |
| Anticuerpos   | 12.8                       | 22.1      | 0.089 | 22.9     | 0.137 |

\* *Chi-cuadrada*

Agrupando a todos los individuos y verificando la asociación de la presencia de anticuerpos o antígenos a distintos factores de riesgo, capturados previamente y disponibles en la base de datos, se encontró una asociación entre la presencia de anticuerpos en suero y la de nódulos en el tejido subcutáneo. También se encontró asociada la presencia de antígenos con la de epilepsia tardía. No se encontraron significativamente asociados los seroantígenos a la teniosis y a las convulsiones focales (tabla VI).

Tomando a la epilepsia y a la teniosis como estados de la enfermedad, se calcularon los valores diagnósticos de las pruebas de anticuerpos y antígenos (tabla VII). Las sensibilidades encontradas fueron muy bajas para ambas pruebas, pero las especificidades fueron relativamente altas, así como el valor predictivo positivo de la prueba de antígenos en el caso de los individuos con epilepsia.

*Tabla VI. Factores de riesgo asociados con anticuerpos y antígenos en suero*

| Factor de Riesgo     | Positivos a anticuerpos<br>(N=40) |      | Negativos a anticuerpos<br>(N=197) |      | p*   |
|----------------------|-----------------------------------|------|------------------------------------|------|------|
|                      | N                                 | (%)  | n                                  | (%)  |      |
| Nódulos subcutáneos  | 3                                 | 7.5  | 3                                  | 1.5  | 0.02 |
|                      | Positivos a antígenos<br>(N=27)   |      | Negativos a antígenos<br>(N=209)   |      | p    |
|                      | N                                 | (%)  | n                                  | (%)  |      |
| Epilepsia            | 13                                | 48.1 | 55                                 | 26.3 | 0.01 |
| Teniosis             | 7                                 | 25.9 | 29                                 | 13.8 | 0.09 |
| Convulsiones focales | 4                                 | 14.8 | 12                                 | 5.7  | 0.07 |

\**Chi-cuadrada o Exacta de Fisher*

*Tabla VII. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos calculados para las dos pruebas*

| Parámetro (%)             | Epilepsia |             | Teniosis  |             |
|---------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                           | Antígenos | Anticuerpos | Antígenos | Anticuerpos |
| Sensibilidad              | 19.1      | 22.1        | 19.4      | 22.2        |
| Especificidad             | 91.7      | 85.1        | 90.0      | 84.0        |
| Valor predictivo positivo | 48.1      | 37.5        | 25.9      | 20.0        |
| Valor predictivo negativo | 73.7      | 73.0        | 86.1      | 85.7        |

## DISCUSION

El diagnóstico de la neurocisticercosis humana actualmente se realiza con una gran precisión: se cuenta con herramientas como la resonancia magnética y la tomografía computada, que proporcionan la identificación del tipo, número y localización de los cisticercos presentes (Ramos y col., 1986; Rodríguez Carbajal y Boleaga-Durán, 1982). Sin embargo, estas técnicas tienen un alto costo y son inaccesibles para una parte considerable de la población. Además, existen casos dudosos que obligan al médico a considerar el uso de técnicas inmunológicas. Por ello, se ha continuado su implementación, principalmente mediante la determinación de anticuerpos (Flisser y Larralde, 1986; Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). La detección de anticuerpos en LCR o suero puede ser decisiva para casos de duda diagnóstica en el diagnóstico clínico. Sin embargo, existe interés en la búsqueda de un método que permita detectar antígenos parasitarios, principalmente porque su presencia es un reflejo directo del parásito que además debe estar vivo o, por lo menos en proceso de muerte. En cisticercosis cerebral esto es relevante pues el tratamiento médico se aplica solamente en casos de cisticercosis activa.

Con estos antecedentes se iniciaron los estudios presentados en este documento; los primeros se hicieron con AcMc producidos por otros grupos, y los resultados alentadores nos motivaron para iniciar la producción de nuestros propios AcMc. Paralelamente, se evaluaron algunos ensayos, basados tanto en AcMc como AcPc en casos clínicos y en comunidades endémicas. Por otro lado, realizamos un estudio para analizar el mosaico antigénico presente en el LCR de los pacientes, y valorar la posibilidad de encontrar antígenos en suero, lo que no había sido probado anteriormente.

Los resultados obtenidos nos han permitido identificar algunos aspectos relevantes para el mejoramiento de la tecnología que se pretende optimizar, pero también nos han brindado información de orden más relacionado con la interacción entre el cisticerco de *Taenia solium* y su huésped intermediario. Estos temas se discuten a continuación.

### ***ANTÍGENOS INDICADORES DE VIABILIDAD Y ANTÍGENOS INDICADORES DE PROCESO DE MUERTE PARASITARIA***

De los resultados de esta tesis, así como de otros reportes de la literatura, se desprende que los antígenos que se encuentran circulando durante una infección por un cisticerco pueden variar, dependiendo del estado en que éste se encuentre. Con un enfoque pragmático, se consideró que era importante utilizar anticuerpos contra los productos ES del parásito para obtener mejores resultados en la determinación de antígenos, pues éstos son los que más se asemejan a los que se encuentran en la circulación del individuo infectado. En favor de esto, debe observarse la sensibilidad obtenida con el AcMc HP10 que es específico para un componente de superficie y de secreción-excreción, tanto en el LCR de seres humanos (72%), como en el suero de cerdos infectados (79%). En el artículo de la producción del HP10 (Harrison y col., 1989), se estudió la cinética de antígeno y de anticuerpos en la sangre de animales infectados experimentalmente, observándose que el antígeno aparece a las 4 semanas de infección en la circulación, y desaparece cuando los parásitos mueren, no así los anticuerpos. Esto quiere decir que este antígeno es un indicador de la presencia de parásitos viables.

En contraste, el AcMc HP12, que reconoce un antígeno de fluido vesicular fue menos sensible. Es interesante que este anticuerpo no haya detectado casos masivos de cisticercosis porcina, mientras sí detectó a la mitad de los casos humanos; esto puede estar relacionado con la localización del antígeno en el parásito, siendo posible que el antígeno se libere cuando los parásitos están dañados. Por eso no se detecta en la cisticercosis porcina, la cual es una parasitosis relativamente joven, en la que la mayoría de los cisticercos están viables (Correa y col., 1987). Por el contrario, la cisticercosis humana es una enfermedad crónica de hasta 30 años (Dixon y Lipscomb, 1961), en la que se pueden encontrar cisticercos vivos, dañados y muertos (Rabiela-Cervantes, 1989), por lo que habría más probabilidades de encontrar los antígenos del fluido vesicular en el LCR, e incluso en la circulación. Como se mencionó, encontramos que el HP12 detectó al 48% de los casos humanos. En este sentido, Cho y col. (1992) produjeron un AcMc contra un antígeno de fluido vesicular y lo usaron en LCR: sólo lo encontraron en el 11% de los casos, y lo detectaron incrementado inmediatamente después del tratamiento con prazicuantel y en casos con cisticercos racemosos. Se sabe que el tratamiento induce una liberación súbita de antígenos que induce, a su vez, una mayor respuesta inmune que destruye al parásito (Flisser y col., 1990c). Los componentes del fluido vesicular podrían ser, por lo tanto, parte de los antígenos liberados cuando el parásito entra en proceso de muerte y buscarse estos antígenos como marcadores de muerte parasitaria. Si esto se demuestra, su detección en casos humanos serviría como herramienta para la vigilancia del curso de la infección y en su caso, brindar apoyo al paciente con quimioterapia para reducir los trastornos secundarios a la inflamación.

## *ANTÍGENOS DEL HUÉSPED EN LOS ANTÍGENOS DEL PARÁSITO.*

Los experimentos llevados a cabo para producir AcMc se iniciaron bajo la premisa de que los antígenos ES constituyen el mejor mosaico antigénico para la producción de anticuerpos monoclonales, destinados para la captura de antígenos en LCR o suero para diagnóstico de cisticercosis activa. Ello dado que se supone que el cisticerco viable está excretando y secretando *in vivo* sustancias antigénicas similares a las que se pueden obtener de un sobrenadante de cultivo *in vitro*. No empleamos el EC para inmunizar ya que, desde nuestra perspectiva, había dos problemas; por un lado, se estaría inmunizando al ratón con un número muy grande de epítomos, y, por ende la posibilidad de obtener clonas contra los epítomos que pudieran estar circulando en el paciente infectado era menor. Por otro lado, estudios previos indican la existencia de componentes del huésped en la superficie (Correa y col., 1985; Willms y Arcos, 1977) e incluso en el interior del cisticerco (Ambrosio y col., 1994; Hayunga y col., 1989), por lo que inmunizar con el EC podría generar además una reacción contra componentes del huésped. Inesperadamente, en la primera producción de AcMc, el único anticuerpo fuertemente reactivo inducido con antígenos ES, fue positivo con suero humano, reconociendo aparentemente al fibrinógeno. En términos prácticos, estos resultados fueron muy desalentadores, pero en términos de la relación huésped-parásito resultaron de interés. Los datos presentados sugieren que al parecer, el parásito también puede excretar al medio moléculas del huésped. La reacción del anticuerpo monoclonal con el fibrinógeno indica que esta molécula estaba incluida entre los

productos de excreción-secreción del cisticerco y por lo tanto, sugiere que el mosaico de componentes del huésped que el cisticerco puede adsorber e internalizar es más amplio de lo que se había demostrado. El AcMc E7 reacciona con dos bandas de alrededor 70 y 100 kDa del suero humano en condiciones reductoras. Una de estas bandas correlaciona con el peso molecular de una de las cadenas del fibrinógeno, de 67 kDa (Lee, Matsueda y Allen, 1988) y más interesante, con un componente de suero de cerdo de 66 kDa, encontrado por Cheng y Ko (1991) en el EC de cisticercos de cerdo. Por otra parte, el anticuerpo reacciona con 4 bandas de 15, 20, 25 y 28 kDa de los ES en condiciones reductoras. En condiciones no reductoras no se detectaron bandas en suero humano, lo que sugiere que se mantiene como agregado (lo que vuelve a ser similar al fibrinógeno), y sí en los ES, de 25, 43 y 50 kDa. Estas bandas de menor peso molecular podrían ser productos de degradación parcial de las moléculas ingeridas por el parásito que los libera como mecanismo natural, o como artefacto del cultivo.

Es posible que el parásito endocite una gran variedad de proteínas del huésped y se alimente de ellas. Ambrosio y col. (1994) realizaron experimentos en los que incubaron con inmunoglobulinas o albúmina cisticercos viables provenientes de carne de cerdo, y encontraron que en tiempos largos, ambas proteínas son degradadas. Algunos estudios previos, ya habían reportado la presencia de Igs y albúmina en el fluido vesicular de los metacéstodos de *Taenia taeniaeformis*, *Taenia saginata* y *Echinococcus granulosus* (Hustaed y Williams, 1977; Machnicka y Grzybowski, 1986). Dado que los céstodos carecen de sistema digestivo, el intercambio metabólico y la absorción de nutrientes se lleva a cabo a través del tegumento (Lumsden, Voge y Sogandares-Bernal, 1982). El cisticerco al parecer internaliza (endocita)



macromoléculas para alimentarse, proceso que, cuando se trata de inmunoglobulinas u otros componentes del sistema inmunológico, puede defender al parásito del ataque del huésped.

Uno de los anticuerpos empleados para el diagnóstico de la cisticercosis bovina con éxito, fue producido con antígenos ES, pero éstos fueron cosechados del sobrenadante de cultivo de cisticercos sometidos a evaginación con bilis, lavados y posteriormente cultivados (Brandt y col., 1992). Posiblemente esta estrategia es útil pues los componentes del huésped presentes en el parásito pueden ser eliminados en su mayoría durante el proceso mismo de la evaginación.

Dado que la producción de los ES es más laboriosa y menos eficiente, y a que no ayudó a optimizar la producción de AcMc, en el segundo ensayo de fusión se empleó al EC. En éste también se generó una clona (5B4) que produce anticuerpos reactivos con un extracto de músculo de cerdo y, en menor grado, contra suero de seres humanos; sin embargo, a diferencia del E7, este anticuerpo reacciona con extractos de todos los parásitos ensayados, así que parece reaccionar con algún epítipo muy conservado o muy pequeño. Algunos de los anticuerpos policlonales contra el EC que hemos producido reaccionan con algún componente del suero o LCR de personas sin cisticercosis. De hecho los antisueros usados en los experimentos de IET para la búsqueda de antígenos tuvieron que ser seleccionados de un grupo de 5 lotes distintos y, además se tuvieron que adsorber con proteínas de suero humano. Aun así, reaccionaron con algunas bandas de los sueros y los LCRs. Los resultados de ELISA usando estos anticuerpos suelen dar valores de fondo altos, lo que al ajustarlos en el lector de placas, repercute en su sensibilidad.

La utilidad del EC como fuente de antígenos para AcMc es variable. Si bien el anticuerpo H7 fue producido con EC, y dio resultados prometedores, alrededor de 60% de sensibilidad en LCR y suero de seres humanos (Correa y col., 1997, ver Apéndice), se obtuvo una baja respuesta

con los AcPc en los primeros estudios y con los AcMc anti-EC probados con una muestra más grande de casos (ensayos con la mezcla de AcMc y el 4D9), no obstante que su sensibilidad probada con el antígeno homólogo fue alta.

### ***ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE ESPECIE***

Dos de los anticuerpos monoclonales con mayor potencial para detección de antígenos fueron producidos por Harrison y col. (1989) y Brandt y col. (1991) que los indujeron con los ES de metacéstodos de *T. saginata*. Sin embargo, ambos anticuerpos son inespecíficos de especie, por lo cual, su utilidad es limitada en zonas donde prevalecen la hidatidosis y la cisticercosis. Vale la pena mencionar que recientemente hemos producido algunos AcMc contra el adulto de *T. solium*. De estas clonas, una reacciona específicamente con *T. solium*, y no presenta reacciones cruzadas con otros parásitos, incluidos *T. saginata* y *E. granulosus*, como tampoco con bacterias patógenas y comunes del tracto digestivo. Este anticuerpo reacciona en menor grado con el EC del metacéstodo, aunque no hemos determinado si lo hace con los ES. Su uso potencial en el diagnóstico de cisticercosis está en proceso de evaluación.

### ***ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE ESTADIO***

Una posibilidad interesante es el diagnóstico de teniosis mediante la detección de antígenos en suero. Como se observó en el estudio de grupos de alto y bajo riesgo, una proporción de casos de teniosis fue positiva al ensayo de captura de antígenos en suero, si bien, la

asociación no fue significativa. Por otro lado, en los ensayos de IET para antígenos, tres componentes presentes en el suero de pacientes con cisticercosis, también lo estaban en 2 de los sueros de pacientes con teniosis. Es posible que existan antígenos compartidos en varios estadios, reconocidos por los anticuerpos inducidos contra uno. En términos de la relación huésped-parásito y del diagnóstico, es importante notar que los antígenos del adulto, pueden cruzar el epitelio intestinal y circular en la sangre en niveles detectables. Se han llevado a cabo experimentos en el modelo de teniosis en el hámster dorado, que muestran que los animales infectados, pero no inmunosuprimidos, presentan antígenos en suero además de coproantígenos (G. Avila, comunicación personal). Una hipótesis alternativa es que la presencia de antígenos circulantes en individuos con teniosis se deba a una infección simultánea con el metacéstodo. El hecho de que sólo una proporción de los individuos con teniosis presentó antígenos en sangre, esto es que la sensibilidad de la determinación de seroantígenos fuera muy baja, aunado al hecho de que también lo fue el valor predictivo positivo para esta enfermedad, podría ser indicativo de una cisticercosis concomitante en esos casos. Un estudio realizado con pacientes con neurocisticercosis y sus familiares, reveló una mayor frecuencia de teniosis en este grupo que en otro grupo testigo no relacionado (Correa y col., 1989). Otro ejemplo en el mismo sentido es el de una paciente que habiendo tenido teniosis 8 años antes, causó cisticercosis a 3 de sus 4 convivientes y a sí misma (Carmona, Meza-Lucas y Correa., en preparación). Sin embargo, no se sabe la frecuencia inversa, es decir la proporción de los casos con teniosis que simultáneamente tienen cisticercosis.

Para tener un diagnóstico diferencial entre la fase de metacéstodo y la de adulto, es necesaria la producción de anticuerpos específicos contra un estadio. La reactividad de algunos

AcMc sugiere que se podrían encontrar clonas con esta capacidad de diferenciación: los AcMc 3C11 y 4B11, reaccionaron con el adulto de *T. solium* de seres humanos y aun con el de *T. saginata*, pero no reaccionaron con la tenia obtenida de hámster, lo que podría deberse a que la tenia inmadura no expresa los epítomos que se encuentran más adelante en su desarrollo (la tenia del hámster no produce proglótidos grávidos). Aunque estos anticuerpos no son estadio-específicos, pues fueron reactivos con el metacéstodo, sugieren que hay expresión diferencial de antígenos durante el desarrollo. Esto se ha sabido con relación a los antígenos con potencial protector: aquellos protectores contra la cisticercosis por otras especies de ténidos provienen de las oncosferas y no están presentes en los metacéstodos (Heath, 1974; Lightowlers y col., 1984; Mitchell, 1990). Por ende, es posible encontrar AcMc que distingan entre dos estadios de un mismo parásito, y así contar con reactivos que permitan un diagnóstico diferencial.

### ***PRESENCIA DE COMPLEJOS INMUNES***

Uno de los problemas para la determinación de antígenos en huéspedes inmunocompetentes es la presencia de anticuerpos en sus fluidos orgánicos. Entonces, los anticuerpos usados en un ensayo de captura de antígenos deben estar dirigidos contra antígenos que no sean inmunodominantes para el huésped natural. De ser así podrían estar formando complejos inmunes *in vivo*, que interfieren con la captura del antígeno por el anticuerpo del ensayo. Probablemente esto ocurrió al utilizar los anticuerpos contra el AgB, un antígeno inmunodominante (Flisser, Woodhouse y Larralde, 1980), ya que su determinación en el LCR de casos positivos dio una sensibilidad del 14%, a pesar de ser una proteína presente en los ES (Laclette y col., 1987). En 1994, Wang y col. usaron un sistema de captura de IgG humana para

atrapar esta Ig de las muestras de casos con NC, revelando con anticuerpos anti-EC de conejo. Se encontraron reacciones positivas en 82% de 34 casos de NC y el 6.7% de 30 testigos, lo que sería una evidencia de la existencia de complejos inmunes en el LCR.

Desde principios de siglo se sabe que hay anticuerpos en el LCR y el suero de los pacientes con cisticercosis (Moses, 1911; Nieto, 1948), por lo que pueden estar interfiriendo con la captura o detección de antígenos. Una alternativa técnica que puede usarse para evitar la interferencia es separar los complejos inmunes presentes en las muestras por medio de tratamiento químico antes del ensayo de antígenos.

En general se piensa que los anticuerpos inducidos experimentalmente en la misma especie del huésped natural, son menos eficientes para detectar antígenos en ensayos de captura, probablemente porque existe mayor competencia entre los anticuerpos presentes en la muestra y aquellos utilizados en el ensayo, pues siendo de la misma especie, tienen mayor probabilidad de reaccionar con los mismos epítomos, y por ende, los sitios de detección están ocupados por los anticuerpos naturales de la infección. Los anticuerpos producidos en cerdos contra el extracto crudo (EC) permitieron demostrar la presencia de antígenos en 48% de los LCRs humanos, pero en ningún suero de cerdos con cisticercosis confirmada. En el caso de buscar antígenos por IET, esto puede ser totalmente distinto, pues en esos casos, los antígenos están libres de los anticuerpos que los cubren en forma nativa; si bien este método impide detectar antígenos cuyos epítomos sean conformacionales.

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

### *¿CUANTOS ANTÍGENOS DISTINTOS HAY EN LAS MUESTRAS?*

En la tabla VII se recopila la información proveniente de la literatura y de esta tesis sobre las características de los antígenos que se han buscado e identificado hasta la fecha, por distintos métodos y con variados reactivos. Llama la atención la ausencia virtual de antígenos en LCR y en especial, en suero.

Los datos encontrados en este trabajo indican que la gama de antígenos distintos que están presentes en las muestras de LCR no es muy compleja, pues no son más de 5 distintos. Esto, aparentemente está en contradicción con la gama de antígenos distintos reconocidos por los anticuerpos de los pacientes, demostrado incluso con técnicas de muy poca resolución, como la inmunoelectroforesis (Flisser y col. 1980), y confirmada y ampliada con IET, en la que se demostró una respuesta muy compleja y heterogénea (Larralde y col., 1989). De hecho, esto ha obligado a varios grupos a buscar antígenos puros o fracciones enriquecidas, acopladas a técnicas laboriosas para proporcionar un diagnóstico diferencial confiable (Gottstein y col., 1986; Larralde y col, 1989; Plancarte y col., 1994; Tsang y col. 1989). Los antígenos encontrados en LCR por diferentes grupos no son más de 5 distintos. Existe un antígeno, cuyo peso molecular es de alrededor de 200 kDa, que parece ser el dominante en LCR y en las pocas muestras positivas de suero. Este antígeno se encontró en LCR de pacientes con NC (Estrada y col., 1989) por medio de ensayos de IET similares a los ejecutados en la presente tesis. Estos investigadores encontraron un antígeno de 230 y otro 190 kDa en 14 de 18 muestras de LCR de pacientes, de los que no

sabían el tipo, número y localización de los quistes. En nuestro trabajo hemos comprobado la existencia de una banda equivalente (de 183 kDa) en suero, además de otra de 50 kDa en LCR. El antígeno de 200 kDa posiblemente es el mismo que se detectó en LCR con el HP10 y que está presente en la fracción de 33-200 kDa separada por HPLC (Estrada, Almon-Estrada y Kuhn, 1989). Es notorio también que el AcMc inducido por Allan, el H7, reacciona con una banda de 200 kDa.

