

01672
10
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DETERMINACION DE ANTIGENOS DEL METACESTODO DE *Taenia solium* EN CERDOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tesis presentada para la obtención
del grado de
Maestro en Ciencias Veterinarias
ante la División de Estudios de Posgrado
de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Por

EDUARDO RODRIGUEZ DEL ROSAL

Asesores: MVZ., M. en C. Héctor Quiroz Romero
Lic. IBB, M. IBB María Dolores Correa Beltrán
MVZ., M. Sc. Ramón Bautista Garfias



México, D. F., 15 de Junio de 1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi esposa por todo el apoyo que me dió durante el desarrollo y culminación de este trabajo.

A mi hijo Eduardo con amor.

A mis padres por todo el apoyo que siempre me brindaron

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Flisser por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Ana Flisser por su apoyo

Al personal del Departamento de Hemoprotozoarios del INIFAP

A María Teresa Negrete Correa por la ayuda secretarial prestada

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Justificación	7
Hipótesis	7
Objetivos	8
MATERIAL Y METODOS	9
Sueros	9
Antígenos	9
Anticuerpos	10
ELISA	11
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	14
DISCUSION	16
CONCLUSIONES	19
LITERATURA CITADA	20
FIGURAS	29
CUADROS	35

RESUMEN

Rodríguez del Rosal Eduardo. Determinación de antígenos del metacéstodo de *Taenia solium* en cerdos (Bajo la dirección de: Héctor Quiroz Romero, María Dolores Correa Beltrán y Ramón Bautista Garfias).

La implementación de medidas de control que impidan la transmisión de la cisticercosis y la teniasis por *Taenia solium* requiere, entre otras cosas, del diagnóstico antemorten preciso de la cisticercosis porcina. Se han realizado algunas investigaciones sobre métodos inmunológicos que permiten la determinación de anticuerpos anti-cisticerco en el suero de cerdos infectados. Sin embargo, la presencia de anticuerpos circulantes significa solamente que los animales han tenido contacto con este u otro parásito antigénicamente similar, y no necesariamente que están infectados.

Por lo anterior, el primer objetivo de la presente tesis fue estandarizar un método para determinar antígenos circulantes en el suero de cerdos infestados naturalmente; el método empleado fue el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de doble anticuerpo, utilizando 4 sistemas de anticuerpos diferentes (dos monoclonales y dos policlonales) todos ellos reactivos con el metacéstodo de *T. solium*. El segundo objetivo de la tesis fue valorar los cambios en la determinación de antígenos, por el mismo método, cuando los porcinos son tratados con praziquantel.

Los resultados obtenidos mostraron que: A) el ELISA para la detección de antígenos circulantes del cisticerco de *T. solium* puede dar una sensibilidad de alrededor del 80% para el diagnóstico antemorten de cerdos infestados naturalmente. B) no todos los sistemas de anticuerpos específicos son útiles para detectar antígenos en suero. Debe evitarse el uso de anticuerpos específicos contra antígenos inmunodominantes en la infección natural, así como contra antígenos que no sean de excreción/secreción. Asimismo se sugiere el empleo de anticuerpos preparados en una especie distinta a aquella donde ocurre la infección natural. C) debido al tratamiento de los cerdos con praziquantel, hubo un incremento en el número de cerdos que fueron positivos con uno de los sistemas de anticuerpos empleados. Esto indica que durante el tratamiento hay una liberación mayor de antígenos por el parásito.

INTRODUCCION

Taenia solium es un platelminto del orden Cyclophyllidae, de la familia Taenidae, cuyo único huésped definitivo natural es el ser humano. La *T. solium*, para su estudio se divide en tres porciones, el escólex o cabeza, que mide un milímetro aproximadamente, provisto de cuatro ventosas y una doble corona de ganchos; el cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos; y el conjunto de proglótidos, que unidos entre sí, forman una cadena denominada estróbilo. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados seguidos por proglótidos que contienen órganos sexuales y los más distales contienen un gran número de huevos (50,000 c/u) por lo que se les denomina grávidos; estos últimos se desprenden espontáneamente del gusano adulto (4 a 5 por día) y son evacuados con las heces del huésped (4). En el medio ambiente, la descomposición de los proglótidos grávidos permite la liberación de los huevos, los cuales pueden infectar tanto al hombre como al cerdo por la ingesta directa de las heces y de alimentos o aguas contaminadas o la presencia cercana del portador de la tenia (36). Se han propuesto otros mecanismos de transmisión como la autoinfestación interna por reflujo de proglótidos grávidos al estómago (62) y la transmisión de huevos por vectores insectos en comunidades donde se practica el fecalismo al aire libre (25, 26, 41). En el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas digestivas activan a la oncosfera o embrión hexacanto contenido en el huevo, penetrando posteriormente a la pared intestinal hasta alcanzar capilares para llegar a los diversos órganos y tejidos. El embrión requiere de 10 semanas para convertirse en metacéstodo, larva o cisticerco (33, 56), que está formado por una bolsa llena de fluido dentro de la cual se encuentra el escólex invaginado. El ciclo de vida se completa cuando el ser humano ingiere carne cruda o poco cocida de cerdos cisticercosos:

nuevamente debido a las condiciones gástricas e intestinales, (bilis, jugos gastrointestinales) el cisticercos se activa, evaginando, y se fija a la pared intestinal para posteriormente desarrollarse en parásito adulto (7).

La cisticercosis humana es un problema de salud pública en Latioamérica y Asia (41, 55), debido a su prevalencia y a la severidad de las lesiones que puede causar. Crea además, un serio problema económico por conceptos de hospitalización, tratamiento, incapacidad en el trabajo, etc. (60). En México, la frecuencia de la neurocisticercosis ha sido determinada en estudios de autopsias en diversas instituciones hospitalarias, donde se informa de frecuencias que oscilan entre un 1.2% y un 3.6%; muchos casos pueden ser asintomáticos (2, 23, 42, 49, 50). Además, es la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central, originando el 27.3% de las lesiones cerebrales (42, 49, 51).