En conclusión, el antígeno presente de manera dominante en LCR tiene un peso aproximado de 200 kDa o mayor, y debe tener el epitopo repetido, pues se puede detectar en ensayos de captura con AcMc. En el caso del antígeno reconocido por el HP10, se sabe que el epitopo consiste en un azúcar efectivamente repetido en la molécula. Valdría la pena dilucidar si se trata de un solo antígeno o un grupo de antígenos de alto peso molecular los que se encuentran presentes en los fluidos de los casos humanos y porcinos con cisticercosis.

Aunque la variedad de antígenos es limitada, hay diferentes antígenos en distintos pacientes. Se discutió anteriormente acerca de los antígenos marcadores de viabilidad (¿el (los) de 200 kDa?) y de muerte (¿como el reconocido por el HP12?), que permiten detectar distintos casos. La sensibilidad obtenida usando los sistemas HP10 y HP12 al mismo tiempo dio una sensibilidad mayor (90%) que la obtenida con cada uno por separado (72% y 48%, respectivamente).

Por lo anterior se considera conveniente utilizar mezclas de anticuerpos para aumentar la sensibilidad de ensayos de búsqueda de antígenos en cisticercosis humana. Con el fin de evitar la variabilidad que ocurre de un lote a otro de anticuerpos policlonales, deben producirse AcMc, para tener reactivos con calidad reproducible y producción a mediana o gran escala. Una mezcla

de AcMc sería, por un lado, reproducible desde el punto de vista molecular y, por el otro, permitiría aumentar la probabilidad de detectar varios antígenos, y por ende de presentar una sensibilidad mayor. La búsqueda de esta mezcla con estas características sigue en ejecución.



Tabla VII. Detección de antígenos en NC humana por diferentes grupos de investigación

| Método/ sistema de detección           | Tipo de muestra | Anticuerpo de detección | Peso molecular de los antígenos kDa | N pacientes | N testigos | Sensibilidad (%)           | Especificidad (%) | Referencia                          |     |    |     |
|--|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------|------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----|----|-----|
| Aglutinación                           | LCR             | AcPc conejo a-EC        | ND                                  | 215         | 31         | 77                         | 97                | Velasco y col., 1983                |     |    |     |
| ELISA/ directo*                        | LCR             | AcPc conejo a-EC        | ND                                  | 17          | 48         | 77                         | 100               | Tellez-Girón y col. 1987            |     |    |     |
| Dot-ELISA/ directo                     |                 |                         |                                     |             |            | 59                         | 100               |                                     |     |    |     |
| IET                                    | LCR             | AcPc conejo a-EC        | 190, 230                            | 18          | 18         | 78                         | 100               | Estrada y col. 1989                 |     |    |     |
| HPLC-ELISA/ Directo                    | LCR             | AcPc conejo a-EC        | Pico >400                           | 75          | 5          | 29                         | 100               | Choromanski y col., 1990            |     |    |     |
|  |                 |                         | Pico 33-240                         |             |            | 56                         | 100               |                                     |     |    |     |
| ELISA/captura heterólogo: AcPc-AcMc    | LCR             | AcPc conejo a-EC / AcMc | 150                                 | 212         | NP         | 13                         | NP                | Cho y col., 1992                    |     |    |     |
|  | siero           |                         |                                     | 255         |            | 0                          |                   |                                     |     |    |     |
| ELISA/ directo                         | LCR             | AcMc IF11               | ND                                  | 116         | 40         | 82                         | 100               | Wang y col., 1992                   |     |    |     |
| ELISA/ captura homólogo                | LCR             | AcMc 4F8                | ND                                  | 231         | NP         | 77 NC / 97 NC + subcutánea | NP                | Wang y col., 1993                   |     |    |     |
|  |                 |                         |                                     |             |            | HP10                       |                   |                                     | 200 | 72 | 100 |
|  |                 |                         |                                     |             |            | HP12                       |                   |                                     | ND  | 72 | 100 |
|  |                 |                         |                                     |             |            | cerdo-a-EC                 |                   |                                     | ND  | 48 | 100 |
| ELISA/ captura homólogo                | LCR             | cerdo-a-AgB             | 100                                 | 31          | 24         | 48                         | 100               | Esta tesis/ Correa y col., 1989a, b |     |    |     |
|  |                 |                         |                                     |             |            | 48                         | 100               |                                     |     |    |     |
| ELISA/ captura homólogo                | LCR             | AcMc H7                 | > 200                               | 25          | -          | 52                         | ND                | Esta tesis/ Correa y col., 1997     |     |    |     |
|  |                 |                         |                                     |             |            | siero                      |                   |                                     | -   | 44 |     |
| ELISA/ captura heterólogo: AcMc - AcPc | LCR             | AcMc 4D9                | > 150                               | 102         | 72         | 13                         | 98                | Esta tesis                          |     |    |     |
|  |                 |                         |                                     |             |            | siero                      | 2                 |                                     | 98  |    |     |
|  |                 |                         |                                     |             |            | LCR                        | 2                 |                                     | 100 |    |     |
|  | Suero           | AcMc mezcla             | 50, 70, 190, 100, > 150             |             |            | 2                          | 100               |                                     |     |    |     |

## *¿ANTÍGENOS SECUESTRADOS?*

Uno de los hallazgos de estos estudios es la baja detección del antígeno B en las muestras: en el ensayo de captura sólo se encontró en el 14% de los LCRs. Por otro lado, en los ensayos de IET sólo se detectó una banda de peso molecular equivalente en 1 muestra de suero, tanto en condiciones reductoras como no reductoras y en ningún LCR. La banda tiene el peso molecular del antígeno B, por lo que podría ser la misma molécula. La baja frecuencia de detección de este antígeno en suero y su ausencia en LCR por IET, contradicen aparentemente que esté presente en forma de complejos inmunes. Sin embargo, estos complejos podrían estar secuestrados, pues este antígeno tiene afinidad por la colágena (Plancarte y col., 1983) y por el C1q también (Laclette y col., 1992). Dadas estas características, el antígeno B que está excretando el cisticerco posiblemente se une a la colágena del tejido cercano, lo que desvía la respuesta humoral contra él hacia el tejido del propio huésped, o bien se une al C1q (ver figura 2), de tal forma que puede ser más fácilmente secuestrado por las células del sistema reticuloendotelial, que lo eliminarían de la circulación. Esta explicación es aplicable a otros antígenos para los cuales hay abundancia de anticuerpos y no se detectan, aunque no hay evidencia que la apoye. Los antígenos pueden quedar secuestrados en el tejido cercano al parásito, o ser secuestrados por células de la reacción inflamatoria circundante y transportados en forma intracelular a los órganos linfoides cercanos, donde pueden estimular una respuesta inmune compleja. La gran diferencia entre la homogeneidad y parquedad del mosaico antigénico presente en circulación y la gran heterogeneidad y abundancia de los anticuerpos en el mismo fluido, se puede deber al poder amplificador de la respuesta inmune.

### *¿AUSENCIA DE ANTÍGENOS O PROBLEMAS TÉCNICOS?*

Si bien las evidencias del presente trabajo y, en general en la literatura, sugieren que hay pocos antígenos y en bajos niveles, existe la posibilidad de que esto no sea así y la baja sensibilidad obtenida en general se deba más bien a limitaciones de los métodos empleados. En los ensayos de captura, los anticuerpos policlonales suelen contener anticuerpos que, por las razones discutidas anteriormente, presentan fondo en los ensayos. Por ende, se obtiene una mala discriminación entre positivos y negativos. Con anticuerpos monoclonales se restringe la detección a la posibilidad de encontrar el antígeno en cantidades suficiente. Además con sistemas homólogos de captura con un AcMc debe contarse con un anticuerpo que reaccione con epítipo repetido en cada molécula. Por eso se sugirió antes el uso de combinaciones de éstos. Existen otras opciones a los ensayos de captura, que han sido usadas por algunos grupos, como el ensayo de detección directa. En éstos, la muestra se adsorbe al pozo de ELISA y se revela con el reactivo producido (AcMc o AcPc). Existen pocos estudios con este enfoque.

Estrada y Khun (1985) publicaron un ELISA de antígenos basado en el acoplamiento de las proteínas del LCR de enfermos directamente a la placa; todos los casos comprendidos en un grupo de 4 pacientes confirmados y uno de 7 con fuerte sospecha clínica, resultaron positivos en la prueba. Este mismo enfoque lo utilizó posteriormente el grupo del Tellez-Girón para un ELISA en placa y un ELISA de punto (Dot-ELISA) encontrando una sensibilidad del 75% (Tellez-Girón y col., 1987). Aunque este procedimiento evita la necesidad de tener epítopos repetidos, depende

más directamente de la concentración del antígeno en la muestra, que no parece ser muy elevada en ningún caso.

Otro problema que puede impedir una detección de mayor número de antígenos es la concentración, que aparentemente está relacionada con el número de cisticercos quísticos. La correlación en casi todos los estudios (incluidos los de esta tesis) entre la presencia de más de un cisticerco viable y la de antígenos detectables, indica que su concentración es uno de los factores limitantes. Existen posibles maneras de aumentar la sensibilidad de los ensayos. Entre éstas, se encuentra el inmuno-PCR, que es una amplificación indirecta de la reacción antígeno anticuerpo con una sonda acoplada al anticuerpo de revelado. Este tipo de técnicas sin embargo, son más caras y por ahora sólo pueden ejecutarse a nivel a laboratorios con cierto grado de equipamiento.

Un último aspecto de orden técnico es el tipo de muestra a analizar, pues algunas proteínas presentes en los fluidos orgánicos pueden tener un efecto inhibitorio sobre la sensibilidad del ensayo. Esto es más importante cuando se trata de suero que cuando se trata de líquido cefalorraquídeo. Nosotros hemos observado que a diluciones bajas del suero, se inhibe la señal obtenida. Diluir la muestra permite eliminar el efecto inhibitorio, pero simultáneamente diluye los antígenos presentes. En resumen, uno de los retos para mejorar el diagnóstico mediante la detección de antígenos es mejorar la sensibilidad. Una alternativa tecnológica para esto, es acoplar sistemas amplificadores al sistema de detección de antígenos.

## *DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS EN POBLACIÓN ABIERTA EN ZONAS ENDÉMICAS*

En esta tesis se presenta un estudio epidemiológico con un enfoque metodológico distinto a los que se habían hecho antes, no sólo en nuestro país, sino en otros países con problema endémico de cisticercosis por *T. solium*: la búsqueda de antígenos en suero de personas que habitan en zonas endémicas. Probablemente la búsqueda de antígenos no se había aplicado en encuestas epidemiológicas por considerarse inútil *a priori*, dado que la cisticercosis, por lo menos en América Latina, se considera predominantemente un problema de sistema nervioso central (Zenteno-Alanis, 1982). Por ende, la búsqueda de antígenos en sangre tenía poca probabilidad de ayudar a detectar casos. En el primero de los trabajos incluido en esta tesis, la presencia de antígenos séricos se encontró asociada únicamente a las crisis convulsivas de aparición tardía, de entre 80 variables diferentes estudiadas. En contraste, los anticuerpos sí se asociaron a un grupo de variables sociodemográficas y culturales, como en otros estudios en comunidades endémicas para *T. solium* (Aranda-Alvarez y col., 1995, ver Apéndice). Este dato es de importancia pues Schantz y col. (1994) encontraron que las crisis convulsivas tienen un valor predictivo positivo superior al 70% en población abierta, cuando se consideran las imágenes de la tomografía computada como prueba de oro para la neurocisticercosis. En nuestro estudio se hizo tomografía computada a 3 de los 9 individuos que presentaron antígenos en suero, y, de éstos, dos tuvieron imágenes compatibles con cisticercosis quística. Los resultados obtenidos son alentadores pues las pruebas que demuestran la presencia de antígenos pueden ser buenas herramientas para estudios de campo, especialmente si se logra mejorar la sensibilidad.

En el estudio de grupos de alto y bajo riesgo, también se encontró una asociación positiva entre la presencia de antígenos y las crisis convulsivas, demostrada tanto separando los grupos como en un análisis global contra 80 diversos factores de riesgo.

Cabe cuestionar la naturaleza de la asociación entre las crisis convulsivas y el tipo de neurocisticercosis. Medina y col. (1990), reportan que el síndrome principal en la neurocisticercosis incluye la presencia de crisis convulsivas. Sin embargo, en un trabajo de Schantz y col. (1994), se llevaron a cabo estudios de imagen de los individuos con crisis convulsivas, encontrando cisticercos en el 70% de los casos, y, de éstos, sólo el 33% presentaron parásitos viables.

Con base en los datos anteriores podemos calcular lo siguiente: de cada 100 individuos con crisis convulsivas en una zona endémica, 70 tendrían neurocisticercosis, y de éstos 23 (33%) presentarían cisticercos viables. No se esperan resultados positivos en el ensayo de captura de antígenos en casos con cisticercosis calcificada, así que nuestro ensayo, con una sensibilidad del 100% detectaría 23 casos de cada 100 con crisis convulsivas. La sensibilidad obtenida en el ensayo clínico con el H7 fue de alrededor del 50% para suero, y los datos que tenemos para el caso de anticuerpos policlonales (no mostrados) indican una sensibilidad cercana al 65% en esta misma muestra. Por lo tanto se espera detectar entre 11% y 15% de positivos en grupos de personas con crisis convulsivas. En el estudio de Cerritos detectamos 16% y en el de Morelos 19%, ambos valores cercanos a lo esperado.

Los cálculos realizados anteriormente y con el hallazgo de lesiones quísticas en 2 de los 3 casos positivos en la comunidad de Cerritos, indican que la detección de antígenos puede ser un apoyo importante en estudios epidemiológicos si se desea encontrar casos de cisticercosis activa.

En este sentido, hay que mencionar que se han encontrado asociaciones entre la presencia de anticuerpos y la de crisis convulsivas, pero en los estudios en el que se calculó el valor predictivo, el valor obtenido fue muy bajo (6%, Schantz y col., 1994). Parece pues que la detección de antígenos puede ser de mayor utilidad, aunque, como ya se mencionó, debe mejorarse la sensibilidad del ensayo.

### *¿PARA QUÉ DETECTAR CASOS CON CISTICERCOSIS ACTIVA?*

La determinación de antígenos puede ser muy útil en casos clínicos para propósitos de tratamiento. Existe controversia respecto a la necesidad de dar tratamiento cestocida a los pacientes con lesiones activas; un grupo sugiere que debe darse este tipo de tratamiento antes de que se genere una lesión que casi siempre se convierte en una calcificación, la que en muchas ocasiones provoca crisis convulsivas posteriormente (Sotelo y col., 1985). Por otro lado, hay quienes se oponen al tratamiento anti-parasitario (Miller y col., 1983), especialmente en la cisticercosis en parénquima, pues sugieren que en la mayor parte de los casos ocurre un proceso inflamatorio de manera espontánea, que destruye a los parásitos. Según estos grupos la droga cestocida acelera el proceso, haciéndolo más severo, y por ende agravando al paciente. En cualquier caso, parece haber consenso en la conveniencia de mantener una vigilancia de estos pacientes, y, en su caso, apoyarlos con tratamiento sintomatológico o anti-inflamatorio, por lo que la determinación de los antígenos parasitarios puede ayudar a definir si los parásitos están viables, especialmente si se distinguen antígenos marcadores de viabilidad y antígenos marcadores de

muerte. Por otro lado, la detección de antígenos en el suero en población asintomática o de personas con epilepsia en zonas endémicas, tendría un doble beneficio. Por un lado, podría ayudar a encontrar casos de cisticercosis asintomática o de epilepsia, u otra sintomatología, debida a cisticercos vivos, descartando los casos debidos a cisticercos calcificados. Esto permitiría dar tratamiento o vigilar al paciente hasta la resolución de las lesiones. Los casos con cisticercosis activa son mejores indicadores epidemiológicos de la prevalencia de la enfermedad que la determinación de anticuerpos, que puede estar relacionada con otros factores como exposición al parásito sin infección o a una enfermedad pasada.



## REFERENCIAS

- Allan JC, Avila G, García Noval J, Flisser A, Craig PS Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 1990, 101, 473-477
- Allan JC, Craig PS, Garcia Noval J, Mencos F, Liu D, Wang Y, Wen H, Zhou P, Stringer R, Rogan M. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. *Parasitology* 1992, 104, 347-356
- Aluja A. La histopatología de la cisticercosis porcina. En: Flisser A y Malagón F (eds.), *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega, México D.F. 1989, pp 147-156.
- Alvarado-Rodriguez A. Efecto de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre macrófagos *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Fac. Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM. 1995.
- Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Morán E, Ersfeld K, Flisser A. Identification and partial characterization of a myosin like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. 1997, 116, 545-553.
- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Lacleite JP. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch. Med. Res.* 1994, 25, 325-330.
- Aranda-Alvarez JG, Tapia-Romero R, Alcántara-Anguiano I, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Celis-Quintal G, Grijalva-Otero G, Correa D. Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Potosí, México. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1995, 89, 689-692.

- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasit. Res.* 1998, 84, 117-122.
- Atías A. Taeniasis. En: *Parasitología Clínica. Publicaciones Técnicas Mediterráneas. 3ª Edición.* Santiago de Chile. 1991.
- Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. En: *Advances in Immunology.* Kunkel HG, Dixon FJ (eds). Academic Press, N.Y. 1977, 25, 1-54.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- Brandt JR, Gueerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int.J.Parasitol.* 1992,22,471-477.
- Cárdenas F. *Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases. *Ann. Ophthalmol.* 1992, 24, 25-28.
- Cheng RW, Ko RC. Cross-reactions between crude antigens of larval *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) and other helminths of pigs. *Vet Parasitol* 1991, 39, 61-170
- Cho SY, Kim SI, Kang SY, Park AJ. Intracranial synthesis of specific IgG antibody in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. *Korean J Parasitol.* 1988, 26, 15-26.
- Cho SY, Yoon K, Suk-II K, Shin-Yong K. Measurement of 150 kDa protein of *Taenia solium* metacestodes by antibody-sandwich ELISA in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. *Korean. J. Parasit.* 1992, 30, 299-307.
- Choromanski L, Estrada JJ, Kuhn RE.. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use HPLC and ELISA. *J.Parasitol.* 1990, 76, 69-73.

- Correa D, Medina-Escutia E, Morales-Lopez Z, Mandujano-Martínez A, Medina-Flores Y, Meza-Lucas A. Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos, Cuaderno Técnico del INDRE No. 3, Secretaría de Salud, México, D.F., 1994, 54 pp.
- Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C y Flisser A. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J. Parasitol. 1985, 71, 535-541.
- Correa D, Lacleste JP, Rodríguez-Del-Rosal E, Merchant M y Flisser A. Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. J. Parasitol. 1987, 73, 443-445.
- Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Rodríguez del Rosal E, Meza-Lucas A, Flisser A. Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. Acta Leidensia 1989a, 57, 93-99.
- Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Parkhouse RME, Plancarte A, Meza-Lucas A, Flisser A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1989b, 83, 814-816.
- Correa D, Tovar A, Espinoza B, Plancarte A, Flisser A. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parasito. En: Flisser A, Malagon F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, México: Limusa-Noriega; 1989c pp. 31-43.

- Correa-Beltrán MD, Proaño-Narvaez J, Allan JC, Meza-Lucas A, Tapia-Romero R, Alcántara I, Mata-Ruiz O. Inmunodiagnóstico de neurocisticercosis mediante la determinación de anticuerpos y antígenos en líquido cefalorraquídeo y suero. En: Neurocisticercosis. Aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos, clínicos, imagenológicos y terapéuticos. Arrynog ediciones Santiago de Chile. 1997, 279-286.
- Craig PS. Circulating antigens, antibodies and immune complexes in experimental *Taenia pisiformis* infections of rabbits. Parasitology 1984, 89, 121-131.
- Cruz M, Davis A, Dixon H, Pawlowski ZS, Proano J. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. Bull World Health Org. 1989, 67, 401-407.
- Díaz-Camacho S, Candil RA, Suate PV, Zazueta R, Félix M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991, 45, 522-531.
- Díaz-Camacho S, Candil RA, Uribe BM, Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1990, 84, 563-566.
- Diwan AR, McCoker-Vann M, Brown M, Subianto DB, Yolken R, Desowitz R, Escobar A, Gibbs C, Gajdusek C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. Am.J. Trop. Med. Hyg. 1982, 31, 364-369.
- Dixon HBF, Lipscomb FM. Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. Prioiv Council Med Res Special Rep Ser. 1961, 229, 1-58.
- Earnest MP, Reller LB, Filley CM, Grek AJ. Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. Rev. Infect. Dis. 1987, 9, 961-979.

- Escobedo F. Neurosurgical aspects of neurocysticercosis. En: Operative Neurosurgical Techniques Schmidek and Sweet (eds). USA Grune and Stratton 2nd Edition. 1988, pp. 93-102.
- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval M, Plancarte A, Flisser A. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 1986, 24, 536-541.
- Estrada JJ, Almon-Estrada J y Kuhn ER. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 1989, 41, 50-55.
- Estrada JJ, Kuhn ER. Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis, J. Neurol. Sci. 1985, 71, 39-42.
- Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Flisser A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1990, 84, 559-562.
- Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 3ª. edición. Wiley N. Y. 1983, pp. 139-162
- Flisser A, Bulnes I, Díaz MN, Luna R, Woodhouse E, Beltrán F, Martínez I, Larralde C. Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del Estado de Chiapas. Arch. Invest. Med. 1976, 7, 107.

- Flisser A, Gonzalez D, Skurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodriguez-Carbajal J, Cohen S, Rodriguez-del-Rosal E, Collado M, Fernandez B, Fernandez F, Aluja AS. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 1. Radiological, physiological and histopathological studies. Parasitol. Res. 1990a, 76, 263-269.
- Flisser A, Gonzalez D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Stephano A, Correa D. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. Parasitol. Res. 1990b, 76, 640-642.
- Flisser A, Larralde C. Cysticercosis. En: Immunodiagnosis of parasitic diseases. Walls KW, Schantz PM (eds). Academic Press Orlando, EUA. 1986, pp. 109-161.
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis humana. UNAM- Editorial Manual Moderno. México D.F. 1997, 176 pp.
- Flisser A, Madrazo I, Plancarte A, Schantz PM, Allan JC, Craig PS, Sarti E. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after a single taeniacidal dose of praziquantel. 1993, Lancet 342, 748.
- Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders. Clin. Exp. Immunol. 1980, 39, 27-37.
- Flisser A. Taeniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*. Prog. Clin. Parasit. 1994, 4, 77-116.
- García HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VWC, Pilcher JB, Díaz JF, Candy EJ, Miranda E, Naranjo J, CWG in Peru. Discrepancies between computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1994, 50, 152-157.

- García HH, Martínez M, Gilman RH, Herrera G, Tsang VCW. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *Lancet* 1991, 338, 549-551.
- García-Noval J, Allan JC, Fletes C, Moreno E, DeMata F, Torres-Alvarez R, Soto de Alfaro H, Yurrita P, Higueros-Morales H, Mencos F, Craig PS. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1996, 55, 282-289
- Goldsmith RS, Kagan IG, Reyes G, Cedeño FJ. Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. *Bol. Ofna. Sanit. Panam.* 1971, 71, 500-506.
- Gómez-García MC. Efecto del extracto crudo y de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre el sistema del complemento *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. 1993.
- Gonzalez AE, García HH, H. Gilman RH, Gavidia CM, Tsang VCW, Bernal T, Galcon N, Romero M, Lopez-Urbina MT. Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1996, 54, 391-394.
- Gonzalez D, Rodriguez-Carbajal J, Aluja A, Flisser A. Cerebral cysticercosis in pigs studied by computed tomography and necropsy. *Vet. Parasitol.* 1987, 26, 55-69.
- Gorodezky C, Diaz ML, Escobar A, Flisser A. IgE concentration in sera of patients with neurocysticercosis. *Arch. Invest. Med. (Mex).* 1987, 18, 225-227.
- Gottstein B, Zinni D, Schantz PM. Species specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop Med Parasitol.* 1986, 38, 299-303.
- Hammemberg B, Williams JF. Physico-chemical characterization of complement-interacting factors from *Taenia taeniaeformis*. *J. Immunol.* 1978, 120, 1039-1045.

- Harrison, LJS, Joshua GWP, Wright SH, Parkhouse RME. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1989, 11, 351-370.
- Hayunga EG, Sumner MP, Letonja T. Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*. *J.Parasitol.* 1989,75, 638-642.
- Hustead St, Williams JF. Permeability astudies on taeniid cestodes. I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *Taenia crassiceps* and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 1977, 63, 314-321.
- Kalinna B, MacManus DP. An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 1993, 106, 289-296.
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991, 44, 287-296.
- Laclette JP, Merchant MT, Willms K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*, *J. Parasitol.* 1987, 73, 121-125.
- Laclette JP, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 1992, 148, 124-128.
- Laemmli V. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia*



- crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg 1989, 40, 282-290.
- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutierrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Sal. Púb. Méx. 1992, 34, 197-210.
  - Lightowers MW, Mitchell GF, Bowtell DDL, Anders RF, Rickard MD. Immunization against *Taenia taeniaeformis* in mice: studies on the characterization of antigens from oncospheres. Intl. J. Parasitol. 1984, 14, 321-333.
  - Lloyd S, Soulsby E. The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. Immunology. 1978, 34, 939-945.
  - Lumsden RD, Vogt M, Sogandares-Bernal F. The metacystode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, Academic Press N. Y. 1982, pp. 307-361.
  - Machnicka B, Grzybowski J. Host serum proteins i *Taenia saginata* metacystode cyst fluid. Vet. Parasitol. 1986, 19, 47-52.
  - Macías SR Hernández Peniche J. Cisticercosis cerebral. Prens. Méd. Mex. 1966, 5, 147.
  - Mandujano A, Vela M, Alcántara P, Correa D. Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium*. [Abstract] Bull Soc. Fr. Parasitol. 1990, 8 (Suppl. 1), 578.
  - Medina Escutia ME. Efecto de productos de cisticercos de *Taenia solium* sobre eosinófilos. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM 1992

- Medina Flores Y. Procesamiento de antígenos del cisticerco de *Taenia solium* por células de diferente origen. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM. 1991
- Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. Arch Intern Med. 1990, 150, 325-327.
- Miller B, Grimell V, Goldberg MA, Heiner D. Spontaneous radiographic disappearance of cerebral cysticercosis: three cases. Neurology 1983, 33, 1377-1379.
- Mitchel GF. Vaccines and vaccination strategies against helminths, En: Agabian N, Cerami A (eds): Parasites. Molecular Biology, Drug and Vaccine Design, New York: Wiley-Liss Publ; 1990, pp. 349-363.
- Mitchell GF. Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. En: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N.Y. 1982, pp. 575-584.
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cazares JM. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1990, 84, 205-208.
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, León- Cazares JM. Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium* cysticerci product of low molecular weight. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 1989, 31, 327-333.
- Monroy-Ostrya A, Monroy-Ostrya TJ, Gómez GJ, Hernández MO. Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 1993, 35, 91-98.

- Moralez-López Z. Producción de clonas de linfocitos T específicos contra el antígeno del cisticerco de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM 1994.
- Moses A. Dos metodos biologicos de diagnostico nas cisticercozes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911, 3, 322-326.
- Nascimento E, Tavares CA, Lopez JD. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 1987, 25, 1181-1185.
- Newell E, Vyungimana F, Geerts S, Van Kerckhoven I, Tsang VCW, Engels D. Prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burindi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1997, 91, 389-391.
- Nieto D. Diagnostico de la cisticercosis del sistema nervioso. Prensa Med Mex. 1948, 13, 226-230.
- Olivo A, Plancarte A, Flisser A. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. Intl. J. Parasitol. 1988, 18, 543-545.
- Ortiz-García DM. Expresión de péptidos recombinantes de fusión del cisticerco de *Taenia solium* para el inmunodiagnóstico de cisticercosis humana. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM. 1991.
- Ostrosky-Zeichner L, García-Mendoza E, Ríos C, Sotelo J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. Arch. Med. Res. 1996, 27, 513-517.
- Pathak KM, Allan JC, Ersfeld K, Craig PS. A western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs. Vet. Parasitol. 1994, 53, 209-217.

- Pérez-Ishiwara GD. Procesamiento de antígenos somáticos y de excreción secreción del cisticerco de *Taenia solium* por macrófagos. Tesis de Licenciatura. Facultad Ciencias. UNAM. 1993.
- Plancarte A, Fexas M, Flisser A Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. Int. J. Parasitol. 1994, 24, 733-738.
- Plancarte A, Flisser A, Larralde C. Fibronectin-like properties in antigen B from cysticercus of *Taenia solium*. Cytobios. 1983, 36, 83-93.
- Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Cancino F. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Academic Press N. Y. 1982, 179-200.
- Rabiela T, Flisser A Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol. Today 1990, 5, 357-359.
- Rabiela-Cervantes MT. Patología de la neurocisticercosis benigna y grave. En: Flisser A y Malagón F, (eds.). Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, 1a. ed., Limusa-Noriega México, 1989, pp. 107-124.
- Ramos OM, Stiebel-Chin G, Altman N, Duchowny M. Diagnosis of neurocysticercosis by magnetic resonance imaging. Pediatr. Infect Dis. 1986, 5, 470-473.
- Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. Disappointing performance of serology enzyme-linked immunosorbent assay in an unbiased sample of neurological patients. Arch. Neurol. 1992, 496, 633-636.

- Rhoads ML, Kananga-Sollo EIP, Rasic D, Murrell KD, Schantz PM, Beus A. Detection of antibody in humans and to *Taenia solium* metacestodes using an antigenic fraction from *Taenia hydatigena* metacestodes. *Veterinar Archiv*. 1987, 57, 143-150.
- Rodriguez-Canul R, Allan JC, Fletes C, Sutisna IP, Kapti IN, Craig PS. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodignosis of human *T. solium* cysticercosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1997, 4, 579-582.
- Rodriguez-Carbajal J, Boleaga-Durán B. Neuroradiology of human cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. N.Y. 1982, pp. 139-162.
- Rodriguez-del-Rosal E, Correa D, Flisser A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet Record*. 1989, 124, 488.
- Sarti E, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gomez H, Flisser A. *Taenia solium* teniasis and cysticercosis in a mexican village. *Trop. Med. Parasit*. 1988, 39, 194-198.
- Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Aguilera J, Roberts J, Flisser A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state Mexico. *Trans. Roy. Soc: Trop. Med. Hyg*. 1994, 88, 49-52.
- Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez SA, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1992, 46, 677-685.

- Sarti E. Epidemiología de la Teniasis-Cisticercosis. En Flisser A y Malagón F, (eds.), Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, 1a. ed., Limusa-Noriega México, 1989, pp. 233-242.
- Sarti EJ, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan JC, Craig PS, Bronfman M, Wijeyaratne P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in México. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1997, 556, 127-132..
- Schantz P.M., Moore A.C., Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aaron AM, Persson D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in N.Y. city. N. Engl. J. Med. 1992, 692-695.
- Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A. Community-Based Epidemiological Investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. Clin. Infect. Dis. 1994, 18, 879-85.
- Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Roberts J, Flisser A. Clinical radiological and epidemiological correlations of ELISA and immunoblot assays for *Taenia solium* cysticercosis in 2 populations. Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991, 45, 130-131.
- Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. Albendazole vs praziquantel for therapy of neurocysticercosis. A controlled trial. Arch Neurol. 1989, 46, 1231-1236.
- Sotelo J. Use of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of cysticercosis. Arch. Neurol. 1987, 44, 898.

- Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasit. Res.* 1995, 81,181-187.
- Tellez-Girón E, Ramos M, Dufour L, Alvarez P, Montante M. Detection of *Cysticercus celulosae* antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1987, 37, 169-173.
- Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350-4354.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An Enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infec. Dis.* 1989, 59, 50-59.
- Tsang VCW, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango-Sollo EIP, Rhoads ML, Murell KD, Schantz PM, Gilman RH. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM-IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 29, 69-78.
- Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira AW. Immunoblot with cerebrospinal fluids from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crsssiceps*. *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 1997, 57, 354-357.
- Vázquez V, Sotelo J. The course of seizures after treatment of cerebral cysticercosis. *New Engl. J. Med.* 1992, 327, 696-701.

- Velasco OC, Guzmán BC, Gutiérrez QM, Romero V y Pulido RMa. Comparación de una técnica de detección de antígenos solubles de *Cysticercus cellulosae*. Sal. Pub. Méx. 1983, 25, 205-208.
- Villagran-Urbe J, Olvera-Rabiela JE. La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de Mexico, En: Flisser A, Malagon F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigacion en Mexico, Mexico: Limusa-Noriega; 1989, pp. 97-105.
- Wang CY, Zhang HH, Ge LY. A MAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. Hybridoma 1992, 11, 825-827.
- Wang Yongjun, et al. The Detection of Specific and non-specific immune complexes in sera of patients with cerebral cysticercosis. Chin. J. Parasit. Dis. 1994, 10.
- Wang. CY, Li QS, Zhang HH, Su JJ, Zhang JJ, Li H, Jia FJ, Ge LY. Detection of cAg in CSF 231 cerebral cysticercosis patients. Chin.J.Parasit. Dis. 1993,11,276-278.
- Williams JF, Engelkirk PG, Lindsay MC. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N.Y. 1982, pp. 621-632
- Willms K, Arcos L *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immuno-enzyme technique. Exp. Parasit. 1977, 43, 396-401.
- Willms K, Merchant MT. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 1980, 2, 261-275.



- Wilson MR, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW. Clinical Evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectro-transfer blot in patients with neurocysticercosis. *J. Infec. Dis.* 1991, 164, 1007-1009.
- Woodhouse E, Flisser A, Larralde C. Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. N.Y. 1982, pp. 11-23.
- Zenteno-Alanís GH. A classification of human cysticercosis. En Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis present state of knowledge and perspectives.* Academic Press N.Y. 1982, pp 107-126.
- Zhang Y, Lei J, Zhang M, Wan X, Li C. Observation on dynamics of circulating antigen from patients with cysticercosis before and after treatment. *Chin. J. Parasit. Parasit. Dis.* 1995, 13, 225-226.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| ACF             | Adyuvante completo de Freund   |
| AcMc            | Anticuerpo monoclonal  |
| AcPc            | Anticuerpo policlonal  |
| Ag8             | Mieloma de ratón usado para producir anticuerpos monoclonales  |
| AgB             | Antígeno B o paramiosina del metacéstodo de <i>Taenia solium</i>                                     |
| AIC             | Adyuvante incompleto de Freund   |
| CDC             | Siglas de los Centros de Control de Enfermedades de EUA (Centers for Disease Control and Prevention) |
| Da              | Daltones   |
| EC              | Extracto crudo del metacéstodo de <i>Taenia solium</i>   |
| ELISA           | Siglas en inglés de Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay)                      |
| ENSE            | Encuesta Nacional Sero- Epidemiológica   |
| ES              | Productos de Excreción-Secreción del metacéstodo de <i>Taenia solium</i>                             |
| GP <sub>s</sub> | Glicoproteínas   |
| HI              | Hemaglutinación Indirecta  |
| HP              | Hemaglutinación pasiva   |
| IEF             | Inmunolectroforesis  |
| IET             | Inmunolectrotransferencia (Western blot)   |
| IgA             | Inmunoglobulina A  |
| IgE             | Inmunoglobulina E  |
| IgG             | Inmunoglobulina G  |
| IgM             | Inmunoglobulina M  |
| Igs             | Inmunoglobulinas   |
| IMSS            | Instituto Mexicano del Seguro Social   |
| kDa             | Kilo daltones  |
| LCR             | Líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal   |
| NC              | Neurocisticercosis   |
| PHMB            | Para-hidroxi-mercuri-benzoato de sodio (inhibidor de proteasas)                                      |
| PB10x           | Solución de fosfatos de sodio 0.1M, pH 7.2   |
| PBS             | Solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos de sodio 0.01M, pH 7.2                             |
| PBS-T           | PBS con tween-20 al 0.05%  |
| PMSF            | Fenilmetilsulfonil fluoruro (inhibidor de proteasas)   |
| RM              | Resonancia Magnética   |
| RM              | Razón de Momios  |
| SNC             | Sistema Nervioso Central   |
| TC              | Tomografía Computada   |
| TLCK            | N- $\alpha$ -p-tonsil-lisina cloro-metil-cetona (inhibidor de proteasas)                             |
| TPCK            | L-1-tonsilamida 2-feniletil-cloro-metil-cetona (inhibidor de proteasas)                              |
| VPN             | Valor predictivo Negativo  |
| VPP             | Valor Predictivo Positivo  |

## SUMMARY

Most immunological methods used for human and animal cysticercosis are based on the search of specific antibodies in serum or cerebrospinal fluid. Although they have been useful to support clinical diagnosis, these methods not necessarily reflect an active infection, which can be better detected by antigen detection systems. Antigen identification can be of help to follow up treatment of confirmed cases, as well as for epidemiological studies focused on transmission. In this thesis the results of various studies focused on the detection of *Taenia solium* antigens are presented.

The antigenic diversity searched by western blot in CSF and serum, was shown to be quite restricted. An antigen of 200 kDa was dominant, mainly in CSF of cases with multiple cysts localized in the subarachnoid space. Besides, other 4 antigens were found with lower frequencies. This apparent lack of antigens could be due to antigen clearance or sequestration in the host tissues.

An interesting finding was the presence of host molecules among the excretion-secretion products (ES) of the metacestode: a monoclonal antibody produced against the ES reacted with a human serum component, probably fibrinogen. Moreover, this antigen was processed by the parasite, since the antibody reacted with low molecular weight peptides of the ES.

Antigen detection by capture ELISA varied in sensitivity from 14 to 93% depending on the antibody combination used for the assay, being more effective those antibodies that recognize molecules of 200 kDa or higher.

From the studies performed in endemic communities, it is suggested that antigen detection in serum can be used as a useful tool to identify active cases of cysticercosis, since a strong association of a positive reaction was found with late onset epilepsy. Besides, 2 out of 3 antigen-positive subjects presented live cysts within the brain, as demonstrated by computed tomography.

## APÉNDICE. PUBLICACIONES PRESENTADAS

1. Correa D, Sarti JE, Tapia-Romero R, Rico R, Alcántara-Anguiano I, Salgado A, Valdez L, Flisser A. Antigens and antibodies in serum of people with epilepsy and taeniosis from an endemic area for cysticercosis in Mexico. *J. Parasitol.* (sometido, se anexa carta de envío).
2. Mata-Ruiz O, Meza-Lucas A, Proaño-Narvaez J, Correa D. Identification of parasite antigens in serum and cerebrospinal fluid from patients with different types of neurocysticercosis. *Trans.Roy. Soc. Trop. Med.Hyg.* (sometido, se anexa carta de envío y acuse de recibo).
3. Correa-Beltrán MD, Proaño-Narvaez J, Allan JC, Meza-Lucas A, Tapia-Romero R, Alcántara I, Mata-Ruiz O. Inmunodiagnóstico de neurocysticercosis mediante la determinación de anticuerpos y antígenos en líquido cefalorraquídeo y suero. En: *Neurocysticercosis. Aspectos epidemiológicos, patológicos, inmunológicos, clínicos, imagenológicos y terapéuticos.* Arrynog ediciones Santiago de Chile. 1997, 279-286.
4. Aranda-Alvarez JG, Tapia-Romero R, Alcántara-Anguiano I, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Celis-Quintal G, Grijalva-Otero G, Correa D. (1995) Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Potosí, México. *Ann.Trop.Med. Parasitol.* 89, 689-92.
5. Rodríguez del Rosal E, Correa D, Flisser A (1989). Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet. Record.* 124,488.
6. Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Parkhouse ME, Plancarte A, Meza -Lucas A, Flisser A. (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 814-816.
7. Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Meza-Lucas A y Flisser, A. (1989). Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia* 57,93-9.

Antigens and antibodies in serum of people with epilepsy or taeniosis from an endemic  
area for *Taenia solium* cysticercosis in Mexico

Dolores Correa<sup>1</sup>, Elsa Sarti<sup>2</sup>, Raquel Tapia-Romero<sup>1</sup>, Rosa Rico<sup>3</sup>, Isabel Alcántara-  
Anguiano<sup>1</sup>, Araceli Salgado<sup>3</sup>, Lilia Valdez<sup>3</sup>, Ana Flisser<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA. México D.F.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Salud Pública, SSA. Cuernavaca, México

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Address for correspondence: Dolores Correa. Instituto Nacional de Diagnóstico y  
Referencia Epidemiológicos, SSA. Carpio 470.. Col. Sto. Tomás. México 11340, D.F.

Tel. (525) 341-2068 Fax. (525) 341-3264 / 341-9935

E-mail: mcorreaa@mail.main.conacyt.mx

## **ABSTRACT**

Human neurocysticercosis is a parasitic disease important in developing countries. Most epidemiological studies have used antibody-based assays that allow the detection of transmission “hot spots”, and reveal the main risk factors for transmission, although they have low value to detect active cases of cysticercosis. In this study we compared the performance of the most commonly used antibody-detection technique, EITB, with an antigen-capture ELISA to evaluate their screening potential in an endemic region of Mexico. We selected 68 people with epilepsy, 35 patients with taeniosis and a randomly selected group of 133 individuals from the same region. We found antibodies and antigens in a higher frequency in the first groups, as compared to the control group. The main findings were the association of antibodies with the presence of subcutaneous nodules, and of antigens with epilepsy. The sensitivity of both tests to detect either epilepsy or taeniosis was low, but the specificity and the positive predictive value of the antigen capture assay in the group of cases with epilepsy was high. The results suggest that an antigen-detection test is more reliable to detect active cases of neurocysticercosis for epidemiological studies in endemic regions.

Human neurocysticercosis is a parasitic disease of public health importance in developing countries (FLISSER, 1994). It accounts for 30 to 80% of late onset epilepsy cases in underdeveloped countries. (MEDINA *et al*, 1988; TORRES L, 1992; SANCHETTE *et al*, 1991). Community-based epidemiologic studies have shown that the distribution of cases of cysticercosis in humans and pigs is largely focal, being associated with people having active or recent taeniosis. (SARTI *et al*, 1988; DÍAZ-CAMACHO, 1990; SCHANTZ *et al*, 1992). In the last decade, many research groups have reported improvements in the serodiagnosis of cysticercosis and teniosis, and several serological techniques have been applied in field studies (SCHANTZ ET AL, 1994). Nevertheless, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a crude extract and the enzyme-linked electroimmuno transfer blot assay (EITB) with lentil-lectin enriched glycoproteins as antigens, presented low positive predictive values when compared with computed tomography (CT) or late onset epilepsy (SCHANTZ *et al*, 1991, 1994; GARCÍA *et al*, 1993).

Some antigen detection systems have been developed for diagnosis of clinical cases in cerebrospinal fluid (CSF), with sensitivities ranging from 14 to 72% (TELLEZ-GIRON *et al*, 1987; CORREA *et al*, 1989). Furthermore, a polyclonal antibody- based antigen capture assay was adapted for epidemiological studies, and some positive cases were confirmed by CT (ARANDA-ALVAREZ *et al*, 1995). In order to further analyse the value of an antigen detection assay in epidemiological studies and to compare it with an antibody detection system, a nested case control study in three rural communities from an endemic area of Mexico was performed.