La transmisión de esta enfermedad puede ser prevenida por medio de la identificación y tratamiento del huésped definitivo de la *Taenia solium*. Sin embargo, la teniasis humana presenta dificultades para su detección, ya que generalmente presenta un curso asintomático; los huevos son encontrados ocasionalmente en exámenes coproparasitológicos y solamente en algunos casos se pueden encontrar segmentos de la tenia en las heces, y que generalmente no se hace un examen detallado para detectarlos.

La cisticercosis porcina es frecuente en nuestro medio: con datos obtenidos de 34 rastros del país durante 1980 y 1981, se encontró una frecuencia del 1.5%, con variaciones que iban desde 0.005% hasta 10% (3). Otro estudio realizado por medio del análisis de la lengua de cerdos en pie, proporcionó valores que oscilaban entre 6.4% y 30.8% (61). La cisticercosis porcina produce grandes pérdidas económicas al país; en 1982 se calculó que las pérdidas por decomiso de carne de cerdo con cisticercosis fue del orden

de los mil millones de pesos (1). La consecuencia más grave de esta parasitosis es que el consumo de carne de cerdo contaminada con metacéstados perpetúa el ciclo vital de *Taenia solium*, y los individuos portadores de la tenia, además de producir nuevos casos de cisticercosis porcina, causan la cisticercosis humana.

Puesto que el ser humano es el único huésped definitivo natural de *T. solium*, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo. Este es un padecimiento frecuente en México y otros países en donde existe miseria, ignorancia y condiciones higiénico - sanitarias deficientes (2, 9, 41, 55).

Uno de los aspectos que más se han estudiado en la cisticercosis es el inmuno diagnóstico (21), lo que se debe principalmente a que la cisticercosis cerebral humana se manifiesta con tal diversidad de síntomas, o no se manifiestan, que hacen difícil el diagnóstico clínico. Se han estandarizado varios métodos inmunológicos para el diagnóstico de la cisticercosis humana, como la fijación de complemento (43,44), la inmunolectroforesis (IEF); (18,20), la hemoaglutinación (35) y el ensayo inmunoenzimático (14,18,35) (ELISA); estas pruebas han sido de gran utilidad, ya que el resultado serológico positivo aunado a la sintomatología y actualmente a la tomografía axial computarizada (39,52) pueden proporcionar un diagnóstico definitivo.

Ahora bien, en cuanto a cisticercosis porcina, se han realizado solamente algunas investigaciones sobre métodos inmunológicos que permitan el diagnóstico. Una de éstas, la IEF, se usó para determinar la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en el suero de cerdos que iban a ser sacrificados en rastro, encontrando frecuencias que iban

desde un 30.4% hasta un 38.6% (31,53). Se compararon los resultados obtenidos entre la inspección sanitaria y la prueba serológica y se vio que la primera determinó un 0.4% de cerdos cisticercosos mientras que la IEF un 25.6%; esta diferencia pudo ser debida a varias causas: en primer lugar, los animales pueden presentar otros parásitos que induzcan anticuerpos de reacción cruzada (17,45); además, las pruebas serológicas pueden detectar infecciones leves o recientes (27), las cuales pueden no ser determinadas por la inspección sanitaria en los rastros, ya que en éstos, la inspección se lleva a cabo principalmente con un corte en los músculos del brazuelo (triceps y anco neo), y los cisticercos podrían estar alojados en otros músculos y órganos. Por último, la presencia de anticuerpos circulantes significa solamente que los animales han tenido contacto con este u otro parásito antigénicamente similar, y no necesariamente que estén infectados. Por ello es importante contar con un método que permita determinar antígenos circulantes.

Los investigadores interesados en diversas parasitosis por protozoarios y metazoarios de importancia veterinaria y de salud pública, han empezado a desarrollar diferentes técnicas para la búsqueda de antígenos (5, 6, 11, 12, 13, 28, 30, 32 a, 40, 46, 47, 54, 57, 58), debido a la importancia que pueden tener para el inmunodiagnóstico y potencialmente, para el apoyo de estudios epidemiológicos y de tratamiento con nuevas drogas antiparasitarias. La sensibilidad varía entre un 30% y un 80% dependiendo de la prueba empleada, siendo las de precipitación en gel menos sensibles que las enzimáticas o las radiactivas.

La presencia de antígenos circulantes en infecciones por larvas de céstodos ha recibido poca atención (11). Se han demostrado antígenos circulantes en ratones

infectados experimentalmente con larvas de *Mesocestoides corti*, así como en casos humanos de hidatidosis por *Echinococcus granulosus* (57, 12). Para la cisticercosis humana se ha descrito una técnica de aglutinación en latex y dos ensayos inmunoenzimáticos que determina antígenos parasitarios en el LCR, encontrándose una sensibilidad del 77% al 90% (8, 10, 59).

JUSTIFICACION

La determinación de antígenos circulantes más que la de anticuerpos podría ser de gran utilidad para el diagnóstico de la cisticercosis porcina ya que la positividad en esta prueba sería una indicación directa de la parasitosis. Además, es posible que el antígeno circulante esté presente en los grupos “falsos negativos” (animales cisticercosos que no presentan anticuerpos o que no son detectados durante la inspección sanitaria). Por otro lado, la determinación de antígenos puede ser muy útil para monitorear el tratamiento de tratar a los animales infestados antes del sacrificio cuando sea posible, así como para realizar estudios epidemiológicos tendientes a conocer la relación huésped-parásito con el propósito de tratarla, prevenirla o erradicarla.

HIPOTESIS

- 1.- Los cerdos con metacéstodos de *T. solium* presentan antígenos circulantes que se pueden detectar mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA).
- 2.- El porcentaje de cerdos infestados con el metacésto de *T. solium* positivos al ELISA, será mayor después de que sean tratados con praziquantel*

* Cysticid (Merck Darmstad, México)

OBJETIVOS

- 1.- Estandarizar el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de antígenos circulantes en el suero de cerdos infestados con el metacéstodo de *T. solium*.
- 2.- Determinar el porcentaje de positividad del ensayo inmunoenzimático en un grupo de cerdos infestados con el metacéstodo de *T. solium*, antes después de administrarles tratamiento cestocida a base de praziquantel.*

* Cysticid (Merck Darmstad, Mexico).

MATERIAL Y METODOS

Sueros:

Se utilizaron muestras de suero de 33 cerdos con cisticercosis adquirida naturalmente, los cuales fueron tratados con praziquantel (19 a, b). Dichas muestras fueron obtenidas antes y después del tratamiento, y se mantuvieron a -20°C hasta la realización de las pruebas. También se usaron 30 muestras de suero de cerdos no cisticercosos provenientes de una explotación altamente tecnificada, los cuales no presentaron anticuerpos en suero ni parásitos en los músculos de la lengua.

Antígenos:

Extracto crudo. Se preparó extracto crudo del metacéstodo de *T. solium* de acuerdo a la técnica previamente establecida (18): se obtiene carne fresca de cerdo infestada con metacéstodos, éstos se extraen del músculo, descartando el líquido vesicular y se congelan inmediatamente. Posteriormente los escólices y paredes son lavados a 4°C durante 18 horas en solución salina (0.15 M NaCl) amortiguada con fosfatos 0.015 M, pH 7.4 (PBS) que contiene antibióticos (40 mg/l de kanamicina, ácido nalidíxico y ampicilina) e inhibidores de proteasas (0.006% de fenil-metil-sufonil-fluoruro y 0.04% de p-hidroximercuribenzoato, Sigma). Para obtener el extracto, los cisticercos se homogenizan en una solución de KCl 3 M y se incuban a 4°C en agitación ligera durante 18 horas. El homogeneizado se dializa 5 veces contra 10 volúmenes de PBS con cambios cada 12 horas, a 4°C y se centrifuga a 10,000 rpm en una centrífuga Beckman J-21 refrigerada durante 60 minutos; al sobrenadante se le determina la concentración de proteínas (37), y se conserva en viales a -20°C (18).

Antígeno B (AgB). Esta proteína se purificó de acuerdo a la técnica descrita por Lacleite y cols. (32b), empleando un soporte de colágena, ya que este antígeno tiene afinidad hacia esta proteína (48): se pesan 6 gramos de cisticercos extraídos de músculo, se homogenizan en 30 ml de PBS y se centrifugan a 35,000 rpm durante 15 minutos. Se recupera el sobrenadante y se incuba con colágena sólida de tendón de bovino durante 90 minutos con agitación a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante, se lava la colágena por centrifugación 3 veces con PBS y se incuba con 30 ml de PBS (NaCl 0.5 M) durante 15 min con agitación a temperatura ambiente, este PBS se recupera ya que aquí ya existe AgB; la colágena se pone nuevamente a incubar con 20 ml de ácido acético 0.1 M durante 15 min con agitación. Los sobrenadantes se juntan y se concentran por medio de ultrafiltración con membranas de poro que permite el paso de moléculas de peso molecular menor a 10,000. El material concentrado se dializa contra PBS durante toda la noche, se determina la concentración de proteína (37) y se conserva en alícuotas a -20°C.

Anticuerpos.

En el cuadro 1 se enlistan los anticuerpos que se usaron para el estudio; dos de estos son monoclonales (Moac) y dos policlonales (Poac). De los monoclonales uno está dirigido contra un antígeno de superficie de la larva de *T. saginata* (HP10) que también se encuentra presente en metacéstodos de *T. solium* (29), el otro monoclonal está dirigido contra un componente de fluido vesicular del metacéstodo de *T. solium* (HP12). La IgM de los anticuerpos monoclonales se obtuvo del líquido de ascitis de ratones por precipitación con sulfato de amonio al 50% y diálisis posterior contra PBS. Los anticuerpos policlonales son la fracción de inmunoglobulina purificada por

cromatografía de afinidad en una columna de proteína-A sefarosa (Sigma), a partir de suero de cerdos hiperinmunizados con antígeno B puro (Poac B) o extracto crudo (Poac E). Una fracción de cada anticuerpo se acopló a biotina como sigue: las gamaglobulinas se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml y se dializaron contra una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 8.0, durante toda la noche a 4°C. A continuación se mezcló 1 ml de esta solución con 0.2 ml de una solución de 1 mg/ml del derivado N-hiroxisuccinimido-éster de biotina* disuelto en dimetil sulfoxido** y se incubaron a temperatura ambiente, en obscuridad, durante 4 horas, con agitaciones ocasionales. Después se dializó exhaustivamente contra PBS y se fraccionó en alícuotas que se congelaron a -20°C.

ELISA.

Las condiciones óptimas para el ensayo en cuanto a la concentración del primer anticuerpo, la dilución de los sueros y la concentración del segundo anticuerpo, se determinaron por medio de experimentos de dosis respuesta utilizando diferentes concentraciones de antígeno. En el caso de los anticuerpos anti-AgB, se utilizó el antígeno puro y en el caso de los otros anticuerpos se utilizó extracto crudo.