## SUBJECTS AND METHODS

Epidemiological data and samples from 7,000 people living in three endemic rural communities for *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis (Atotonilco, Tetelilla and Chalcatzingo, State of Morelos, Mexico) were used. Thirty-six people with laboratory confirmed taeniosis by *Taenia solium*, as well as 68 with epilepsy (generalised seizures

with loss of consciousness) were considered the case group; 133 randomly selected individuals without these problems were considered the control group; the serum of these persons was taken from the serum bank of the communities, in order to search for antigens and antibodies:

Samples were analysed by ELISA for antigen detection (ARANDA-ALVAREZ 1995) and by EITB for antibody detection (TSANG *et al* 1989). Variables of demographic characteristics, intestinal parasitic diseases, as well as other signs and symptoms compatible with cysticercosis (i.e. focalized seizures, faints and subcutaneous nodules), were obtained from the data bank. These variables were associated with the immunologic results using the SPSS-PC and EPI-INFO software programs to perform odds ratio, 95% confidence interval, and  $X^2$ , Fisher exact or ANOVA statistical analyses (HENNEKEN 1987; ROTHMAN, 1986).

## RESULTS

In the present study we analysed the presence of antigens and antibodies in the serum of people living in an endemic area who presented either taeniosis or epilepsy, separately, or together (considered the case group), and compared with a control group. The frequency of antigens and antibodies in the case groups was higher than in the control group (table I); statistical significance was obtained for the presence of antigens in the case group and in the one with epilepsy, and for antibodies in the case group although the significance is lost when this group was stratified. There was no difference in the age mean when comparing cases and controls (23 vs 21 years, respectively;  $F=128$ ;  $p=0.25$ ), antigen positive and antigen negative persons ( $F=0.36$ ;  $p=0.54$ ), or antibody positive and antibody negative individuals ( $F=2.18$ ;  $p=0.14$ ). Nevertheless, a near mirror-like behaviour of antigen and antibody frequencies when plotted against age range was found (figure).

The analysis of the association of other data bank variables to antigens or antibodies detection rendered the significant results summarised in table II. As it can be



seen, antibodies were associated only to the presence of subcutaneous nodules, and antigens to epilepsy, taeniosis or focal seizures; although these latter two were associated with border line significance. Other intestinal parasitic were not associated to either antigens or antibodies detection.

Sensitivity, specificity and predictive values were also calculated considering the case group as a whole, as well as for the epilepsy and the taeniosis groups separately (table III). A lower sensitivity but higher specificity was found for antigens than for antibodies. Likewise, positive predictive values (PPV) were in all cases higher for antigen than for antibody detection, and it was low when analysing the taeniosis group alone. Negative predictive values (NPV) were low for both techniques when the cases were grouped.

## DISCUSSION

Antibody detection systems have been useful in epidemiological studies to analyse the risk factors associated to *Taenia solium* transmission (DÍAZ-CAMACHO *et al*, 1990; SCHANTZ *et al*, 1991 ;1994; Sarti *et al*, 1988; 1994 ;1997); high prevalence of antibodies in a community suggests a transmission "hot spot" where preventive and control methods should be applied. On the other hand, the variation in test sensitivity and specificity for epidemiologic studies become important when we consider the positive predictive values. Of particular significance for epidemiologic studies is specificity, especially in diseases of low prevalence, in which a false positive rate of even 2%, reduces test accuracy to 30 -50%. For these reasons, a test with a specificity close to 100% becomes essential in epidemiological studies (SCHANTZ and SARTI, 1989). In this study the highest specificity and PPV was found for the antigen detection assay.

Although antibodies have been associated to epilepsy (GARCÍA *et al*, 1997; SCHANTZ *et al*, 1994) they have not been proven to be useful for case detection, because a low specificity has been found, and, as a consequence, also a low PPV, i.e. 5.6% in relation to epilepsy and 27% to CT (SCHANTZ *et al*, 1994). In the present study a low

PPV of 37.5% was also found for antibodies when calculated for the group with epilepsy; this could be explained because the presence of antibodies presumably reflect the ingestion of eggs, with or without the subsequent establishment of cysticerci. In this regard, an interesting finding was the association of antibodies with the presence of subcutaneous nodules (table II); these nodules could have been cysticerci, but it was not confirmed since biopsies were not taken from these individuals, because of ethical reasons.

Antigen detection assays might be more useful to detect cases of active cysticercosis, since they are based on the detection of parasite products in the host's fluids. In this regard, it is interesting to note the strong association of serum antigens with epilepsy found in the present study (tables I and II), as well as the highest PPV (table III). This was also found in a cross-sectional study performed in an open community in which 2 of the 3 antigen-positive persons that accepted being submitted to CT scans harboured cystic parasites within the brain (ARANDA-ALVAREZ *et al*, 1995). Conversely, a recent study reported no association of seric antigens with epilepsy (NEWELL *et al*, 1997). Several aspects of the design could explain the differences. Among them, the control group was randomly selected in this study, while it was composed by the family members of the cases in the other study. This is very important since it is well known that cysticercosis is transmitted in a cluster-like form (SARTI *et al*, 1988; DÍAZ-CAMACHO, 1990; SCHANTZ *et al*, 1992); thus, other cases of cysticercosis or of taeniosis could be present among the family members. Also the antigen-capture system was quite different: they used a *Taenia saginata* reactive monoclonal antibody (BRANDT *et al*, 1992), while we used a *T. solium* reactive polyclonal antibody for the capture assay.

The sensitivity of the antigen detection system used in the present study was low considering all cases of epilepsy. Nevertheless, we would expect to detect only cases of active cysticercosis by demonstration of antigens in serum. It has been shown that about 70% of cases with late onset epilepsy in an endemic region have neurocysticercosis

(MEDINA *et al*, 1990), and that 50-70% of these harbour calcified cysts. Thus, from 68 cases with epilepsy in the present study, 49 would harbour cysticerci within the brain, and from these, 15 to 24 (30 to 50%) were expected to be cases with active cysticercosis in this study, i.e. with circulating antigens. Since 13 cases from the group with epilepsy were positive in the antigen assay, a sensitivity from 54 to 87% was calculated for active case detection. The high PPV obtained for this group with the antigen supports its use in the detection of cases of active neurocysticercosis. On the other hand, in a previous work, one of the two CT-confirmed patients detected by the antigen-capture assay was asymptomatic. Thus, our data support the usefulness of antigen capture assays for detection of cases with active cysticercosis. This would have a beneficial impact on the patients and on the evidence of actual transmission of cysticercosis to humans within a community.

Circulating antigens were found in 7 out of 36 individuals harbouring the adult tapeworm, although without statistical significance and low PPV. The positive cases could be explained by the presence of adult tapeworm antigens in the circulation, or by a clinically silent concomitant cysticercosis. There are not data in the literature regarding this problem.

An interesting finding of the present work was the inverse relation between the presence of antigens and antibodies when plotted against age range. Especially interesting is the presence of antibodies in the age below 5 years. These antibodies could be due to maternal transfer or to augmented exposure of children without infection or symptoms. Conversely, antigens were less frequent in this age group and rose after 20 years of age, which corresponds to the age of higher prevalence of cysticercosis itself. On the other hand, these results suggest that the low sensitivity of the antigen detection test can be due to the presence of antibodies in the sample that interfere with the assay. In this regard, it worth to mention that only few cases have been positive in both tests simultaneously.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by the Pan American Health Organization grant No. AMR92/12427-4, United Nations Developing Program grant "Mex 93/007/01", IDRC grant No. 3-P-90-0078 and European Community grant No. C11-CT 940081.

## REFERENCES

- Allan, J.C., Avila, G., Garcia-Noval, J., Flisser, A., Craig, P.S. (1990). Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. **101**, 473-477.
- Aranda-Alvarez, J.G., Tapia-Romero, R., Alcántara-Anguiano, I., Meza-Lucas, A., Mata-Ruiz, O., Celis-Quintal, G., Grijalva-Otero, I.E., Correa, D. (1995). Human cysticercosis: risk factors associated with seric antigens in an open community of Mexico. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **89**, 689-692.
- Brandt, J.R., Gueerts, S., De Deken, R., Kumar, V., Ceulemans, F., Brijs, L., Falla, N. (1992). A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *International Journal for Parasitology* **22**, 471-477.
- Correa, D., Sandoval, M. A., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M.E., Plancarte, A., Meza-Lucas, A. and Flisser, A. (1989). Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 814-816.
- Díaz-Camacho, S., Candil, A., Uribe, M. & Willms, K. (1990). Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 563-566.
- Flisser, A. (1994). Taeniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Progress in Clinical Parasitology* **4**, 77-116.
- Henneken C. (1987). *Epidemiology in Medicine*. 1<sup>st</sup>. Edition. Little Brown & Co. pp. 248-257, 331.
- Medina, M.T., Rosas, E., Rubio-Donnadieu, F. & Sotelo, J. (1990). Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Archives of Internal Medicine* **150**, 325-327.

Newell E, Vyungimana F, Geerts S, Van kerkhoven I, Tsang VCW, Engels D. 1997. Prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burundi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **91**, 389- 391.

Rothman, K. (1986). Modern epidemiology. 1<sup>st</sup>. Edition. Little Brown & Co. pp. 169.

Sanchette, P.C., Venkataraman, C.S., Dhamija, R.M., Roy, A.K. (1991). Epilepsy as a manifestation of neurocysticercosis. *Journal Association of Physicians of England* **3**; 325-328.

Sarti, E., Schantz, P., Plancarte, A., Wilson, M., Gutierrez, I., Aguilera, J., Roberts, J. & Flisser, A. (1994). Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **68**, 49-52.

Sarti, E., Schantz, P.M., Lara, R., Gomez, H. & Flisser, A. (1988). *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis in a Mexican village. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **39**, 194-198.

Sarti, E., Flisser, A., Schantz, P., Gleizer, M., Loya, M., Plancarte, A., Avila, G., Allan, J., Craig, P., Bronfman, M. & Wijeyaratne, P. (1997). Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **56**, 127-132.

Schantz, P.M., Sarti, E., Plancarte, A., Wilson, M., Criales, J.L., Roberts, J. & Flisser, A. (1994). Community-Based Epidemiological Investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clinical Infectious Diseases* **18**, 879-885.

Schantz, P.M., Sarti E. (1989) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia* **57**, 153-163

Tellez-Girón, E., Ramos, M., Dufour, L., Alvarez, P. & Montante, M. (1987). Detection of *Cysticercus celulosae* antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-

linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37, 169-173.

Torres L. Neurocysticercosis and epilepsy in Perú. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 1992, 94 S; 153-154.

Tsang, V.C.W., Brand, J.A. & Boyer A.E. (1989). An Enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases* 59, 50-59.

Figure legend

Prevalence of antigens (circles) and antibodies (squares) according to age group.

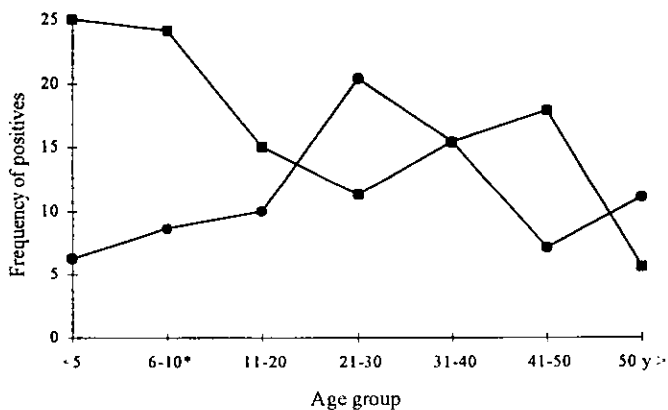


Table I. Frequency of antigen and antibody detection in the groups studied

| Frequency of: | Group:  |       |       |          |       |           |       |
|---------------|---------|-------|-------|----------|-------|-----------|-------|
|               | Control | Cases | p*    | Epilepsy | p     | Taeniosis | p     |
| Antigens      | 6.7     | 17.5  | 0.009 | 19.1     | 0.018 | 19.4      | 0.098 |
| Antibodies    | 12.8    | 22.3  | 0.049 | 22.1     | 0.180 | 22.2      | 0.350 |

\* Chi-square



Table II. Factors associated with antibodies and antigens in serum

|                         | Antibody positive<br>(n=40) |      | Antibody negative<br>(n=197) |      | OR*  | 95% CI <sup>b</sup> | p <sup>&amp;</sup> |
|-------------------------|-----------------------------|------|------------------------------|------|------|---------------------|--------------------|
|                         | n                           | (%)  | n                            | (%)  |      |                     |                    |
| Subcutaneous<br>nodules | 3                           | 7.5  | 3                            | 1.5  | 5.22 | 1.0 - 23.4          | 0.02               |
|                         | Antigen positive<br>(n=27)  |      | Antigen negative<br>(n=209)  |      | OR*  | 95% CI <sup>b</sup> | p <sup>&amp;</sup> |
|                         | n                           | (%)  | n                            | (%)  |      |                     |                    |
| Epilepsy                | 13                          | 48.1 | 55                           | 26.3 | 2.60 | 1.1 - 6.4           | 0.01               |
| Focal seizures          | 4                           | 14.8 | 12                           | 5.7  | 2.86 | 0.7 - 10.8          | 0.07               |
| Taeniosis               | 7                           | 25.9 | 29                           | 13.8 | 2.17 | 0.7 - 6.1           | 0.09               |

\* Odds ratio; <sup>b</sup>95% confidence interval; <sup>&</sup>Chi square or Fisher exact test.

**Table III. Sensitivity, specificity and predictive values for antigen and antibody detection.**

|             | Cases         |               | Epilepsy      |               | Taeniosis     |               |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|             | Antigens      | Antibodies    | Antigens      | Antibodies    | Antigens      | Antibodies    |
| Sensitivity | 17.5          | 22.3          | 19.1          | 22.1          | 19.4          | 22.2          |
|             | (11.0 -26.5)  | (15.0 - 31.8) | (11.0 -30.8)  | (13.3 - 34.1) | (8.8 - 36.6)  | (10.7-39.6)   |
| Specificity | 93.3          | 87.3          | 91.7          | 85.1          | 90.0          | 84.1          |
|             | (87.3-96.7)   | (80.2 - 92.2) | (86.1 - 95.2) | (78.6 - 90.0) | (84.8 - 93.7) | (78.1 - 88.7) |
| PPV         | 66.7          | 57.5          | 48.1          | 37.5          | 25.9          | 20.0          |
|             | (46.0 - 82.8) | (41.0 - 72.6) | (29.2 - 67.6) | (23.2 - 54.2) | (11.9 - 46.6) | (9.6 - 36.1)  |
| NPV         | 59.5          | 59.4          | 73.7          | 73.0          | 86.2          | 85.8          |
|             | (52.5 - 66.2) | (52.2 - 66.2) | (67.1 - 79.4) | (66.1 - 78.9) | (80.6-90.4)   | (79.9-90.2)   |

PPV= positive predictive value; VPV= negative predictive value. In parenthesis are the 95% confidence intervals

**Identification of parasite antigens in serum and cerebrospinal fluid from patients with  
diverse clinical types of neurocysticercosis**

**Olga Mata-Ruiz, Antonio Meza-Lucas, Jefferson V. Proaño-Narvaez\* and Dolores Correa**

Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
Coordinación de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades.  
Secretaría de Salud. México

\*Unidad de Investigación en Neurociencias. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo  
XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. México

Correspondence: Dolores Correa. Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de  
Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. SSA. Carpio 470. Col. Sto. Tomás. México D.F. C.P.  
11340

Tel. (525) 341-2068 Fax. (525) 341-3264 / 341 9935

E-mail: mcorreea@mailer.main.conacyt.mx

**Subject: New Manuscript Submission**

**Date:** Tue, 2 Dec 1997 12:28:27 -0500

**From:** esch@wfu.edu (Gerald W. Esch)

**To:** mcorreaa@mailier.main.conacyt.mx

Dear Dr. Correa,

This is just a quick note to let you know that we received your recent manuscript submission to the Journal of Parasitology. In the future when making inquiries about the manuscript please refer to the following GE number:

GE-1429 Mata-Ruiz et al., Identification of parasite antigens in serum and cerebrospinal fluid from patients with diverse clinical types of neurocysticercosis

Sincerely yours,  
Vickie

PS: Beginning December 15, our area code is suppose to change from 910 to 336.

-----  
Vickie Hennings, Assistant to the Editor  
Journal of Parasitology  
phone: (910) 758-4487  
fax: (910) 758-6008  
email: esch@wfu.edu



SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGIOS  
Carpio 470, Col. Sto. Tomás, México 11340 DF.  
Tel 341-2068 Fax: 341-3264 E-mail: indre@cenids.ssa.gob.mx

Mexico city, November the 25 th, 1997

Gerald W. Esch  
Editor  
Journal of Parasitology  
Department of Biology  
Wake Forest University, P.O. Box 7629  
Winston-Salem, North Carolina 27109

Dear Sir:

This is to submit the manuscript entitled " Identification of parasite antigens in serum and cerebrospinal fluid from patients with diverse clinical types of neurocysticercosis " by Olga Mata Ruiz, Antonio Meza Lucas, Jefferson V. Proaño Narvaez and Correa Dolores for publication in the Journal of Parasitology.

In this study we are providing evidence of the presence various antigens in serum and CSF of patients with neurocysticercosis, and relate their presence to the location, type and number of cysts. We think the information provided in this paper could be important for scientists devoted to Parasitology, and interested in infections of the central nervous system. Our results add information to the few data already available in this specific topic, which has both scientific and diagnostic importance.

Hoping that the paper will full-fill the scope and the standard of the Journal, and thus will deserve its publication, I remain, sincerely

Dolores Correa

Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia  
Epidemiológicos, S.Sa. Carpio 470. Col. Sto. Tomás. México D.F. 11340  
Tel (525) 341-2068 & Fax: (525) 341-3264 or 341-9935.  
E-mail: mcorreaa@mail.mex.conacyt.mx

RH MATA ET AL -PARASITE ANTIGENS PRESENT IN HUMAN CYSTICERCOSIS

**ABSTRACT,** Antigens have been scarcely searched in human neurocysticercosis and only in cerebrospinal fluid (CSF). Thus, few data about different antigens present in CSF are available. Also, the antigens present in serum have not been identified. In this work we identified parasite antigens in paired CSF and serum samples from cases with neurocysticercosis by immunoelectrotransfer blot assay. Three antigens of 200, 190 and 50kDa were found in 12 CSF samples, under reducing conditions; in two of these cases 4 antigens were found in serum, 2 of 183 and 105 kDa under reducing conditions, and 2 of 97 and 80 kDa, under non-reducing conditions. Cases were classified according to number, location and type of parasites. Antigens were found only in cases with active cysticercosis due to multiple cysts; cases with single lesion or calcified parasites were negative. Also they were detected in cases with parasites located in various sites of the central nervous system, but not when located within the parenchyma. We also searched for cross-reactive antigens in the serum of cases with other parasitic infections. Antigenic bands similar as well as different to those detected in patients with cysticercosis were found in a few cases of taeniosis, *larva migrans* infection and hymenolepiosis.

Human neurocysticercosis (NC), due to the establishment of the metacestode of *Taenia solium* within the central nervous system, is an important public health problem in developing countries (Flisser, Madrazo, and Delgado, 1997). Its diagnosis is mainly based on modern imaging techniques, computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), supported by clinical data and immunodiagnostic tests (Madrazo and Flisser, 1992). The latter are based on the demonstration of specific antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) and serum (Flisser, 1994). In general, results show that antibodies are present in a large proportion of cases, although they not necessarily indicate the presence of an active infection. For this reason, antigens have been investigated, and demonstrated, in CSF of cases with NC by different groups (Tellez-Girón et al., 1987, Correa, Plancarte et al., 1989; Correa, Sandoval et al., 1989, Chang-Yuan, Hong-Hua and Ling-Yun 1992; Seung-Yull et al., 1992; Chang-Yuan et al., 1993; Yonghao et al., 1995). Furthermore, there is evidence suggesting that antigens can also be present in serum: during an epidemiological survey, a correlation between the presence of circulating antigens with convulsive crisis and CT images compatible with cystic NC was found (Aranda-Alvarez et al., 1995). Few data regarding the diversity of these antigens have been published, they suggest the presence of at least 3 different antigens in CSF (Correa, Plancarte et al., 1989; Correa, Sandoval et al., 1989; Estrada, Almon-Estrada, and Kuhn, 1989; Choromanski, Estrada, and Kuhn, 1990; Seung-Yull et al., 1992). Nevertheless, the relationship between the presence of these antigens and the number, location and type of parasites, as well as the frequency and diversity of antigens concomitantly present in CSF and serum samples of each case, are questions that had not been addressed yet. The presence of cross-reactive antigens in the serum of other parasitic diseases has not been analyzed either. The present work was designed to explore these questions.



## MATERIALS AND METHODS

All patients with neurological disorders were admitted to the service of neurology of the "Hospital de Especialidades, Centro Médico Siglo XXI, IMSS", for routine diagnosis and treatment. Twenty-nine patients with NC were grouped according to CT or MRI images. 5 patients with inactive cysticercosis (i.e. with calcifications only), 6 patients with single cyst, and 18 patients with multiple cysts with or without calcifications. Ten cases with other neurological problems, i.e. aneurysm, tuberculosis, and subarachnoid hemorrhage were also analyzed as controls. Samples of serum and CSF were taken from all neurocysticercosis patients, CSF from all neurological controls, serum from 10 healthy people, and 13 from individuals with other parasitic diseases. All samples were kept at -20°C until use.

Antigens were searched by EITB as follows: 40µg of sample's total protein, determined by the method of Bradford (1976, BIO-RAD), were submitted to SDS-polyacrilamide gel electrophoresis under reducing and non-reducing conditions (Laemmli, 1970), and transferred onto nitrocellulose membranes (NCM) (Towbin et al., 1979). NCM were blocked overnight at 4°C with 5% skim milk (Nestlé, México) in 0.01 M phosphate buffered 0.15M saline, pH 7.2 (PBS) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). NCM were washed 3 times with PBS-T and 2 times with PBS for 5 min each. All incubations and washes were at room temperature with soft stirring. A rabbit polyclonal antiserum, prepared against a saline crude extract of the metacestode, was diluted 1:50 in PBS-T and incubated with the NCM for 2 h. After 5 washes with PBS-T and PBS, as described before, an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co.) diluted 1:500 in PBS-T, was added and incubated for 2 h. Further washing was performed and the reaction developed with the substrate solution: 25 mg de 4-chloro-1-naphthol (Sigma Chemical Co.) dissolved in 5 ml of methanol, 25 ml of PBS and 25 µl of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When the bands developed, NCM were exhaustively washed with water, in order to stop the

reaction. Antibodies were searched in ELISA following the method reported by Espinoza et al (1986) which has a sensitivity of 85% and 72% in CSF and serum, respectively.