* NHS - biotina (Sigma)

** DMSO (Merck)

La técnica empleada fue la de doble anticuerpo, que a continuación se detalla:

- a) Las placas de ELISA (Inmulón I Dynatech), se incuban toda la noche a 4°C con 100 µl/pozo de los anticuerpos monoclonales o policlonales no marcados, diluidos en solución amortiguadora de boratos 0.15 M, pH 8.5.
- b) Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada una con tween 20 al 0.05% en NaCl 0.15 M. (NaCl-tween).
- c) Se bloquean los sitios que quedan libres con 100 µl/pozo de albúmina humana * al 1.0% en NaCl-tween durante 1 hora a temperatura ambiente.
- d) Se repiten los lavados como en el inciso b
- e) Se colocan las muestras de suero a estudiar, diluidas en PBS-tween, 100 µl/pozo, y se incuban durante 2 horas a 37°C.
- f) Se repiten los lavados como en el inciso b
- g) Se colocan 100 µl/pozo del primer conjugado que consiste en el anticuerpo monoclonal o policlonal homólogo al de recubrimiento (inciso a) acoplado a biotina, y diluido en PBS-tween; se incuban a 37°C durante 2 horas.
- h) Se repiten los lavados como en el inciso b.
- i) Se incuban los pozos durante 2 horas a 37°C con 100 µl/pozo del segundo conjugado que consiste en estreptoavidina acoplada a peroxidasa (Amersham), diluida 1:2000 en PBS-tween.
- j) Se repiten los lavados como en el inciso b.
- k) Se incuban los pozos durante diez minutos a temperatura ambiente con 100 µl/pozo del sustrato, el cual consiste en 0.4 mg/ml de O-fenilendiamina (Sigma) disuelta en solución amortiguadora de citratos 0.1 M, que contiene 0.4 µl/ml de H₂O₂ al 30% (Sigma).
- l) Se para la reacción con 50 µl/pozo de ácido sulfúrico 1.0 M y se leen las placas con un lector de ELISA a 492 nm.

* HSA (Gerencia General de Biológicos y Reactivos, Ssa)

Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias encontradas entre el grupo testigo y el grupo de animales parasitados, o las encontradas entre los animales parasitados antes y después del tratamiento con praziquantel eran significativas, se utilizó la prueba de "t" de student (38).

RESULTADOS

Durante la estandarización del ELISA se probaron, para cada sistema de anticuerpos, diferentes concentraciones de los anticuerpos de recubrimiento (anticuerpos mono y policlonales no marcados), que iban desde 10 hasta 100 ug/ml, y diferentes diluciones de los anticuerpos acoplados a biotina desde 1:250 hasta 1:2000; para ello se hicieron curvas utilizando concentraciones de antígeno que variaron entre 0 y 100 ug/ml. De estas pruebas se escogieron las condiciones óptimas para cada anticuerpo: para los dos anticuerpos monoclonales se encontró que el anticuerpo de recubrimiento debía estar a 100 ug/ml y el acoplado a biotina diluido 1:2000; en el caso de los policlonales se usaron a 25 ug/ml para la primera etapa de la técnica y diluidos 1:500 como conjugado.

Otro factor que influye en los resultados de la optimización de la prueba es la dilución de la muestra problema. Por ello, se llevaron a cabo experimentos en los que se probaron diferentes concentraciones de antígeno disuelto en suero de cerdo sano diluido desde 1:3 hasta 1:27. La mejor dilución de trabajo fue 1:9.

En las figuras 1 y 2 se pueden observar curvas dosis respuesta para cada sistema de anticuerpos en sus condiciones óptimas; la figura 1 muestra la curva correspondiente al sistema Moac HP10 con su antígeno homólogo. Como puede apreciarse, el sistema de Moac HP10 dió una reacción de valores altos, resultando tener una sensibilidad de 10 ng/ml. En la figura 2 se puede observar que las curvas obtenidas con el monoclonal HP12 contra antígeno de fluido vesicular de *T. solium* o los sistemas policlonales fueron considerablemente menores (nótese que el eje de las ordenadas está en una escala menor).

Habiendo determinado las condiciones óptimas de trabajo para cada sistema de anticuerpos, se procesaron las muestras de todos los cerdos. En las figuras 3 a la 6 se muestran los valores de absorbancia individuales obtenidos para cada animal de los grupos normales y cisticercosos antes y después del tratamiento con praziquantel. Como puede observarse, sólo se encontraron diferencias visibles entre los grupos cuando se utilizó el sistema de monoclonales HP10 (Figura 3).

En el cuadro 2 se muestran los resultados de porcentaje de positividad con todos los sistemas de anticuerpos para cada uno de los grupos analizados, tomando como punto de corte la media más tres veces la desviación estándar de los valores de absorbancia del grupo testigo (38). Con el sistema de anticuerpos HP10 se obtuvo una sensibilidad cercana al 80% y este valor se incrementó a 90% cuando los cerdos fueron tratados con praziquantel. Ninguno de los otros sistemas de anticuerpos fue capaz de demostrar la presencia de antígeno en el suero de los cerdos cisticercosos ni antes ni después del tratamiento. Sólo hubo un falso positivo cuando se utilizaron los sistemas de anticuerpos policlonales.

DISCUSION

Uno de los muchos problemas del control de la teniasis/cisticercosis por *Taenia solium* es la falta de un diagnóstico antemortem de la cisticercosis porcina.

A pesar de que se utilizaron 4 sistemas diferentes de anticuerpos, se observó, desde que se comenzó la estandarización de la prueba, que el sistema monoclonal HP10 (dirigido contra un componente superficial y de secreción de la larva (29), fue el que mejor reacción dió. El hecho de que el Moac HP10 haya sido el único que detectara este antígeno en el suero de los cerdos, puede ser debido a que además de ser de superficie/secreción probablemente este antígeno no está induciendo la respuesta de anticuerpos durante la infección natural de tal manera que el epítipo que reconoce el anticuerpo monoclonal está libre en el suero de los cerdos.

El leve aumento en la detección de este antígeno en los sueros de cerdo después del tratamiento con praziquantel, pudo deberse a una destrucción o daño de los parásitos causado por la droga en algunos de los animales tratados, de tal manera que hubo una liberación momentánea mayor. En favor de esta hipótesis existen los datos recientes en cuanto a la determinación de anticuerpos anti-cisticerco en suero de cerdos por ELISA, para estudiar el efecto del tratamiento con praziquantel: se observó que los niveles de anticuerpos son máximos al final del período de 15 días de tratamiento con la droga, y después van disminuyendo hasta llegar a niveles bajos a los 60 días postratamiento (19b). En ese trabajo se sugiere que hay una liberación súbita de antígenos como consecuencia del tratamiento y que es esto lo que induce la producción de mayores títulos de anticuerpos (19b). Más aun, García (24) encontró que la

incubación de cisticercos durante tiempos cortos con praziquantel *in vitro*, induce un aumento notorio en la cantidad de proteína liberada al medio de cultivo.

Ninguno de los otros sistemas de anticuerpos detectó antígenos circulantes en los cerdos; esto no pudo deberse a que no reaccionaran con su antígeno homólogo, pues aunque con baja sensibilidad, los tres dieron reacción positiva con el extracto crudo, o antígeno B, según el caso (Figura 2). La explicación para la falta de reacción en los sueros puede ser diferente para cada uno de ellos; el monoclonal HP12 fue seleccionado porque reconoce una estructura presente en el fluido vesicular del metacéstodo de *T. solium*; esto podría ser muy importante pues probablemente esta molécula no está siendo excretada o secretada por el parásito ni siquiera después del tratamiento con praziquantel. Otra explicación, aplicable también a los otros dos sistemas es que este antígeno sea una molécula que esté induciendo anticuerpos y forme complejos inmunes; para el caso del antígeno B se cuenta con evidencia en favor de esta hipótesis, pues este antígeno es un componente inmunodominante, esto es, que induce respuesta inmune en la mayoría de los animales inmunizados o infectados, experimentalmente, así como en los seres humanos infectados naturalmente (22). Probablemente este antígeno sí se encuentre en la sangre, pues recientemente se demostró que es un componente de secreción (34), pero con seguridad está formando complejos inmunes solubles ó, incluso, depositados en los tejidos, ya que tiene afinidad por la colágena (48).

Para ambos sistemas de policlonales existe una explicación adicional para su absoluta negatividad: los anticuerpos utilizados son de cerdos inmunizados con el extracto crudo o el antígeno B; dado que estos antígenos se están buscando en el suero de cerdos infectados, probablemente hay competencia entre los anticuerpos naturales y los del

siero en cuestión por epítomos idénticos, dado que ambos son de la misma especie. En favor de esto se informó recientemente que estos mismos anticuerpos de cerdo anti B y anti Extrato crudo dieron sensibilidades del 17% y 48% respectivamente cuando se utiliza LCR de seres humanos (10); esto indica que cuando se usa un sistema heterólogo probablemente estos anticuepos detectan epítomos que dejan libres los que reconocen los anticuerpos de la especie a diagnosticar. De hecho Tellez Giron y cols. (59) observaron en el LCR de humanos que se puede detectar hasta un 75% de casos si se utiliza un anticuerpo policlonal contra extracto crudo de *solium* preparado en conejo.

Para la determinación de antígenos en sueros de cerdos sería recomendable el uso del monoclonal HP10; sin embargo, la disponibilidad de este anticuerpo esta limitada ya que como se mencionó anteriormente, fue una donación; por ello, se sugiere producir anticuerpos monoclonales que detecten productos de secreción poco inmunogénicos en el huésped natural, o bien utilizar anticuerpos policlonales pero preparados en especies heterólogas como conejo, cabra o cuye.

CONCLUSIONES

- 1) La aplicación del ELISA para la detección de antígenos circulantes del metacéstodo de *T. solium* da una sensibilidad de 80% para el diagnóstico antemortem de cerdos infectados naturalmente.
- 2) No todos los sistemas de anticuerpos específicos son útiles para detectar antígenos en suero. Debe evitarse el uso de anticuerpos específicos contra antígenos inmunodominantes en la infección natural, así como contra antígenos que no sean de excreción/secreción. Asimismo se sugiere el empleo de anticuerpos preparados en una especie distinta a aquella donde ocurre la infección natural.
- 3) Después del tratamiento, los cerdos infestados con el metacéstodo de *T. solium* sufrieron un incremento en positividad de un 80% a un 90%; algunos animales que habían resultado negativos a la prueba antes del tratamiento, se convirtieron en positivos con el sistema de anticuerpos HP10. Esto sugiere que durante el tratamiento hay una liberación mayor de antígenos por parásito, aunque debido a las características del método utilizado, no se pueden determinar cambios cuantitativos o cualitativos finos.

LITERATURA CITADA

1. Acevedo-Henández, A. Economic impact of porcine cysticercosis: En "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán, eds.) Academic Press, New York. pp. 63-67 (1982).
2. Albores, S. J. y Altamirano, D.M. Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizada en el Hospital General de México, Centro Médico Nacional. Gac. Med. Mex. 102, 193-203. (1971).
3. Aluja, S.A. Frequency of porcine cysticercosis in México: En "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltran, eds.) Academic Press, New York. pp. 53-62 (1982)
4. Asada, J., Otagaki, H., Kaji, F., Aokage, K. y Ochi, G. On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. Iji. Shinshi. 73: 153-156 (1956).
5. Au, A.C.S., Denham, D.A., Steward, M.W., Draper, C.C., Ismail, M.M., Lao, C. K. y Mak, J. W. Detection of circulating antigens and immune complexes in feline and human lymphatic filariasis. South east Asian J. Trop. Med. Publ. Health. 12: 492-498 (1981).

6. Berggren, W.L. y Weller, T.H. Immuno-electrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 16: 606-612 (1967).
7. Cañedo, L, Lacleste, J.P. y Morales, E. Evagination of the metacystode of *Taenia solium* En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltran, eds.) Academic Press, New York. pp.363-373 (1982).
8. Castañón, O.L.R. Detección de antígenos de *Cysticercus cellulosae*, en líquido cefalorraquídeo, mediante IgG acoplada a látex. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México (1986).
9. Centro Panamericano de Zoonosis: *Taenia solium / Cysticercus cellulosae* en America Latina y el Caribe. Organización Mundial de la Salud vol. 1. (1978).
10. Correa, D., Sandoval, M.A., Harrison, L.J.S., Parkhouse, M. E., Plancarte, A., Meza-Lucas, A. y 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. 83: 814-816 (1989).
11. Craig, P.S. Circulating antigens, antibodies and immune complexes in experimental *Taenia pisiformis* infections of rabbits. Parasitology 89: 121-131 (1984).