## RESULTS

Fig. 1 shows EITB results of some serum and CSF samples from patients with NC and controls. As it can be seen 2 antigens of 183 and 105 kDa were detected in a few serum samples from patients under reducing conditions, and 2 bands of 97 and 80 kDa under non-reducing conditions. Also, 3 specific bands of around 200, 190 and 50 kDa were observed in CSF samples under reducing conditions, while no bands were found under non-reducing conditions. The frequency of each antigenic band in relation to parasite location in the group of antigen-positive cases is shown in fig. 2. The 200-kDa band was the most frequent in CSF samples, being in 60% of the positive CSFs. On the other hand only 2 samples of serum were positive, being the 97-kDa band the only present in both. Regarding parasites' location no antigen could be found in cases of parenchymal cysticercosis. Worth to mention is one case with multiple mixed cysticercosis; all bands identified were present in CSF and serum.

Overall results on antigen and antibody detection in relation to number and type of parasites are shown in table I. The group of cases with multiple cysts presented the highest frequency of antigens and antibodies, especially in CSF. Moreover, 8 cases were simultaneously positive for antigens and antibodies in CSF and 2 in serum. Only antibodies were detected in cases with single cysts or calcified parasites, mainly in CSF, only one case with a single lesion presented antibodies in both samples. Antigens were not found in these groups.

Antigen detection by EITB in serum samples from patients with different parasitic diseases is shown in fig. 3. As it can be observed 2 out of 3 patients with taeniosis by *T. solium*, and 1 out of 4

with *larva migrans* infection presented antigenic bands with molecular weights similar to the ones found in patients with cysticercosis (i.e. 183, 105 or 97 kDa). Besides these cases, other bands not found in the group of patients with cysticercosis (150, 141, 120 and 110 kDa) were detected in 1 out of 3 patients with taeniosis, the patient with hymenolepiosis and 2 out of 4 patients with *larva migrans*.

## DISCUSSION

In the present study 3 different antigens were identified in the CSF of patients with NC of 200, 190 and 50 kDa. Probably the largest two correspond to the ones found by Estrada, Almon-Estrada, and Kuhn (1989) of ~230 and 190 kDa in 14 out of 18 CSF samples, and to the antigens demonstrated by HPLC-ELISA by Choromanski, Estrada, and Kuhn (1990). Similarly, with the use of a monoclonal antibody specific for an excretion/secretion antigen of 200 kDa, we found 72% positive CSF samples from NC patients and 79% serum samples from naturally infected pigs (Correa, Sandoval et al., 1989; Rodriguez-del-Rosal, Correa, and Flisser 1989). Also, all *T. saginata* infected cattle had this antigen in serum (Harrison et al., 1989). Thus, a dominant antigen of around 200 kDa seems to be present in a substantial proportion of human and animal cases of cysticercosis. The 183-kDa molecule found in serum in the present study could be related to one of the molecules found in CSF (200 or 190 kDa). Two other antigens have been found in CSF, in lower frequencies: one molecule of 150 kDa, detected in 11% of 276 cases (Seung-Yull et al., 1992) and the paramyosin of *T. solium* of 100 kDa, commonly known as antigen B (Laclette et al., 1991), present in 14% of 33 cases (Correa, Sandoval et al., 1989). The 105 and 97 kDa molecules found in the present study under reducing and non-reducing conditions, could correspond to antigen B, since they have a similar molecular weight. It is worth to mention that these two bands were present in 2 out of 3 cases with taeniosis, but concomitant metacestode infection in these cases could not be excluded. The other 2 bands of 80 kDa in serum and of 50 kDa in CSF have

not been described before. Thus, it seems that several antigens can be present in patients' fluids. It is important to stress that conformational epitopes are not detected by the method used herein, thus some additional antigens could be present. On the other hand, several antigens different from those found in cysticercosis cases were identified in serum samples from patients with other parasitic diseases. These cross-reactive antigens share epitopes with molecules of the cysticercus, but it remains to determine the structural and functional relationships between the molecules of the different parasites. More important for diagnosis, is the fact that these antigens could be giving false positive results.

When comparing the presence of antibodies and antigens in serum and CSF samples of each patient, we observed that both were less frequent in serum; this was expected, because all patients were harboring cysticerci within the central nervous system and because of the brain-blood barrier. The presence of antigens in the serum of 2 cases could be either due to the release of antigens from the brain into the circulation, due to a damage of the brain-blood barrier, or to the presence of extra-cerebral cysts in the same patient. On the other hand, the lack of antigens in cases with parenchymal NC was interesting; this was also found for antibodies by Wilson et al., (1991). This further emphasizes the great importance of the body compartments on the host-parasite relationship, seemingly brain parenchyma is immunologically more silent than CSF spaces. Antigen-detection methods are expected to be more accurate to demonstrate an active infection, and thus, they have been postulated for monitoring treatment (Yonghao, et al., 1995). Our results support this, for cases of multiple parasites but excluding NC of the parenchyma.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are thankful to Agustín Plancarte, Facultad de Medicina, UNAM, for providing serum samples from patients with various parasitic diseases. This work was partially supported by the Pan-American Health Organization grant AMR92/12427-4, and the United Nations Developing Program Mex 93/007/01

## LITERATURE CITED

- Aranda-Alvarez, J. G., R. Tapia-Romero, I. Alcántara-Anguiano, A. Meza-Lucas, O. Mata-Ruiz, G. Celis-Quintal, G. Grijalva-Otero, and D. Correa. 1995. Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Potosi, México. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89: 689-692.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chang-Yuan, W., Z. Hong-Hua, and G. Ling-Yun. 1992. A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma* 11: 825-827.
- Chang-Yuan, W., L. Qing-Shan, Z. Hong-Hua, S. Ji-Jing, Z. Jing-Ju, L. Hui, J. Feng-Ju, and G. Ling-Yun. 1993. Detection of cAg in CSF of 231 cerebral cysticercosis patients. *Chinese Journal of Parasitic Diseases* 11: 276-278.
- Chromanski, L., J. J. Estrada, and R. E. Kuhn. 1990. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. *Journal of Parasitology* 76: 69-73.
- Correa, D., A. Plancarte, M. A. Sandoval, E. Rodríguez del Rosal, A. Meza-Lucas, and A. Flisser. 1989. Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia* 57: 93-99.
- Correa, D., M. A. Sandoval, L. J. S. Harrison, R. M. E. Parkhouse, A. Plancarte, A. Meza-Lucas, and A. Flisser. 1989. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products

in cerebrospinal fluid Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 83: 814-816

Espinoza, B., G. Ruiz-Palacios, A. Tovar, M. A. Sandoval, A. Plancarte, and A. Flisser. 1986. Characterization by enzyme-linked-immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology 24: 536-541

Estrada, J. J., J. Almon-Estrada, and E. R. Kuhn. 1989. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41: 50-55.

Flisser, A. 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. Progress in Clinical Parasitology 4: 77-116.

Flisser, A., I. Madrazo, and H. Delgado. 1997. Cisticercosis humana, 1st ed. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México D. F., México, 176 p.

Harrison, L. J. S., G. W. P. Joshua, S. H. Wright, and R. M. E. Parkhouse. 1989. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. Parasite Immunology 11: 351-370.

Laclette, J.P., A. Landa, L. Arcos, K. Willms, A. E. Davis, C. B. Shoemaker. 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda). Molecular and Biochemical Parasitology 44: 287-296.

Laemmli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

- Madrazo, I and A Flisser 1992 Parasitic infestations of the cerebrum: cysticercosis *In* Brain surgery, complication avoidance and management J M Apuzzo (ed ) Churchill Livingstone, New York, U S A., p. 1419-1430
- Rodriguez del Rosal, E., D. Correa, and A. Flisser. 1989 Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum, Veterinary Record **124**: 488-488.
- Seung-Yull, C., K. Yoon, K. Suk-Il, and K. Shin-Yong. 1992. Measurement of 150 kDa protein of *Taenia solium* metacestodes by antibody-sandwich ELISA in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. The Korean Journal of Parasitology **30**: 299-307.
- Tellez-Girón, E., M. C. Ramos, L. Dufour, P. Alvarez, and M. Montante. 1987. Detection of *Cysticercus celulosae* antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **37**: 169-173.
- Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Science USA **76**: 4350-4354.
- Wilson, M., R. T. Bryan, J. A. Fried, D. A. Ware, P. M. Schantz, J. B. Pilcher, and V. C. W. Tsang. 1991. Clinical Evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. Journal of Infectious Diseases **164**:1007-1009.
- Yonghao, Z , L Junping, Z Minru, W Xiaohan, and L. Chen. 1995. Observation on dynamics of circulating antigen from patients with cysticercosis before and after treatment. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases **13**: 225-226.

## FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Representative results of *Taenia solium* metacestode antigen detection by EITB. Serum (A and B) or CSF (C and D) samples of patients and controls were submitted to electrophoresis under reducing (A and C) and non-reducing (B and D) conditions, transferred and developed with a rabbit anti-cysticercus hyperimmune serum. Lane 1 corresponds to parasite antigen loaded into the gel; lanes 2 and 3 to negative control samples; lanes 4 and 5 to patients with calcifications, lane 6 patient with 1 cyst, and lanes 7-11 to patients with multiple cysts. Arrows indicate the bands specifically detected in cases with neurocysticercosis. Molecular weight labels are at the left in kDa.

Figure 2. Frequency of different bands present in CSF (left panel) and serum (right panel) of EITB-positive cases according to the location of the parasites. Specific bands were only detected under reducing conditions in CSF. Different bands were present in serum under reducing (A) and non-reducing (B) conditions. Parasites were located in parenchyma (dashed bars, not found), subarachnoid space (dotted bars), ventricles (black bars) or different parts (mixed, white bars).

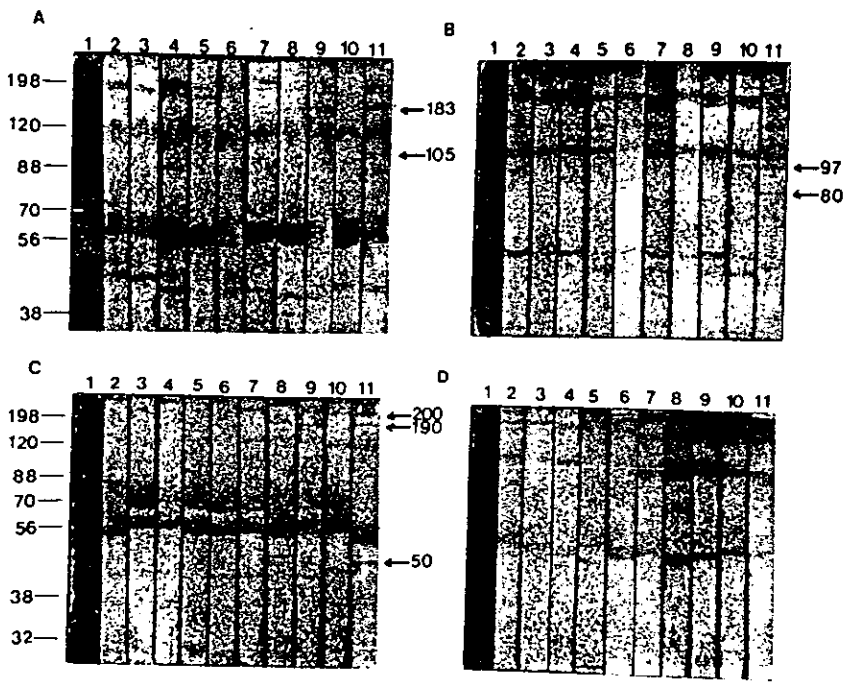
Figure 3. Antigen detection by EITB in serum samples from patients with different parasitic diseases. Samples were submitted to electrophoresis under reducing (A) and non-reducing (B) conditions, transferred and developed with a rabbit anti-cysticercus hyperimmune serum. Lane 1 corresponds to cysticercus antigen, as positive control; following lanes correspond to samples from patients with toxoplasmosis (2), neurocysticercosis (3), *larva migrans* (4-7), trichinellosis (8-10), hymenolepiosis (12), taeniosis (13-15) and one with cysticercosis (16) for comparison. The serum of a healthy human is shown in lane 11. Arrows indicate the bands specifically detected in different cases. Molecular weight labels are at the left in kDa.

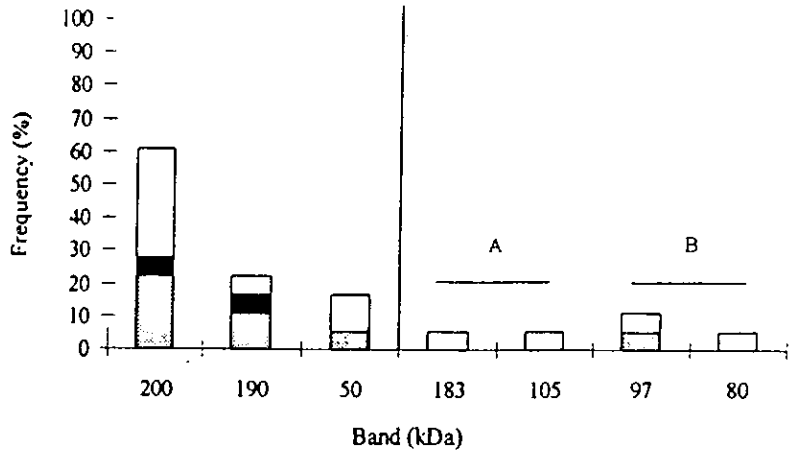


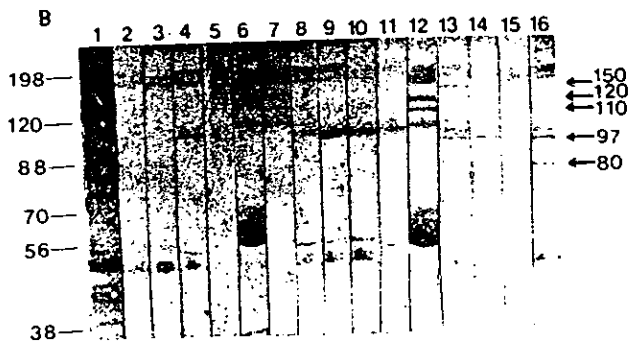
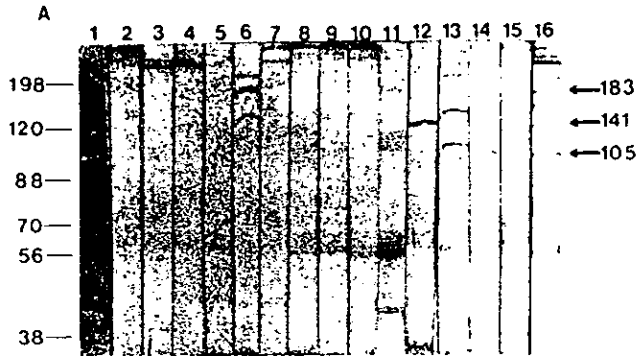
Table I Overall results of antibody and antigen detection in serum and CSF

| Number and type<br>of parasites | N  | Positive in: | Positive for |            |                            |
|---------------------------------|----|--------------|--------------|------------|----------------------------|
|                                 |    |              | Antigens     | Antibodies | Antibodies and<br>Antigens |
| Multiple cysts *                | 18 | Serum        | 2            | 8          | 2                          |
|                                 |    | CSF          | 12           | 12         | 8                          |
|                                 |    | Both samples | 2            | 7          | -                          |
| Single cyst †                   | 6  | Serum        | -            | 1          | -                          |
|                                 |    | CSF          | -            | 4          | -                          |
|                                 |    | Both samples | -            | 1          | -                          |
| Calcifications                  | 5  | Serum        | -            | -          | -                          |
|                                 |    | CSF          | -            | 2          | -                          |
|                                 |    | Both samples | -            | -          | -                          |
| None ‡                          | 10 | CSF          | -            | -          | -                          |
| None §                          | 10 | Serum        | -            | -          | -                          |

\* includes 4 cases with simultaneous cysts and calcifications; † includes one case with single cyst and calcifications; ‡ neurological negative controls; § healthy people







## CAPÍTULO 12

# INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENOS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SUERO

MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN, JEFFERSON PROAÑO NARVAEZ, JIM ALLAN, ANTONIO MEZA LUCAS, RAQUEL TAPIA ROMERO, ISABEL ALCANTARA Y OLGA MATA.

### INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis humana ha sido motivo de numerosos estudios para mejorar la eficacia del diagnóstico, por lo que, desde la primera mitad del presente siglo se empezaron a utilizar pruebas inmunológicas para apoyar el diagnóstico clínico y de imagen (revisado en <sup>1</sup>). Prácticamente se han utilizado todas las pruebas que se han estandarizado para la determinación de anticuerpos específicos en líquido cefalorraquídeo (LCR) o suero. Estos ensayos han demostrado diferente sensibilidad y especificidad dependiendo de la preparación antigénica empleada, de la capacidad intrínseca de la prueba y hasta de la experiencia de la persona que la ejecuta. En la actualidad se cuenta con los estudios de imagen Tomografía Computada (TC), y Resonancia Magnética (IRM) que permiten la localización de los parásitos, la determinación del número de éstos, el grado de reacción inflamatoria y en ocasiones el grado de lesión (ver capítulos al respecto en este volumen). Sin embargo, ambas técnicas son caras, por lo que suelen aplicarse en hospitales de segundo o tercer nivel de atención, o en pacientes que cuen-

tan con recursos económicos suficientes para sufragar estos estudios.

Además, en algunos casos los estudios de imagen no son concluyentes, por lo que se sigue solicitando el apoyo de las pruebas inmunológicas para confirmación del diagnóstico. Además de su utilidad para el diagnóstico clínico en casos con problemas neurológicos, grupo en el que la prevalencia de la enfermedad es relativamente alta (entre 10% y 25% en algunos países) <sup>2</sup>, las pruebas inmunológicas también se han usado para estudios epidemiológicos en poblaciones abiertas, grupos en los que la prevalencia de la enfermedad es baja <sup>6, 13, 14</sup>. En estos estudios se ha encontrado que la prevalencia de anticuerpos refleja el grado de presión infectiva presente en una zona dada, y que hay más individuos con anticuerpos en los grupos que están en contacto directo con la fuente de infección: el individuo con teniosis. Sin embargo, la presencia de anticuerpos en el suero de individuos elegidos al azar de la población aparentemente sana, se debe a una infección activa en sistema nervioso central en menos de la tercera parte de las veces <sup>16</sup>. La demostración de anticuerpos, si bien es un buen indicador de que el individuo ha

estado en contacto con el parásito, no es demostración de infección activa. La determinación de antígenos puede ser una alternativa de diagnóstico de casos con infección activa, debido a que se basa en la presencia de productos del parásito aún vivo. Sin embargo, son pocos los estudios con este enfoque <sup>2, 3, 17</sup>.

En el presente trabajo describimos los avances en el diagnóstico de la neurocisticercosis por medio de técnicas inmunológicas basadas en la determinación de anticuerpos.

Asimismo se describen también algunos logros obtenidos en la demostración de antígenos en población abierta para diagnóstico, así como en la identificación de las moléculas antigénicas presentes en suero y LCR de pacientes.

### INMUNODIAGNÓSTICO MEDIANTE LA BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS

Desde hace varias décadas se inició el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis humana con la técnica de Nieto y col. <sup>11</sup>, que se basa en la fijación del complemento. Esta prueba se utilizó durante mucho tiempo, porque no se desarrolló una prueba tan sensible para LCR hasta la aparición del ensayo inmunoenzimático (ELISA) <sup>7, 20</sup>, que es más sencillo de realizar, requiere menos experiencia del ejecutante y tiene una sensibilidad similar en LCR, además de que puede aplicarse también en suero. A partir de este tiempo, se empezaron a desarrollar diversas variantes de ELISA, que han utilizado antígenos crudos de la parte sólida del metacestodo o del fluido vesicular, así como antígenos parcialmente o totalmente purificados (revisado en <sup>4</sup>). Todos estos ensayos son de gran apoyo para el diagnóstico final de casos con sospecha clínica y hallazgos de imagen

compatibles con neurocisticercosis. Sin embargo, estas pruebas no han demostrado utilidad para el diagnóstico diferencial entre enfermedades parasitarias por ces-todos pues los antígenos empleados, cuando mucho permiten distinguir sólo entre estos y otros helmintos. Hace algunos años, se desarrolló la inmunoelectrotransferencia en la que se usan antígenos glicoproteicos purificados por afinidad mediante una columna de lentillectina (IET-gPs) <sup>19</sup>. En este ensayo existen 7 bandas de pesos moleculares entre 13 y 50 kDa que son reconocidas específicamente por los pacientes con cisticercosis; la banda inmunodominante es la gP42 (Figura 1). En el primer reporte esta prueba además mostró tener muy alta sensibilidad, aún en suero; posteriormente se demostró que la sensibilidad disminuye considerablemente cuando los pacientes tienen un solo parásito <sup>21</sup>; sin embargo, debido a su mayor especificidad ha sido la técnica de elección para diversos grupos en varias partes del mundo. De hecho ya ha sido empleada para estudios epidemiológicos, en población abierta, con resultados de alta sensibilidad <sup>5, 16</sup>.

Si bien el hallazgo de anticuerpos en LCR o suero de un paciente con síntomas y estudios de imagen compatibles con cisticercosis representa un apoyo sustancial al diagnóstico, la presencia de anticuerpos séricos en un individuo aparentemente sano no necesariamente indica la presencia de cisticercos vivos.

El único estudio en el que se ha evaluado esto, es el de Schantz y col. <sup>16</sup>, en el que se encontró que los anticuerpos séricos (tanto por ELISA como por IET-gPs) se relacionaron con neurocisticercosis sugerida por estudios de imagen (TC) sólo en el 30% de los casos.

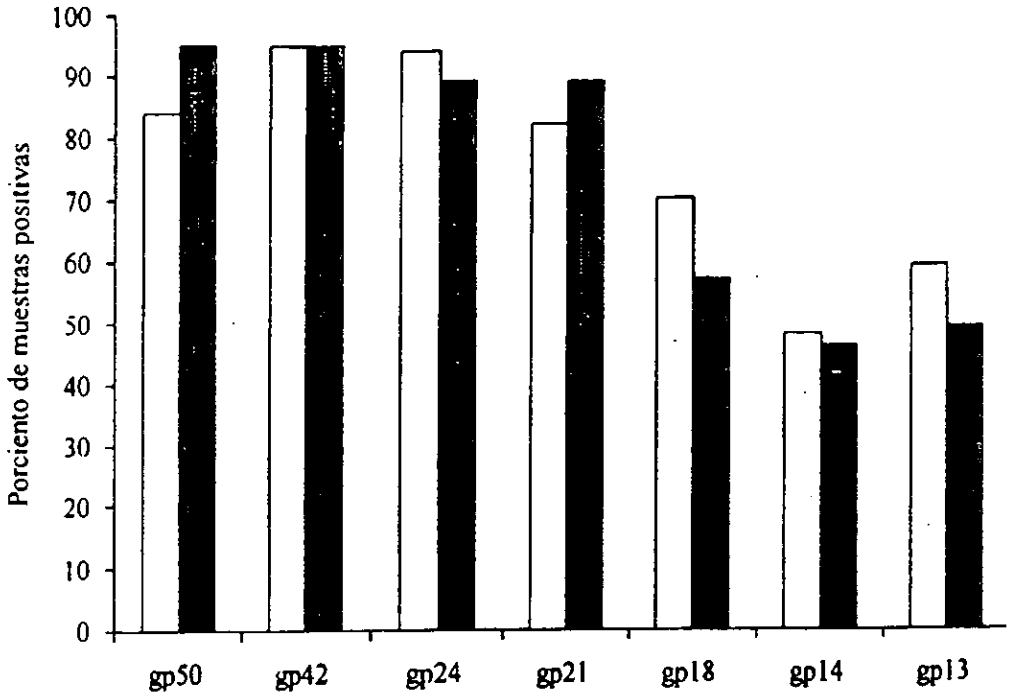


Figura 1.- Frecuencia de reconocimiento de las 7 diferentes glicoproteínas afines a lentil-lectina, por el suero (barras blancas, N=108) o el LCR (barras rayadas, N=37) de casos positivos analizados en el Depto. de Inmunoparasitología por medio de la inmunoelectrotransferencia descrita por Tsang y col<sup>19</sup>.

### BUSQUEDA DE ANTÍGENOS EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SUERO

En 1987 apareció el primer estudio para la determinación de antígenos en LCR<sup>17</sup>, en el que se encontró una sensibilidad de 75% en ELISA o Dot-ELISA, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo. Poco después nosotros utilizamos un ELISA de captura de antígenos con anticuerpos monoclonales (AcMc) producidos en cerdos para la determinación también en LCR<sup>3</sup>. Se encontró una sensibilidad del 72% con el empleo de uno de los AcMc, mientras que con el otro y los dos AcPcs la sensibilidad fue de 48,14 y 48% (Figura 2). Utilizando diferentes combinaciones de sistemas de anticuerpos se pudo aumentar la

sensibilidad hasta un 93%<sup>2</sup> (Figura 2). En estos estudios encontramos aspectos interesantes. En primer lugar, el anticuerpo específico contra una glicoproteína en la superficie y en los productos de excreción/secreción (ES) del cisticerco (AcMc HP10) fue el que presentó mayor sensibilidad, lo que apoya el uso de anticuerpos contra antígenos de ES en los ensayos para determinación de antígenos. Sin embargo, con los anticuerpos contra el AgB un antígeno inmunodominante en la enfermedad<sup>8</sup>, se obtuvo una sensibilidad de solo 14% a pesar de que es una proteína presente en los productos ES<sup>9</sup>; esto sugiere que no deben usarse anticuerpos contra antígenos para los cuales hay respuesta humoral en la muestra a estudiar, pues pueden estar

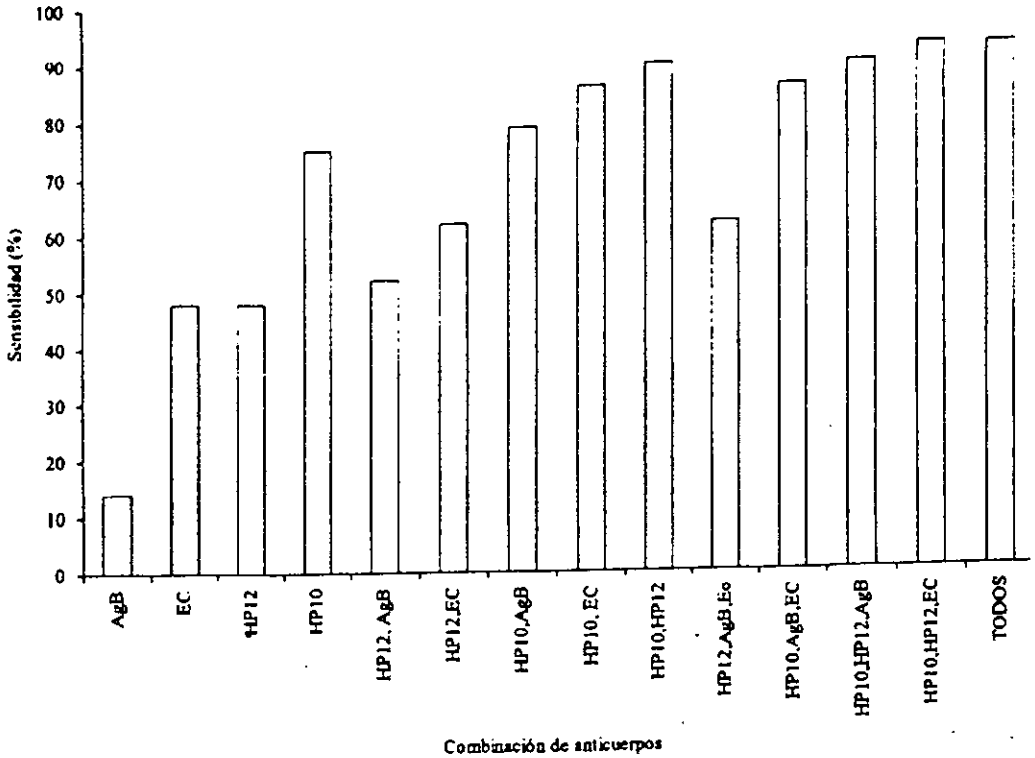


Figura 2.- Variación de la sensibilidad del ELISA de captura de antígenos en relación con el sistema de anticuerpos utilizado solo o combinado. AgB: anticuerpos policlonales anti-Antígeno B; EC: anticuerpos policlonales anti-extracto crudo; HP10: anticuerpos monoclonales contra una proteína de excreción secreción del cisticerco; HP12: anticuerpos monoclonales contra un componente del fluido vesicular del cisticerco.

formando complejos inmunes, y por ello dar falsos negativos.

Nosotros creemos que el uso de anticuerpos inducidos en la misma especie del hospedero natural conduce a una menor sensibilidad, pues hay competencia entre los anticuerpos presentes en la muestra y aquellos utilizados en el ensayo. En este sentido es importante resaltar que los anticuerpos producidos en porcinos contra el extracto crudo (EC) permitieron demostrar la presencia de antígenos en 48% de los casos de seres humanos, y en ningún suero de cerdos con cisticercosis confirma-<sup>12</sup>.

Es recomendable la producción y uso de anticuerpos monoclonales pues esto permite aumentar la reproducibilidad del ensayo y evitar el problema de obtener carne infectada con cisticercos para la preparación de nuevos lotes de anticuerpos. En la actualidad estamos produciendo anticuerpos monoclonales contra productos ES del metacestodo de *Taenia Solium*. Con el uso de uno de estos anticuerpos hemos analizado muestras de LCR y suero de casos de diferentes características, como en el número y el tipo de cisticercos. Los datos preliminares indican que este anticuerpo monoclonal puede detectar el 62% de los



TABLA 1

DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS EN PACIENTES CON NEUROCISTICERCOSIS POR ELISA CON EL USO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL.

| Número y tipo de cisticercos  | N  | Número y por ciento de positivos en LCR | Número y por ciento de positivos en Suero |
|-------------------------------|----|---|---|
| Un quiste                     | 3  | 1 33 %                                  | 2 67 %                                    |
| Un quiste y calcificaciones   | 2  | 2 100 %                                 | 2 100 %                                   |
| Varios quistes                | 16 | 10 62 %                                 | 7 44 %                                    |
| Total de cisticercosis activa | 21 | 13 62 %                                 | 11 52 %                                   |
| Varias calcificaciones        | 4  | 0 0 %                                   | 0 0 %                                     |
| Total global                  | 25 | 13 52 %                                 | 11 44 %                                   |

TABLA 2

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EN EL LCR Y SUERO DE PACIENTES CON CISTICERCOSIS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

| Número y tipo de cisticercos | N  | Positivos en: |       |             |
|------------------------------|----|---------------|-------|-------------|
|                              |    | LCR           | Suero | LCR y suero |
| Quiste único                 | 6  | 0             | 0     | 0           |
| Quistes múltiples            | 15 | 9             | 2     | 2           |
| Quistes y calcificaciones    | 4  | 2             | 1     | 1           |
| Calcificaciones              | 5  | 0             | 0     | 0           |
| Otros problemas neurológicos | 10 | 0             | 0     | 0           |

casos con cisticercosis activa (esto es con quistes) cuando se analiza el LCR y aproximadamente al 52% cuando se utiliza suero, este ensayo además es negativo cuando el individuo tiene cisticercosis inactiva (Tabla 1).

La determinación de antígenos en muestras de LCR, creemos que será útil para apoyar el diagnóstico clínico pues proporciona información respecto al estado activo de la enfermedad. Por otro lado, el análisis de antígenos en suero puede ser de gran utilidad para la búsqueda de casos de cisticercosis activa en población abierta. La sensibilidad obtenida para este tipo de muestra es de alrededor de 65% (datos no

publicados). En un estudio en una población aparentemente sana del estado de San Luis Potosí, México, recientemente encontramos que la presencia de antígenos en suero está fuertemente asociada con crisis convulsivas (Razón de Momios = 11.83; Intervalo de Confianza = 2.63-62.15;  $p < 0,01$  Exacta de Fisher<sup>20</sup>). Este dato es de importancia pues recientemente se encontró que las crisis convulsivas tienen un valor predictivo positivo superior al 70% en población abierta, cuando se consideran las imágenes de la tomografía computada como prueba de oro para la neurocisticercosis<sup>16</sup>. En nuestro estudio se les hizo tomografía computada a 3 de los 9 indivi-

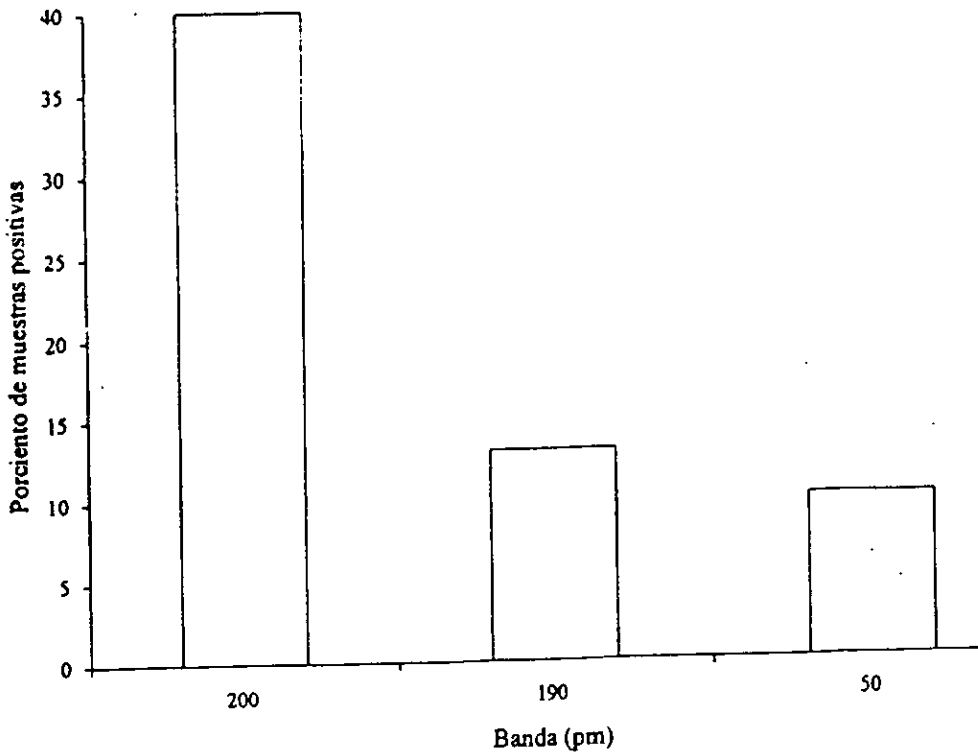


Figura 3.- Frecuencia de reconocimiento de tres bandas antigénicas encontradas en el LCR de pacientes con neurocisticercosis revelados por inmunoelectrotransferencia. El grupo fue de 30 casos, de los cuales 11 presentaron por lo menos 1 banda.

TABLA 3

ANTÍGENOS ENCONTRADOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA EN EL SUERO DE  
PACIENTES CON CISTICERCOSIS Y CON OTRAS ENFERMEDADES

| Enfermedad                 | N | Bandas en suero en condiciones |     |     |     |               |    |     |     |
|----------------------------|---|--------------------------------|-----|-----|-----|---------------|----|-----|-----|
|                            |   | Reductoras                     |     |     |     | No reductoras |    |     |     |
|                            |   | 105                            | 128 | 137 | 183 | 80            | 95 | 110 | 120 |
| Cisticercosis *(positivos) | 3 | 1                              |     |     | 3   | 1             | 1  |     |     |
| Teniasis                   | 3 | 2                              |     | 1   | 2   |               | 2  | 1   | 1   |
| Himenolepiasis             | 1 |                                | 1   |     |     |               |    | 1   | 1   |
| Hidatidosis                | 1 |                                |     |     |     |               |    |     |     |
| Toxocariasis               | 4 |                                | 1   |     |     |               |    |     |     |
| Triquinelosis              | 3 |                                |     |     |     |               |    |     |     |
| Toxoplasmosis              | 1 |                                |     |     |     |               |    |     |     |

\* El caso positivo a las cuatro bandas también tenía teniasis.

duos que presentaron antígenos en suero, y, de éstos, dos tuvieron imágenes compatibles con cisticercosis activa. Los resultados obtenidos son alentadores pues las pruebas que demuestran la presencia de antígenos pueden ser buenas herramientas para estudios de campo.

### IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EN LCR Y SUERO POR IMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Con el fin de identificar parte de los antígenos presente en las muestras de LCR y suero de seres humanos con neurocisticercosis, llevamos a cabo ensayos de inmunoelectrotransferencia (IET) en los que las muestras fueron sometidas directamente a electroforesis en geles de poliacrilamide-SDS, tanto en condiciones reductoras como no reductoras<sup>10</sup>. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa<sup>18</sup> y revelados con un antisuero policlonal producido en conejo contra el extracto crudo del metacestodo.

En LCR encontramos 3 bandas distintas reconocidas con frecuencias variables solamente en condiciones reductoras (Figura 3). La banda dominante tiene un peso molecular aproximado de 200 kDa; también encontramos dos bandas menores en cierta proporción de las muestras. Hay que resaltar que las muestras de LCR positivas provinieron exclusivamente de los casos con cisticercosis quística múltiple (Tabla 2), pues los casos con lesiones únicas o con calcificaciones fueron negativos. En el caso de suero encontramos dos bandas de 183 y 105 kDa en condiciones reductoras y 2 bandas de 97 y 80 kDa en condiciones no reductoras (Tabla 3). La banda de 183 kDa fue la más frecuente pues fue encontrada en las 3 muestras positivas. Probablemente corresponda a la banda de 190 kDa

presente en LCR. Tres de estas bandas también se encontraron en muestras de pacientes con teniosis (Tabla 3), pero estos 3 sueros y otros dos más fueron negativos en ELISA; los determinantes antigénicos revelados por una y otra técnica, por ende, son distintos. Además de las bandas encontradas en los casos con cisticercosis, las muestras de individuos con otras parasitosis reaccionaron con antígenos de varios pesos moleculares, posiblemente de reacción cruzada, pero ausentes en las muestras de los casos confirmados de cisticercosis.

La presencia de bandas antigénicas fue más frecuente en LCR que en suero, y los tres casos que presentaron antígenos en suero fueron positivos también en líquido cefalorraquídeo (Tabla 2). Esto nos indicó que la sensibilidad de este método para suero es mucho menor al 50%; como mencionamos antes, la sensibilidad por ELISA de captura es mayor al 50%, lo que nos indica que la mayor parte de los epítomos capturados en ELISA son conformacionales.

Los resultados encontrados hasta la fecha indican que se puede demostrar la presencia de antígenos tanto en LCR como en suero, lo que puede ser de ayuda para apoyar el diagnóstico clínico y para estudios epidemiológicos.

### REFERENCIAS

1. Aranda-Alvarez J G., Tapia-Romero R., Alcantara-Anguiano I., Meza-Lucas A., Mata-Ruiz O., Celis-Quintal E., Grijalva-Otero I.E., Mata-Ruiz O., Celis-Quintal G., Grijalva-Otero I.E., Correa D. Human cysticercosis: risk factors associated with circulating seric antigens in an open community of San Luis Potosi, México. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995; 89: 689-92.
2. Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Rodríguez-del Rosal E, Meza-Lucas A, Flisser A.

- Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia* 1989; 57: 93 - 99.
3. Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Parhouse RME, Plancarte A, Meza A, Flisser A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of products in cerebrospinal fluid. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; 83: 814 - 816.
  4. Correa Beltrán MD., Medina Escutia E., Morales López Z, Mandujano Martínez A., Medina Flores Y., Meza Lucas A. Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Cuaderno Técnico del INDRE N°3. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. SSA. México D.F. ISBN: 1994: 968- 811- 341- 7.
  5. Díaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Gallo C, García HH, Torres P, Montenegro T, Miranda E & «The cysticercosis working group in Peru». *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 46:610 - 615.
  6. Díaz-Camacho S, Ruiz AC, Yribe M, Willms K. Epidemiologic study and Control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural Village of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; 45: 522 - 531.
  7. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. Characterization by enzyme-linked-immunosorbent assay of the humoral response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1986; 24: 536 - 541.
  8. Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clinical & Experimental Immunology* 1980; 39: 27 - 37.
  9. Lacleste JP, Merchant MT, Willms K. Histological and ultrastructural localization of Antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* 1987; 73: 121 - 125.
  10. Laemli V. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-688.
  11. Nieto D. Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology* 1956; 6: 725 - 738.
  12. Rodríguez del Rosal E, Correa D, Flisser A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Veterinary Record* 1989;124: 488 - 490.
  13. Sarti E. La Teniasis/cisticercosis en México. Revisión Bibliográfica. *Salud Pública de México*. 1986; 28: 556 - 563.
  14. Sarti EJ, Schantz PM, Lara R, Gómez H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexico Village. *Tropical Medicine and Parasitology*. 1988; 39: 194 - 498.
  15. Sarti E, Schantz N, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez IO, López AS, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factors for taenia solium taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a Village in Morelos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 88: 49 - 52.
  16. Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A. Community-based epidemiological investigation of cysticercosis due to *Taenia solium* comparison of serological screening test and clinical findings in two populations in Mexico *Journal Clinical Infectious Diseases* 1994; 18: 11 - 17.
  17. Tellez Girón E, Ramos MC, Dufour L, Alvarez P, Montante M. Detection of Cysticercosis cellulosa antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1987; 37: 169 - 173.
  18. Towbin HT, Stachelim T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1979; 76: 4350 - 4354.
  19. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay glycoprotein for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of Infectious Diseases* 1989; 159:50 - 59.
  20. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization* 1976; 53: 55 - 56.
  21. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *The journal of Infectious Diseases* 1991; 164: 1007 - 1009.
  22. Zenteno-Alanis GH. A classification of human cysticercosis. En: *Cysticercosis Present state of knowledge and perspectives*. A. Flisser, K Willms, JP Lacleste, C Larralde, C.Ridaura & F.Beltrán (eds). Academic Press New York. 1982.

# NEUROCISTICERCOSIS

## ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, PATOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS, IMAGENOLÓGICOS Y TERAPÉUTICOS

EDITORES:

**CAMILO ARRIAGADA R.**

Jefe del Servicio de Neurología y Neurocirugía, Hospital del Trabajador, ACHS.  
Profesor de Neurología y Jefe del Laboratorio de Neuropatología, Facultad de Medicina  
Campus Sur, Universidad de Chile.  
Servicio de Neurología Hospital Barros Luco Trudeau.  
Santiago de Chile

**JORGE NOGALES-GAETE**

Jefe del Servicio de Neurología, Hospital Barros Luco Trudeau.  
Profesor Adjunto de Neurología, Facultad de Medicina Campus Sur, Universidad de Chile.  
Consultor Neurológico del Hospital de Enfermedades Infecciosas «Dr. Lucio Córdova».  
Santiago de Chile

**WERNER APT B.**

Profesor de Parasitología, Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Campus  
Sur, Universidad de Chile.  
Santiago de Chile



SANTIAGO - CHILE  
1997

Inscripción en el Registro  
de Propiedad Intelectual N° 100.212  
© Camilo Arriagada R., Jorge Nogales-Gaete,  
1997

Prohibida la reproducción total o parcial de este libro, mediante cualquier medio, electrónico o mecánico, incluyendo las fotocopias, sin el permiso de los editores.