12. Craig, P.S. Nelson, G.S. The detection of circulating antigen in human hydatid disease. Ann. Trop. Med. and Parasitol 78: 219-227 (1984).
13. Des Moutis, I., Ouaiissi, A., Grzych, J.M., Yarzabal, L., Haque, A. y Caprom, A. *Onchocerca volvulus*: detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 533-542 (1983).
14. Diwan, A.R., Collier-Vann, M., Brown, P., Subianto, D. B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibb, C.J. y Gaddusek, D.C. Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 3:364-369 (1982).
15. Dixon, H.B.F. y Lipscomb, F.M. Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. Privy Council Med. Res. Special Rep. Ser. 299: 1-58 (1961).
16. Escobar, A. y Nieto, D. Parasitic diseases. Cysticercosis En: Pathology of the nervous system. (J. Minckler ed.) McGraw-Hill, New York (1972).
17. Espinoza, B. Antigenos específicos y de reacción cruzada de helminthos parásitos. Tesis de licenciatura Fac. de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (1980).
18. Espinoza, B., Flisser, A., Plancarte, A. y Larralde, C. Immunodiagnosis of human cysticercosis: En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán, eds.) Academic Press, New York. pp.163-170 (1982).

19a. Flisser, A., González, D., Skurovich, M., Madrazo, I., Correa, D., Rodríguez-Carbajal, J., Cohen, S., Rodríguez del Rosal, E., Collado, M., Fernández, B., Fernández, F. y Aluja, A. Praziquantel treatment of brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. I.- Radiological, physiological and histopathological studies. Parasitol. Res. **76**: 263-267 (1990).

19b. Flisser, A., González, D., Plancarte, A., Ostrosky, P., Monteor, R., Stephano, A., y Correa D. Praziquantel treatment of brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 2.- Immunologic and cytogenic studies. Parasitol. Res. **76**: 640-642 (1990).

20. Flisser, A., Pérez-Montfort, R. y Larralde, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. Bull. W.H.O. **57**: 839-856 (1979).

21. Flisser, A., Tarrab, R., Willms, K. y Larralde, C. Inmunoelectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. Arch. Invest. Me. (Mex) **6**: 1-12 (1975).

22. Flisser, A., Woodhouse, E. Larralde, C. Human cysticercosis: Antigens, antibodies, and non-responders. Clin. Exp. Immunol. **39**: 27-37 (1980).

23. Flores Barroeta, F. y Velasco, A. F. Hallazgos en el Hospital General, Centro Médico Nacional Gac. Med. Mex. **102**: 208-215 (1971).

24. García Domínguez, C. Efecto del praziquantel sobre la larva de la *Taenias solium in vitro*, Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. (1989).
25. Gemmell, M.A. Taeniidae-modification to life span of egg and regulation of tapeworm populations. Exp. Parasitol. 41: 314-328 (1977).
26. Gemmell, M.A. The effect of Weather on tapeworms eggs and its epidemiological implications En: "Weather and Parasite Animal Disease" (T.E. Gibson Ed.) Word Metereological Org. Tech. Rep. 159: 83-94 (1978).
27. Guidelines for surveillance prevention and control of Taeniasis/cysticercosis (Gemmell, M., Matyas, Z., Pawlosky, Z. y Soulsby, E. eds.) W.H.O. (Geneve) 45-55 (1984).
28. Hannu, J. T. Detection of soluble antigens of *Toxoplasma gondii* by a four-layer modification of an Enzyme Immunoassay. J. Clin. Microbiol. 17: 768-773 (1983).
29. Harrison, L.J.S. Clark, N.W.T. y Parkhouse R.M.E. A monoclonal antibody directed against a surface associated glycoprotein of *Taenia saginata* assessed as a diagnostic reagent. British Society for Parasitology, Spring Meeting, Aberystwth 8-10 Abril (1986).

30. Huijun, Z., Zhenghou, T., Reddy, M.V.R., Harinath, B.C. y Piessens, W.F. Parasite antigens in sera and urine of patients with Bancroftian and Brugian filariasis detected by a sandwich ELISA with monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**: 554-560 (1987).
31. Inclan, M. C. Comparación de la técnica de inspección sanitaria e inmunoelectroforesis en el diagnóstico de la cisticercosis porcina. Tesis Licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México (1980).
- 32a. Karavodin, L. M. y Ash, L.R. Circulating immune complexes in experimental filariasis. Clin. Exp. Immunol. **40**: 312-317. (1980).
- 32b. Laclette, J.P., Alagón, A., Willms, K. y Torre-Blanco, A. Purification of Antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. J. Parasit. **76**: 273-275 (1990).
33. Laclette, J.P. Ornelas, Y., Merchant, M. y Willms, K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde C. Ridaura y F. Beltrán, eds.) Academic Press. New York. pp. 375-387 (1982).
34. Laclette, J.P., Merchant, M.T. y Willms, K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. J. Parasit. **73**: 121-129 (1987).
35. Larralde, C., Laclette, J.P., Owen, S.C., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. y Goodsaid, F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 965-973 (1986).
36. Lawson, R. y Gemmell, M.A. Dispersal of taeniid eggs by blowflies. N.Z. J. Zool. **9**: 46-47 (1982).

37. Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with a folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193: 265. (1951).
38. Mac Mahon, B. y Pugh, T.F. Principios y métodos de Epidemiología. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F. (1984). 339 pp.
39. Madrazo, I., García-Rentería, J., Paredes, G. y Olhagary, B. Diagnosis of intraventricular and cisternal cysticercosis by computerized tomography with intraventricular contrast medium. J. Neurosurg. 55: 947-951 (1981).
40. Madawar, M.A. y Boller, A. Serological investigations on patients with special reference to circulating antigen. Tropenmedizin und Parasitologie 29: 57-62 (1977).
41. Mahajan, R.C. Geographical distribution of human cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaury y F. Beltrán, eds.) Academic Press, New York. pp. 39-46 (1982).
42. Martínez-Romero, M., Martínez-Murray, R., Boissilier, E. y Martínez-Duhart, E. Cisticercosis cerebral humana. Cirugía y Cirujanos 43: 507-520 (1975).
43. Nieto, D. Diagnóstico de la cisticercosis del Sistema Nervioso Central. Prensa Med. Mex. 13: 226-230 (1948).
44. Nieto, D. Cysticercosis of nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid fixation test. Neurology 6: 725-738 (1956).
45. Olivo, A., Plancarte, A. y Flisser, A. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. Int. J. Parasitol. 18: 543-545, 1988.
46. Ouais, A., Kouemni, L.S., Hague, A., Ridet, R.P., Andre, S.T. y Capron, A. Detection of circulating antigens in onchocerciasis, Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 1211-1218 (1981).

47. Pini, C., Pastore, R. y Valesini, G. Circulating immune complexes in sera of patients infected with *Echinococcus granulosus*. Clin. Exp. Immunol. 51: 572-578 (1983).
48. Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. Fibronectin-like properties of antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. Cytobios 36: 83-93 (1983).
49. Rabiela, M.T., Lombardo-Rivera, L. y Flores Barroeta, F. Cisticercosis cerebral. Estudio de 968 casos de autopsia. Patología 10:27-37. (1972).
50. Rabiela-Cervantes, M.T., Rivas-Hernández, A., Rodríguez-Ibarra, J., Castillo-Medina, S. y Cancino, F.M. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds). Academic Press, New York. pp.179-200 (1982).
51. Reyes-Armijo, E. y Beltrán Goñi, P. Cisticercosis intracraneana. Rev. Med. Hosp. Gra. Mex. 30: 317-348 (1967).
52. Rodríguez-Carbajal, J. y Boleaga, B. Neuroradiology of Human cysticercosis En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds). Academic Press, New York. pp.139-162 (1982).
53. Romero, C.E.: Frecuencia de anticuerpos séricos anti *Cysticercus cellulosae* por inmunoelectroforesis en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Ecatepec. Tesis de licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM (1980).
54. Santoro, F, Vandemeulebrouke, B. y Capron, A. *Schistosoma mansoni*: circulating antigens and immune complexes in infected mice. Exp. Parasitol. 47: 392-404 (1979).
55. Schenone, H., Villaroel, F., Rojas, A. y Ramirez, R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.) Academic Press, New York. pp. 25-38 (1982).

56. Silverman, P. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia* II. The morphology and development of the taenid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. Ann.Trop. Med. Parasitol. 48: 356 (1954).
57. Sogandares-Bernal, F., Race, M.C., Dennis, M.V. y Voge, M. Circulating antigens in infections of mice by tetrahyridia of *Mesoscestoides corti* Hoeppli, 1925. Z. Parasitenkunde 64: 157-167 (1981).
58. Tanaka, K., Kawamura, H., Toghi, N., Miyachi, Y. y Miyoshi, A. The measurement of *Ascaris suum* protein by radioimmunoassay in sera from patients with helminthiasis and with gastrointestinal diseases. Parasitol 86: 291-300 (1983).
59. Tellez-Giron, E., Ramos, C.M., Dufour, L., Alvarez, P., y Montante, M. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (DOT-ELISA) and standard ELISA. Am.J. Trop. Me. Hyg. 37: 169-173 (1986).
60. Velasco-Suárez, M., Bravo-Becherrelle, M.A. y Quirasco, F. Human cysticercosis: Medical-social Implications and economic impact. En: "Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives" (A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, eds.). Academic Press, New York. pp. 47-51 (1982).
61. Vargas Mendez, G. Distribución de *Cysticercus cellulosae* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. Tesis de licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM (1984).
62. Webbe, G. The hatching and activation of Taeniids are in relations to the development of cysticercosis in man. Z. Tropemed. Parasitol. 18: 354-369 (1967).

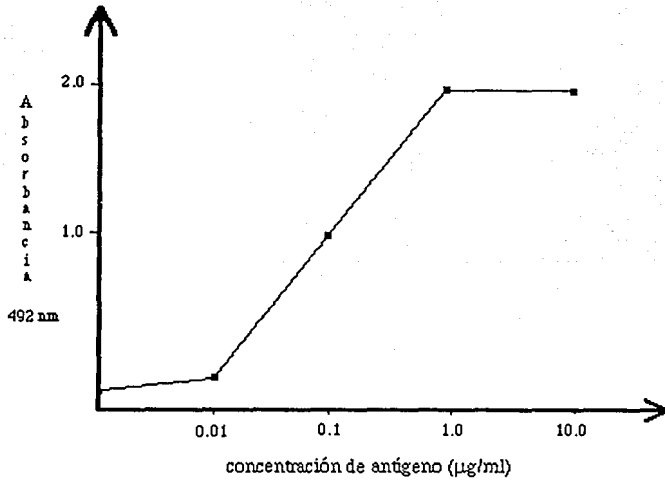


Figura 1. Curva dosis respuesta del sistema de anticuerpos monoclonales HP10, dirigido contra un componente de secreción excreción del cisticerco probado con extracto crudo del cisticerco.

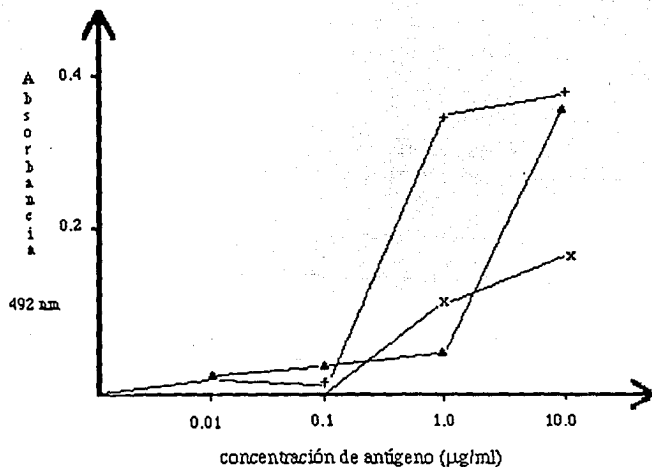


Figura 2. Curvas dosis respuesta del sistema de anticuerpos monoclonales HP12, dirigido contra un componente del fluido vesicular del cisticerco (+), y de los sistemas de anticuerpos policlonales contra el extracto crudo del cisticerco (x), o el antígeno B (triángulos) probados con extracto crudo del cisticerco (+ y x) o AgB puro (triángulos).