© 1997 ARRYNOG Ediciones  
Enrique Foster Norte 203, Las Condes  
Santiago de Chile.  
E-mail: [jnogales@ctc-mundo.net](mailto:jnogales@ctc-mundo.net)

ISBN 956-272-689-4 (Edición en rústica)  
ISBN 956-272-690-8 (Edición en tapa dura)

Impreso en Chile por  
Arancibia Hnos. y Cía Ltda.  
Fono-Fax 52-2-7778200

## Human cysticercosis: risk factors associated with circulating serum antigens in an open community of San Luis Potosí, Mexico

Human cysticercosis (HC) is prevalent in the developing countries of Africa, Asia and Latin America, especially in rural areas, where ignorance of the disease and inadequate hygiene are common (Mahajan, 1982; Flisser, 1988; Sarti, 1989). The incidence of HC is also increasing in some developed countries because of immigration (Sorvillo *et al.*, 1992). Two national, sero-epidemiological surveys of HC in Mexico revealed that the overall seroprevalence was about 1% and that the populations of the states that produced pork were more likely to be seropositive than others (Woodhouse *et al.*, 1982; Larralde *et al.*, 1992). However, in one of several, smaller, community-based investigations, which have demonstrated cluster-like transmission (Sarti *et al.*, 1988, 1992; Diaz-Camacho *et al.*, 1991; Schantz *et al.*, 1994), computed tomography (CT) of the brains of seropositives indicated that the positive predictive value of serology was <30% (Schantz *et al.*, 1994). Therefore, the presence of specific antibodies is not always an indicator of an active infection and/or not all those infected have cysticerci within the brain. Although the presence of circulating antigens should be more closely associated with an active infection, there are few immuno-assays available that can detect such antigens. Those assays that have been used, to test samples of cerebrospinal fluid (CSF), use rabbit polyclonal or mouse monoclonal antibodies as the capture reagents and have achieved sensitivities of around 75% and specificities close to 100% in case-control studies (Tellez-Girón *et al.*, 1987; Correa *et al.*, 1989). Although parasite antigens might not be expected in sera from neurocysticercosis patients, when the polyclonal-based assay was tested with such sera in a case-control study it gave 60% sensitivity and 100% specificity (D. Correa, unpubl. obs.). The aim of the present study was to see if such an assay could

be used to increase the accuracy of sero-epidemiological surveys of HC.

### SUBJECTS AND METHODS

A cross-sectional study, with simple random sampling, was performed on 900 subjects, each of whom was aged >14 years and had lived for >1 year in Cerritos county in the state of San Luis Potosí, Mexico. Sample size, calculated using the Epi-INFO software produced by the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA, USA), was based on a population size of 14 000 and a minimum prevalence (1.2%) estimated from autopsy results (see Woodhouse *et al.*, 1982) and the last, national, serological survey (Larralde *et al.*, 1992). Socio-economic status, clinical history, standard of hygiene practised and food eaten were recorded for each subject after an interview. A serum sample was then collected from each subject and assayed for parasite antigens by ELISA. The capture system used was similar to that used to test CSF (Correa *et al.*, 1989) but modified for testing sera. The capture antibody was polyclonal IgG which had been produced against a crude, saline extract of cysticerci excised from pigs (Espinoza *et al.*, 1986) and purified from rabbit hyperimmune serum with Sepharose-protein A (Sigma). Each well was coated with 100  $\mu$ l of a solution of 25  $\mu$ g IgG/ml 0.1 M borate buffer, pH 8.2, overnight at 4°C, then blocked for 1 h at room temperature with 200  $\mu$ l 0.1% human serum albumin (Gerencia General de Biológicos y Reactivos, Mexico) in 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Between each step, each well was washed three times, each time with 200  $\mu$ l 0.9% NaCl containing 0.05% Tween 20 (NaCl-T). Serum samples were diluted 1:3 and 1:9 with PBS-T before being incubated in

One of the main findings of epidemiological studies on *Taenia* infection in Mexico is that cases of human taeniasis, HC and porcine cysticercosis tend to be clustered together. This indicates that cysticercosis is mainly transmitted by close-contact with the tapeworm carrier, and not as a result of egg dispersion in the environment. In the present study, possibly for the first time, there was an interesting clustering of individuals with history of taeniasis within the same house; 11.4% and 3.2% of those with a personal history of taeniasis also reported that they belonged to a household with and without a history of the disease, respectively (OR=3.70; CL=1.67-8.19;  $P<0.001$ ). Taeniasis was also related to epilepsy (OR=2.90; CL=1.02-8.11;  $P=0.045$ ) but not to seropositivity for either antigens or antibodies. Some clinical cases of taeniasis had *Taenia* antigens in their stools, as shown by ELISA (Allan *et al.*, 1990), but not in their sera (D. Correa, unpubl. obs.).

In a small-scale trial, 13 of the present subjects were given CT scans to check the predictive value of the antigen assay results. Seven of the subjects were positive for antibodies, one of these and two others were positive for antigens and four were seronegative in both assays. Three of the seven cases positive for antibodies and two of the three cases positive for antigens had brain lesions compatible with cysticercosis (one being the subject positive for antigens and for antibodies). All the others had apparently normal scan results. If the antigen assay is accurate then the antigen-positive, brain-cyst-negative subjects must either have brain cysts that are too small to be detected by CT or extracerebral cysts, located in the muscles, subcutaneous tissue or spinal cord.

Although the sensitivity of the antigen assay needs to be improved, the present results show that assays of this type may be useful tools in field studies on human cysticercosis.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors wish to thank Drs A. Flisser, J. Allan and E. Rodríguez-del-Rosal for critical reviews of the manuscript, and the Gerencia General de Biológicos y Reactivos, SSA, for providing

human serum albumin. This work was partially supported by the Pan-American Health Organization, grant AMR92-12427-4.

J. G. ARANDA-ALVAREZ\*  
 Subjefatura de Epidemiología,  
 Jefatura de Servicios de Salud Pública,  
 Subdirección General Médica,  
 Instituto Mexicano del Seguro Social,  
 Av. Cuauhtémoc 451, 10° piso,  
 Col. Piedad Narvarte, México 03000, D.F.,  
 México

R. TAPIA-ROMERO  
 I. ALCANTARA-ANGUANO  
 A. MEZA-LUCAS  
 O. MATA-RUIZ  
 Departamento de Inmunoparasitología,  
 Instituto Nacional de Diagnóstico y  
 Referencia Epidemiológicos SSA,  
 Prol. Carpio 470, 2° piso, Col. Sto. Tomás,  
 México 11340, D.F., México

G. CELIS-QUINTAL  
 Subjefatura de Epidemiología,  
 Jefatura de Servicios de Salud Pública,  
 Subdirección General Médica,  
 Instituto Mexicano del Seguro Social,  
 Av. Cuauhtémoc 451, 10° piso,  
 Col. Piedad Narvarte, México 03000, D.F.,  
 México

I. E. GRIJALVA-OTERO  
 Centro de Investigación del Proyecto  
 CAMINA A.C.,  
 Calz. Tlalpan 4430, Col. Toriello Guerra,  
 México 14050, D.F., México

D. CORREA†  
 Departamento de Inmunoparasitología,  
 Instituto Nacional de Diagnóstico y  
 Referencia Epidemiológicos SSA,  
 Prol. Carpio 470, 2° piso, Col. Sto. Tomás,  
 México 11340, D.F., México

Received 21 February 1995, Revised 18 July 1995, Accepted 19 July 1995

\*Present address: Servicios de Medicina Preventiva, Unidad de Medicina Familiar, Av. Legaria 354, Col. Pensil, México 11320, D.F., México.

†Author to whom correspondence should be addressed.



- GROSSMAN, R. (1983) *Zentralblatt für Bakteriologie* 30, 846  
 OSWEILER, C. D. & TRAMPEL, D. W. (1983) *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, A36  
 PATTERSON, D. S. P. & ROBERTS, B. A. (1981) *Veterinary Record* 107, 249  
 SAMARAJEEWA, U., ARSECALLERATINE, S. N. & TENNETOON, C. E. (1975) *Research in Veterinary Science* 19, 200  
 WALKING, A. E. (1981) *Journal of the Association Office for Analytical Chemistry* 63, 103

## Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum

E. Rodríguez-del-Rosal, D. Correa, A. Flisser

*Veterinary Record* (1989) 124, 488

CYSTICERCOSIS is a parasitic disease produced by the larvae of *Taenia solium*. Pig carcasses are condemned and destroyed when cysticerci are found during sanitary inspection, causing important economic losses in several developing countries (Schenone 1973; Acevedo-Hernandez 1982). Diagnosis of swine cysticercosis is only done by meat inspection in abattoirs (Aluja 1982), as no ante mortem diagnostic methods are available. Some immunological techniques for antibody detection have been reported (Pathak and others 1984; Pathak and Gaur 1986) but have the disadvantage that a positive test does not necessarily indicate a current infection, due either to contact of the animal with *T. solium* or to cross reactions with other parasites (Espinoza and Flisser 1986). In this paper the authors report the detection of parasite products in the serum of *T. solium* infected pigs, by a double homologous monoclonal antibody (McAb) based enzyme immunoassay (EIA).

Blood was obtained from 30 healthy pigs reared on a modern farm in Mexico and from 33 cysticercotic pigs before and after treatment with praziquantel (Merck, Darmstadt) 50 mg/kg/day during 15 days (Flisser and others 1989). Cysticercosis was confirmed because all pigs had palpable cysticerci in the tongue. Each serum was separated by centrifugation and kept at -20°C until use.

*T. solium* cysticerci were dissected from condemned pork meat and a crude extract was prepared according to the method described by Flisser and others (1980). *Trichinella spiralis* crude extract consisted of larvae extracted by tissue peptinisation from experimentally infected mice and processed in a similar way.

Two IgM murine McAbs prepared against *T. solium* larval stages were used, one reactive with a 160 to 220 kDa surface and secretion protein (HP10) of *T. saginata* (Harrison and Parkhouse 1986), and another one reactive with a vesicular fluid component of *T. solium* (HP12, L. J. S. Harrison and R. M. E. Parkhouse, unpublished data). As a negative control, McAb NIM-M1, an IgM specific for a *T. spiralis* infective larvae surface antigen complex (Ortega-Pierres and others 1984), was used. McAbs were precipitated from ascitic fluid with 33 per cent saturated ammonium sulphate, adjusted to 1 mg/ml protein, and an aliquot of each McAb was coupled in bovine Immunon plates (Dynatech) were coated with 100 µl/well of McAb (100 µg/ml) in 0.1 borate buffered 0.07 M saline, pH 8.2 by overnight incubation at 4°C. After a washing five times with 200 µl/well of 0.15 M sodium chloride - 0.05 per cent Tween 20. Blocking was achieved by incubation with 100 µl/well of 1 per cent human albumin (Gerentia General de Biológicos y Reactivos, S.S.A. México) for one hour at room temperature. After further washing, serum samples diluted 1:3 or crude extracts at different concentrations were incubated (100 µl/well) for two hours at 37°C and washings were repeated. 100 µl/well of the homologous biotinylated McAb was added at a concentration of 2 µg/ml and incubated at 37°C for two hours. The reaction was developed by 30 minutes

incubation with 100 µl/well of o-phenylenediamine (Sigma) at a concentration of 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer containing 0.4 µl/ml of 30 per cent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This was done at room temperature in darkness. The reaction was stopped by adding 50 µl/well 1M sulphuric acid, and the absorbance values were obtained at 492 nm in an EIA reader (Bio-rad).

Both taenia specific McAbs reacted with a crude extract of *T. solium* cysticerci, with high absorbance values (>2.0 for HP-10 and 0.6 for HP-12) indicating that the double homologous McAb based EIA was adequate; also no cross reaction was found when using the NIM-M1 McAb, although it reacted with the trichinella extract (>2.0). The assays done with the serum samples from healthy pigs provided the cut off points, which were considered as the mean value plus three times the standard deviation; this gave 0.12 for HP-10, 0.08 for HP-12 and 0.12 for NIM-M1.

In the EIA with the serum samples from cysticercotic pigs, the HP10 McAb gave positive results in 26 (79 per cent) of the pigs before treatment and 30 (91 per cent) after treatment. This McAb reacted with the serum of one healthy pig with an absorbance value above the cut off point, this showed a specificity of 97 per cent. Neither the HP12 nor the NIM-M1 McAbs gave positive results with any group.

Cross reactions were observed between *Taenia* species by using the McAb directed against a surface and secretion glycoprotein of *T. saginata* and a crude extract of *T. solium* cysticerci. This indicates that both species share this component or at least antigenically similar molecules; this is not surprising as both parasites belong to the same phylogenetic branch. In contrast, no cross reaction was found with the NIM-M1 McAb. This is of great importance for diagnosis, as both porcine cysticercosis and trichinellosis are endemic in Mexico. It has been reported that one of the earliest events occurring to cysticerci after treatment with praziquantel is damage to the tegument of the bladder wall (Thomas and others 1981). This is in agreement with the increase in the number of pigs with detectable circulating surface HP-10 glycoprotein after treatment.

The EIA performed with McAb HP12 was negative both before and after treatment probably because the activity of this McAb was low, as in the test with the crude extract HP-10 and NIM-M1 gave values above 2.0 while HP-12 had an absorbance value of 0.6. One pig from the healthy group gave values above the cut off point for McAb HP-10. Although this can be a true false positive, it is possible this animal could be a non-diagnosed cysticercotic pig due to the high incidence of porcine cysticercosis in Mexico (Aluja 1982).

The results obtained in this study indicate that ante mortem diagnosis of current cysticercosis in pigs is possible and potentially useful to prevent high economic losses due to condemnation of infected carcasses. As many as 80 per cent of cysticercotic pigs may be diagnosed, and probably treated with drugs, before being sent to abattoirs.

**Acknowledgements.**—Dr R. M. E. Parkhouse (National Institute of Medical Research, London) and Dr L. J. S. Harrison (Centre for Tropical Veterinary Medicine, Scotland) kindly donated all monoclonal antibodies used and biologist P. Alcántara (Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales, México DF) the *T. spiralis* crude extract. This study was partially supported by grant number 021718 from CONACYT, México.

### References

- ACEVEDO-HERNANDEZ, A. (1982) Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Eds A. Flisser, K. Williams, J. P. Lactetic, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán. New York: Academic Press, pp. 3  
 ALUJA, A. (1982) Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Eds A. Flisser, K. Williams, J. P. Lactetic, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán. New York: Academic Press, pp. 5  
 ESPINOZA, B. & FLISSER, A. (1986) *Archivos de Investigaciones Médicas* 17, 299  
 FLISSER, A., GONZALEZ, D., RODRIGUEZ-CARRAJAL, J., SHAUR-OVICH, M., CORREA, D., COHEN, S., COLLADO, M., MADRAZO, J., RODRIGUEZ DEL ROSAL, E., FERNANDEZ, B., FERNANDEZ, F. U. & ALUJA, A. S. (1989) *Parasitology Research* (in press)  
 FLISSER, A., WOODHOUSE, E. & LARRALDE, C. (1984) *Clinical and Experimental Immunology* 29, 27  
 HARRISON, L. J. S. & PARKHOUSE, R. M. E. (1986) *Parasite Immunology* 8, 319  
 ORTEGA-PIERRES, G., CHAYEN, A., CLARK, N. W. T. & PARKHOUSE, R. M. E. (1984) *Parasitology* 88, 109  
 PATHAK, K. M. L., GALR, S. N. S. & GARG, S. K. (1984) *Journal of Helminthology* 58, 321  
 PATHAK, K. M. L. & GALR, S. N. S. (1986) *Indian Journal of Animal Sciences* 16, 1029  
 SCHENONE, H. (1973) *Boletín Chileno de Parasitología* 20, 110  
 THOMAS, H., ANDREWS, P. & MELLORS, H. (1981) *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31, 933

E. Rodríguez-del-Rosal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, S.A.M., México, DF  
 A. Flisser, Instituto de Investigaciones Biológicas, Apartado Postal 70228 UNAM, 04510 México DF  
 D. Correa, Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales, SSA Caspo 427, 11340, México DF  
 E. Rodríguez-del-Rosal's present address is Scheramer SA de CV, Avenue 16 de Septiembre 301, Xochimilco, 16090 México DF

## Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid

Dolores Correa<sup>1,2</sup>, Miguel A. Sandoval<sup>3</sup>, Leslie J. S. Harrison<sup>4</sup>, R. Michael E. Parkhouse<sup>5</sup>, Agustín Plancarte<sup>1</sup>, Antonio Meza-Lucas<sup>2</sup> and Ana Flisser<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70228, Mexico 04510, D.F., Mexico; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, Carpio 470, Mexico 11340, D.F., Mexico; <sup>3</sup>Departamento de Neurocirugía, Hospital de Especialidades, Centro Médico La Raza, Vallejo, Mexico 07000, D.F., Mexico; <sup>4</sup>Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Roslin, Midlothian, EH25 9RG, Scotland, UK; and <sup>5</sup>Division of Immunology, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, NW7 1AA, England, UK

### Abstract

Current diagnosis of neurocysticercosis relies mostly on computerized tomography and nuclear magnetic resonance, with detection of antibodies being confirmatory rather than decisive. An assay which detects parasite products in cerebrospinal fluid would conclusively demonstrate a current infection and could be important when decisions regarding treatment must be made. Cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis was used in 4 enzyme immunoassay capture tests designed to detect parasite products. Of the systems tested, one, based on the use of a monoclonal antibody reactive with a surface and secretion component of the metacestode, was particularly promising, giving a sensitivity of 72%. The assay has the double advantage of a very low background and a proved specificity for the products of living cysticerci. The other 3 systems (monoclonal anti-vesicular fluid antibody, polyclonal antibody against a saline extract and polyclonal anti-antigen B antibody) were less sensitive. Results with the anti-antigen B system support the proposal that products of low immunogenicity are the most appropriate targets for the serological detection of the parasite.

### Introduction

Several immunological techniques have been used in the diagnosis of human neurocysticercosis. The accumulated experience in the detection of specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid (CSF) of infected patients reflects a range of variable sensitivities and specificities (FLISSER & LARRALDE, 1986).

The presence of specific antibody indicates exposure to the parasite but not necessarily a current infection. This is of particular importance in human neurocysticercosis, where decisions about the nature of treatment must be made with certainty.

The purpose of the present investigation was to evaluate monoclonal and polyclonal antibody-based enzyme immunoassay (EIA) systems for the detection of products of *Taenia solium* cysticerci in CSF of patients with neurocysticercosis. In the former case

we have advantage of an antigen capture assay, based on a monoclonal antibody, recently developed for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis but cross reactive with *T. solium* (HARRISON *et al.*, 1989). If patients harbouring living cysticerci can be identified, suitable chemotherapeutic treatment can be instigated (FLISSER, 1988).

### Materials and Methods

#### Cerebrospinal fluid

Samples of cerebrospinal fluid (CSF) were obtained by lumbar or ventricular puncture or during surgery from 32 adult patients with neurocysticercosis who were attending hospitals in Mexico. Their age and sex were recorded, and they were categorized into moderate (out-patients) or severe cases (patients who had been in-patients several times). Neurocysticercosis was diagnosed during surgery in 5 cases, by computerized tomography (CT) in 25 cases, and by the presence of anti-cysticercus antibodies only in 2 cases. The number, cross-sectional area and location of cysticerci was recorded after CT scanning. Anti-cysticercus antibodies were searched for in CSF of the patients as described by PLANCARTE *et al.* (1987). CSF samples were also obtained from 24 Mexican and 80 British adults suffering from a range of neurological disorders other than cysticercosis.

#### *Taenia solium* extracts

*T. solium* cysticerci were obtained by dissection from naturally infected pigs which had been condemned because of cysticercosis during routine meat inspection. A saline extract (SE) and antigen B (AgB) were prepared according to previously described methods (ESPINOZA *et al.*, 1986; GUERRA *et al.*, 1982).

#### Monoclonal and polyclonal antibodies

The monoclonal antibodies (Mabs) were all immunoglobulin (Ig) M, derived from mouse hybridoma cell lines. The first Mab (HP10) was reactive with a 160-220 kDa surface and secretion glycoprotein of *T. saginata* cysticerci. The second Mab (HP12) was reactive with *T. solium* vesicular fluid components (HARRISON *et al.*, 1989). A third Mab (NIM-M1), directed against *Trichinella spiralis* infective larvae surface antigen complex, was used as negative control (ORTEGA-PIERRES *et al.*, 1984). Mabs were precipi-

Correspondence should be addressed to Dolores Correa, Departamento de Bioquímica, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, Carpio 470, Mexico 11340, D.F., Mexico.

tated from ascitic fluid with 50% saturated ammonium sulphate.

Pigs were immunized with either SE or AgB and IgG was purified by affinity chromatography in protein A-Sepharose. One aliquot of Mab and polyclonal IgG was coupled to biotin.

#### Detection of parasite products

The EIA used was a double homologous antibody capture assay. Immulon® plates (Dynatech) were treated with 100  $\mu$ l/well of antibody diluted in 0.07 M saline buffered with 0.1 M borate, pH 8.2, and incubated at 4°C overnight. Mabs were used at 100  $\mu$ g/ml, anti-AgB at 50  $\mu$ g/ml, and anti-SE at 25  $\mu$ g/ml. The plates were routinely washed 3 times with 0.15 M saline containing 0.02% Tween 20 (washing solution) at 200  $\mu$ l/well; 1% human serum albumin (Gerencia General de Biologicos y Reactivos, Mexico) in washing solution was added and left for 60 min at 37°C before washing again. CSF samples diluted 1:2 and SE or AgB at different concentrations were added and incubated for 2 h at 37°C, followed, after washing, by the homologous biotinylated Mab (2  $\mu$ g/ml) or homologous biotinylated polyclonal IgG (4  $\mu$ g/ml) in washing solution. After further incubation and washing, streptavidin-peroxidase conjugate (Amersham) diluted 1:2000 was added and incubated for 30 min. The plates were washed again and substrate, o-phenylenediamine (Sigma) at 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer containing 0.4  $\mu$ l/ml of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. The colour reaction was allowed to proceed for 30 min at room temperature in the dark before being terminated by adding 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance values were measured at 492 nm in an EIA reader (Bio-Rad). Samples were run in duplicate. After subtracting the plate background value, absorbance values were calculated as the average of the duplicate samples tested. Samples were considered positive if their absorbance was greater than the mean plus 3 standard deviations of the values obtained for the 24 Mexican control patients.

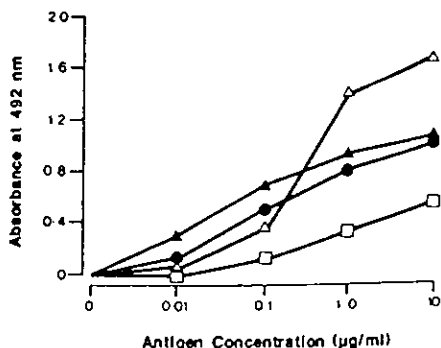


Fig. 1. Dose-response curves for the parasite products detection assay using a crude cysticercal extract and monoclonal antibody HP10 directed against a surface and secretion glycoprotein of *Taenia saginata* ( $\Delta$ ), monoclonal antibody HP12 directed against vesicular fluid components of *T. solium* cysticerci ( $\square$ ), and polyclonal antibodies against the crude extract ( $\bullet$ ) or against purified antigen B ( $\blacktriangle$ ).

#### Results and Discussion

All the capture assays were tested using SE as a source of antigen except for the polyclonal anti-AgB detection which used AgB. The various systems yielded reasonable dose-response curves (Fig. 1).

The results obtained in the detection of parasite products in the CSF of the 32 cases of neurocysticercosis are presented in Fig. 2. The assay using Mab HP10 gave 71.8%, positive results, and that using HP12 gave 40.6% positive results. The polyclonal anti-SE antibody gave 43.7% positives and the polyclonal anti-AgB gave 12.5%. Thus, only the Mab HP10 system offers promise as a diagnostic tool. The 80 British control CSF samples were negative in the assays to which they were subjected (HP10 and HP12

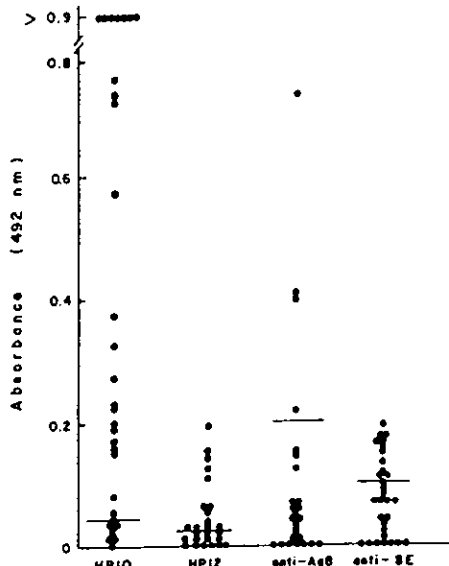


Fig. 2. Double antibody enzyme immunoassay technique with cerebrospinal fluid from cases with neurocysticercosis (see Materials and Methods section), using monoclonal antibodies HP10 and HP12, and polyclonal antibodies anti-AgB and anti-SE. Horizontal lines indicate the cut-off values (the mean of the Mexican negative control samples plus 3 standard deviations; these cut-off values were used to define the sensitivity values quoted in the text).

systems), i.e., they gave values below the cut-off values shown in Fig. 2. The anti-*T. spiralis* Mab system similarly gave negative results with all CSF samples. These results indicate good specificity of these double homologous antibody sandwich assays.

The HP10 assay has the double advantage of a very low background and proved specificity for the products of living cysticerci (HARRISON *et al.*, 1989). A recently described antigen detection system gave a similar sensitivity to our HP10 system (i.e. 75%, TELLEZ-GIRON *et al.*, 1987). Nevertheless, assays based on polyclonal antibodies are inevitably less reproducible than monoclonal antibody systems.

There was no correlation between the clinical status and the detection of parasite products in CSF.

Similarly, there was no apparent correlation between the location, number or area of cysts and the concentration of parasite products in CSF (data not shown). These results indicate that variability within the disease is great. Similar results were obtained when specific antibodies were compared with clinical features of the disease (ESPINOZA *et al.*, 1986). Of particular interest were 2 cases with calcified cysticerci, which were negative in the HP10 test. This is precisely what would be expected if a serological assay detects viable parasites, and might be important when decisions regarding treatment must be made, since cestocidal drugs have no effect on calcified parasites (EARNEST *et al.*, 1986; FLISSER, 1988).

The importance of focusing on poorly immunogenic parasite products as targets for the assays described above is illustrated by the relatively poor performance of the polyclonal anti-AgB system. Antibodies against AgB are the most frequently detected in the serum and CSF of patients with neurocysticercosis (ESPINOZA *et al.*, 1986; FLISSER *et al.*, 1980); thus the presence of antibodies to AgB probably interfered with the parasite products detection assay.

Anti-cysticercus antibodies were detected in 90% of the patients' CSF samples, and parasite products in 72% of the same samples. The former test therefore had greater sensitivity, but the latter had the advantage that it confirmed the presence of living parasites. Thus, both assays are useful tools for clinical support of diagnosis and should be applied to the same CSF, since neither has 100% sensitivity.

Finally, it should be pointed out that the most sensitive antibody used was the Mab raised against *T. saginata*, indicating that the antigenic epitope it recognizes is common to both species of *Taenia*. Cross-reactivity between these 2 species and other taeniids has been well documented (ESPINOZA *et al.*, 1986; OLIVO *et al.*, 1988; PARKHOUSE & HARRISON, 1987).

#### References

Earnest, M. P., Reller, L. B., Filley, C. M. & Grek, A. J. (1986). Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. *Reviews of Infectious Diseases*, 9, 961-979.

Espinoza, B., Ruiz-Paracios, G., Tovar, A., Sandoval, M.

A., Plancarte, A. & Flisser, A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 24, 536-541.

Flisser, A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today*, 4, 131-137.

Flisser, A. & Larralde, C. (1986). Cysticercosis. In: *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases*. Vol. 1: *Helminthic Diseases*, Wells, K. W. & Schantz, P. M. (editors). Orlando, Florida: Academic Press, pp. 109-161.

Flisser, A., Woodhouse, E. & Larralde, C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clinical and Experimental Immunology*, 39, 27-37.

Guerra, G., Flisser, A., Canedo, L. & Lactette, J. P. (1982). Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In: *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives*, Flisser, A., Willms, K., Lactette, J. P., Larralde, C., Ridaaura, C. & Beltran, F. (editors). New York: Academic Press, pp. 437-452.

Harrison, L. J. S., Joshua, G. W. P., Wright, S. H. & Parkhouse, R. M. E. (1989). Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunology*, 11, 351-370.

Olivo, A., Plancarte, A. & Flisser, A. (1988). Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, 18, 543-545.

Ortega-Pierres, G., Chayen, A., Clark, N. W. T. & Parkhouse, R. M. E. (1984). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 88, 359-369.

Parkhouse, R. M. E. & Harrison, L. J. S. (1987). Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens on *Taenia* sp. metacestodes. *Parasite Immunology*, 9, 263-268.

Plancarte, A., Espinoza, B. & Flisser, A. (1987). Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nervous System*, 3, 203-205.

Teliez-Giron, E., Ramos, M., Dufour, L., Alvarez, P. & Montante, M. (1987). Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and standard ELISA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37, 169-173.

Received 19 January 1989; revised 19 April 1989; accepted for publication 19 April 1989

#### CORPORATE MEMBERSHIP WITH THE COMMONWEALTH TRUST 18 NORTHUMBERLAND AVENUE, LONDON, WC2 5BJ

The Society has Corporate Membership with the Trust, which has premises close to Trafalgar Square. Overseas Fellows only can use the facilities of the Trust, when in London, for a period of 21 days in any three months, provided that all booking is done through the Secretary at Manson House. Fellows who wish to use these facilities must give the Secretary adequate notice of their requirements particularly during the summer when at least two months' notice will be required. Details of the facilities available will be sent to Fellows on request.

## IMMUNODIAGNOSIS OF HUMAN AND PORCINE CYSTICERCOSIS. DETECTION OF ANTIBODIES AND PARASITE PRODUCTS

M.D. Correa<sup>1,2</sup>, A. Plancarte<sup>1</sup>, M.A. Sandoval<sup>1,2</sup>, E. Rodriguez-del-Rosal<sup>1,4</sup>,  
A. Meza-Lucas<sup>1,2</sup> and A. Flisser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.*

<sup>2</sup>*Departamento de Bioquímica, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, México.*

<sup>3</sup>*Departamento de Neurocirugía, Centro Médico La Raza, IMSS, México.*

<sup>4</sup>*Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SARH, México.*

### Abstract

In this paper we report the immunodiagnosis of cysticercosis by the detection of antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients, by standard enzyme immunoassay (EIA) which gave 90% sensitivity. We are also showing the results obtained with a double homologous polyclonal or monoclonal antibody based EIA that detects parasite products: we analysed CSF of patients and obtained sensitivities ranging from 14% to 75% for single antibody systems and 90% when analysing the samples with two or three systems simultaneously. The sera of infected pigs were also evaluated; with one monoclonal antibody we could detect 79% of positive samples. The good results obtained encourage the standardisation and improvement of the technique for diagnostic as well as for epidemiologic purposes.

### Introduction

Since the standardisation of the complement fixation test in 1956 (1) there have appeared many reports on the immunodiagnosis of human neurocysticercosis, by means of different techniques which detect specific antibodies in the serum or the cerebrospinal fluid (CSF) of patients.<sup>1-6</sup> As expected, variable sensitivities and specificities are obtained by using different methods.

In contrast to techniques looking for antibodies, only few reports have appeared on the search for *Taenia solium* antigen(s) in the CSF of cysticercotic patients. In one of them, rabbit polyclonal antibodies against a crude extract of the parasite were employed, in a single antibody based enzyme immunoassay (EIA) which gave a sensitivity of around 75%.<sup>7</sup>

Correspondence to: Dolores Correa, Departamento de Bioquímica, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, Carpio, 476 Col. Sta. Tomás, México 11340 D.F.

On the other hand, diagnosis of swine cysticercosis is only done by meat inspection in slaughterhouses,<sup>8</sup> and no antemortem diagnostic methods are available.

In this paper we report and discuss the immunodiagnosis of cysticercosis by the detection of antibodies in the CSF of patients, by standard EIA, and of parasite products in the CSF of patients and the sera of infected pigs, by a double homologous antibody based EIA.

### Materials and Methods

#### Samples

Fresh CSF samples from 31 cases with cystic neurocysticercosis were analysed. The criterium to define cysticercotic cases was the excision of the parasite(s) by surgery or the presence of cystic images in computerised tomography (CT) scans plus clinical diagnosis of the disease. Twenty four non-cysticercotic cases requiring CSF sampling were used as controls.

Blood was also obtained from 30 healthy pigs reared in modern farms in Mexico and from 33 cysticercotic pigs chosen because they showed palpable cysticerci in the tongue. Each serum was separated as usually and kept at -20°C until use.

#### Antigens

A crude extract of *Taenia solium* cysticerci (CE) was prepared according to Espinoza *et al.*,<sup>9</sup> antigen B (AgB) was purified following the method reported by Guerra *et al.*,<sup>9</sup> *Trichinella spiralis* crude extract was kindly donated by P. Alcantara (from the Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, México) and consisted of the supernatant of an ultra-centrifugated PBS homogenate of the infective larvae.

#### Antibodies

The polyclonal antibodies (PcAbs) against CE or AgB consisted of the gamma fraction of hyperimmune pig serum, purified by protein A-Sepharose (Sigma) affinity chromatography. Two IgM murine monoclonal antibodies (McAbs) prepared against larval stages were also used: one is reactive with a 160-220 kDa surface and secretion protein of *Taenia saginata* larvae (HP10), and the other with a vesicular fluid component of *T. solium* (HP12). As a negative control McAb NIM-M1 was used, which is IgM specific for a *Trichinella spiralis* infective larvae surface antigen complex. McAbs were precipitated from ascitis fluid with 33% saturated ammonium sulphate. An aliquot of each antibody was coupled to biotin.

#### EIA for antibodies

The method reported by Espinoza *et al.*<sup>9</sup> was used. IgG antibodies in the CSF of patients were searched for.

*EIA for antigens*

Immulon plates (Dynatech) were coated with 100  $\mu$ l/well of McAbs (100  $\mu$ g/ml) or PcAbs (50  $\mu$ g/ml), in 0.1 borate buffered 0.07 M saline, pH 8.2 by overnight incubation at 4°C. After washing five times with 200  $\mu$ l/well of 0.15 M NaCl - 0.05% tween 20, blocking was achieved by incubation with 100  $\mu$ l/well of 1% human albumin (Gerencia General de Biológicos y Reactivos, SSA, México) for 1 hour at room temperatures; after further washing, CSF diluted 1:2 or serum samples diluted 1:3 were incubated (100  $\mu$ l/well) for 2 hours at 37°C and washes were repeated; one hundred  $\mu$ l/well of the homologous biotinilated antibody was added at a concentration of 2  $\mu$ g/ml and incubated at 37°C for two hours; after washing the reaction was developed by 30 min incubation with 100  $\mu$ l/well of o-phenyldiamine (Sigma), at a concentration of 0.4 mg/ml in 0.1 M citrate buffer containing 0.4  $\mu$ l/ml of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; this was done at room temperature in darkness. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l/well in 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance values were obtained at 492 nm in an EIA reader (Bio-rad).

**Results**

Table 1 shows the positivity obtained in the human and porcine groups studied. Positive samples were those whose absorbance values were above the mean plus three times the standard deviation of the control group. In humans, specific antibodies were detected in 89% of the cases; this sensitivity is in accordance with previously reported data.<sup>6</sup> Parasite products were found in different percent of the samples depending on the monoclonal or polyclonal antibody employed, ranging from 14% with the use of anti-B antibodies, to 75% when the HP10 monoclonal was employed. Neither antibody gave positive results when the samples of the control group were tested. Moreover, the NIM-M1 McAb, which is specific for *T. spiralis*, did not react with samples of either group.

With the serum samples obtained from pigs we found that only the HP10 McAb gave positive results, giving 79% sensitivity. In contrast to human cases, we found that one of the healthy animals was positive, giving 97% specificity, with the HP10 McAb and both PcAbs.

All monoclonal and polyclonal anti-cysticercus antibodies reacted with *T. solium* CE (see footnote in Table 1); also, the anti-AgB antibodies reacted strongly with its purified homologous antigen. On the other hand the NIM-M1 McAb did not cross react with cysticercus CE, although it is highly reactive with its homologous *T. spiralis* extract.

By using different combinations of antibodies, the sensitivity of the antigen detecting EIA in human CSF reached 93% (Table 2); furthermore, with the use of only the two *Taenia* specific McAbs a 90% sensitivity was achieved.

Table 1. Sensitivity of the immunoassays for antibody and for antigen (%)

| Sample           | n  | Group         | EIA<br>for<br>antibodies | EIA for<br>antigens<br>McAbs |      |      |       |       |
|------------------|----|---------------|--------------------------|------------------------------|------|------|-------|-------|
|                  |    |               |                          | PcAbs                        | a-B  | a-Ec | 11P10 | 11P12 |
| Human<br>CSF     | 31 | Cysticercotic | 89.0                     | 14.0                         | 48.0 | 75.0 | 48.0  | 0.0   |
|                  | 24 | Control       | 0.0                      | 0.0                          | 0.0  | 0.0  | 0.0   | 0.0   |
| Porcine<br>serum | 33 | Cysticercotic | -                        | 0.0                          | 0.0  | 79.0 | 0.0   | 0.0   |
|                  | 30 | Control       | -                        | 3.0                          | 3.0  | 3.0  | 0.0   | 0.0   |

\* Absorbance values with antigens at 1 µg/ml were: a-B / Pure AgB, 1.2; a-Ec / *T. solium* Ec, 0.6; 11P10 / *T. solium* Ec, 7-2.0; 11P12 / *T. solium* Ec, 0.7; NIM-M1 / *T. spiralis* Ec, 7-2.0; NIM-M1 / *T. solium* Ec, 0.2.



### Discussion

Almost 90% of the neurocysticercotic patients analysed in this study presented anti-cysticercus antibodies in the CSF; this is in accordance to previous reports.<sup>6</sup> It has been established that the detection of antibodies is a useful tool for the confirmation of diagnosis in cases with clinical symptoms or tomographic findings suggestive of cysticercosis.<sup>14</sup> Furthermore, the search of antibodies of several classes and in both CSF and serum of the same individual, may augment the sensitivity of near 100% (10).

Nevertheless, it is desirable to have a technique which demonstrated the presence of the parasite in cases in which there are not antibodies and the clinical diagnosis or the tomography scans can not be done. On the other hand, this kind of techniques would facilitate the development of epidemiologic studies. Few attempts have been done in order to standardise an antigen detecting test; the group of San Luis Potosi in Mexico<sup>7</sup> reported a sensitivity of around 75% with the use of polyclonal antibodies raised in rabbits by hyperimmunization. Here we report the EIA for antigen detection by using both polyclonal and monoclonal antibodies, and the results obtained are promising: although the different antibodies employed gave variable sensitivities, ranging from 14 to 75% (Table 1), we could achieve 93% positivity by the use of some combinations of them (Table 2); moreover, by using just the two *Taenia* specific monoclonals, we could detect 90% of the cases.

Table 2. EIA for antigens in human CSF Sensitivity with the use of two or more antibody systems per sample.

| Antibody systems employed | Percent positive samples |
|---------------------------|--------------------------|
| <b>Two:</b>               |                          |
| HP12, a-B                 | 52                       |
| HP12, a-FC                | 62                       |
| HP10, a-B                 | 74                       |
| HP10, a-FC                | 80                       |
| HP10, HP12                | 90                       |
| <b>Three:</b>             |                          |
| HP12, a-B, a-EC           | 62                       |
| HP10, a-B, a-EC           | 86                       |
| HP10, HP12, a-B           | 90                       |
| HP10, HP12, a-EC          | 93                       |
| <b>Four:</b>              |                          |
| HP10, HP12, a-B, a-FC     | 95                       |

The sensitivity obtained using antibodies against antigen B was the lowest; antigen B is a secretion product of the parasite,<sup>11</sup> so we expected to find a higher sensitivity with the use of anti-AgB antibodies. But on the other hand, AgB is one of the most immunogenic molecules in the crude extract: 85% of the individuals with antibodies have antibodies against it<sup>3,6</sup> thus, probably it is forming immune complexes in antibody excess, so no determinants were free for the reaction in the EIA.

The results obtained in this study also indicate that antemortem diagnosis of current cysticercosis in pigs is possible and potentially useful to prevent high economic losses due to condemnation of infected carcasses;<sup>12</sup> as much as 80% of the cysticercotic pigs may be diagnosed (Table 1). One pig from the healthy group gave values above the cut off point for McAb HP10 and both PcAbs; although this can be a false positive, we think that this animal could be a non-diagnosed cysticercotic pig, due to the high incidence of porcine cysticercosis in Mexico.<sup>5</sup>

Cross reactions were observed between *Taenia* species by using the *T. saginata* cysticerci-specific McAb HP10 (Table 1); this indicates that both species share this component or, at least antigenically similar molecules; this is not surprising since both parasites belong to the same phylogenetic group. In contrast no cross-reaction was found with the NIM-M1 McAb; this is of great importance for diagnosis, since both cysticercosis and trichinellosis are present in Mexico.

In order to use EIA for the detection of parasite products in the serum of humans or pigs for diagnostic or epidemiologic purposes, further analyses of cross-reactions with other parasites, in special cestodes, are important to be done. Also, the production of other McAbs as well as the evaluation of the technique in serum samples of humans are needed.

#### Acknowledgements

We are thankful to P. Alcantara from the Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, SSA, Mexico, for providing the *Trichinella spiralis* antigen; and to Drs. D. Harrison from the University of Edinburg, Scotland and M. Parkhouse from the National Institute for Medical Research, England for providing the monoclonal antibodies.

#### References

1. Nieto, D. Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology* 1956; 6: 725-38.
2. Radzewski, A.K., Chisholm, E.S. and Kagan, I.G. Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody and ager precipitin test. *J. Parasit.* 1975; 61: 154-5.
3. Eisner, A., Woodhouse, E. and Larralde, C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 39: 27-37.

4. Miller, B., Goldberg, M.A., Heiner, D.G., Myers, A. and Goldberg, A. A new immunologic test for CNS cysticercosis. *Neurology* 1984; 34: 695-7.
5. Mohammad, I.N., Heiner, D.C., Miller, B.L., Goldberg, M.A. and Kagan, I.G. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 775-9.
6. Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M.A., Plancarte, A. and Flisser, A. Characterization by Enzyme-linked Immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24: 536-41.
7. Teller-Girón, L., Ramos, M.C., Dufour, L., Alvarez, P. and Montané, M. Detection of *cysticercus cellulosa* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 37: 169-73.
8. Aluja, S.A. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: 'Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives' (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán, eds). New York: Academic Press 1982: 53-62.
9. Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L. and Laclette, J.P. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *taenia solium*. In: 'Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives' (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán, eds). New York: Academic Press 1982: 437-52.
10. Plancarte, A., Espinoza, B. and Flisser, A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nerv. Syst.* 1987; 3: 203-5.
11. Laclette, J.P., Merchant, M.T. and Willms, K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasit.* 1987; 73: 121-9.
12. Acevedo-Hernandez, A. Economic impact of porcine cysticercosis. In: 'Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives' (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán, eds). New York: Academic Press 1982: 63-7.