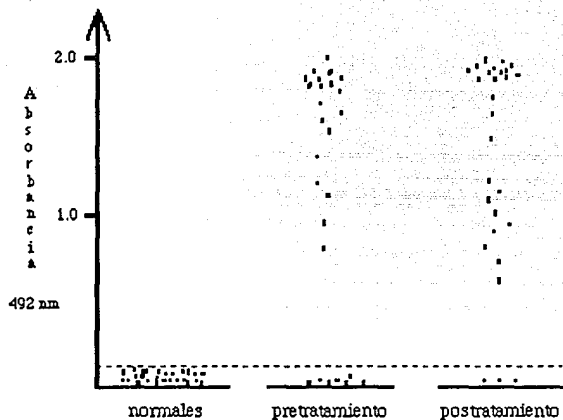


Figura 3. Valores de absorbancia individuales de los sueros provenientes de cerdos de los tres grupos analizados, utilizando el sistema de anticuerpos monoclonales HP10, dirigido contra un componente de secreción-excreción del cisticerco. Normales: cerdos no cisticercosos; Pretatamiento, cerdos con cisticercosis adquirida naturalmente, y Postratamiento, mismos cerdos cisticercosos después de ser sometidos a tratamiento cestocida con praziquante

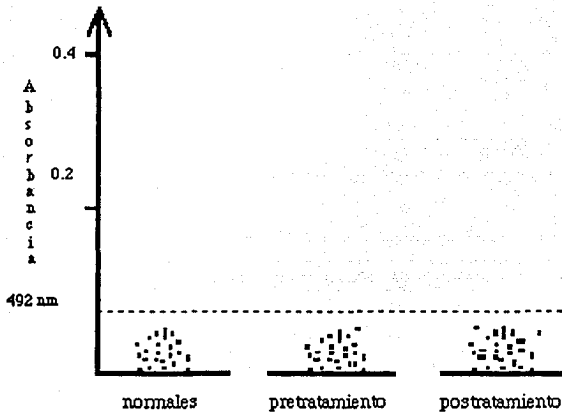


FIGURA 4. Valores de absorbancia individuales de los sueros provenientes de cerdos de los tres grupos analizados, utilizando el sistema de anticuerpos monoclonales HP12, dirigido contra un componente del fluido vesicular del cisticerco. Normales: cerdos no cisticercosos; Pretreatment: cerdos con cisticercosis adquirida naturalmente, y Post-treatment: mismo cerdos cisticercosos después de ser sometidos a tratamiento cestocida con praziquantel.

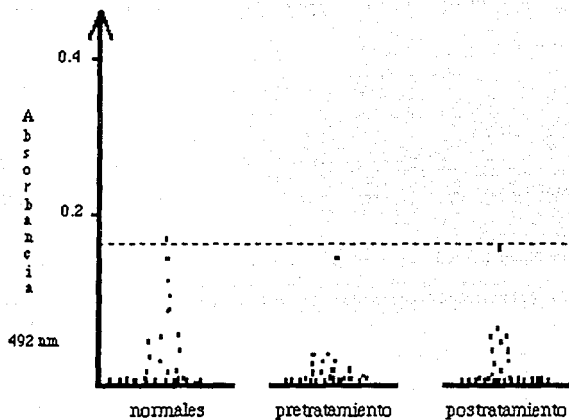


Figura 5. Valores de absorbancia individuales de los sueros provenientes de cerdos de los tres grupos analizados, utilizando el sistema de anticuerpos policlonales dirigidos contra el extracto crudo del cisticerco (Poac E). Normales: cerdos no cisticercosos; Pretratamiento: cerdos con cisticercosis adquirida naturalmente; Postratamiento: mismos cerdos cisticercosos después de ser sometidos a tratamiento cestocida con praziquantel.

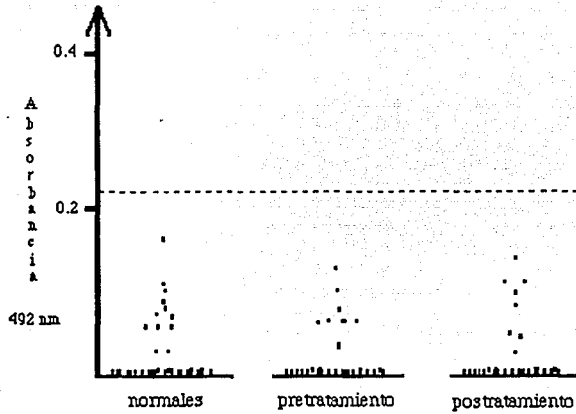


Figura 6. Valores de absorbancia individuales de los sueros provenientes de cerdos de los tres grupos analizados, utilizando el sistema de anticuerpos policlonales dirigidos contra el antígeno B (Poac B). Normales: cerdos no cisticercosos; Pretreatmento: cerdos con cisticercosis adquirida naturalmente, Postratamiento: mismos cerdos cisticercosos después de ser sometidos a tratamiento cestocida con praziquantel.

Cuadro 1

Características de los sistemas de anticuerpos empleados para la determinación de antígenos en suero de cerdos infectados con metacéstodos de *T. solium* por ELISA.

ANTICUERPOS	CARACTERISTICAS	FUENTE
HP10	Monoclonal (IgM) contra antígeno de superficie <i>T. saginata</i> de reacción cruzada con <i>T. solium</i> .	M. Parkhouse L.J.S.Harrison Reino Unido (29)
HP12	Monoclonal (IgM) contra antígeno de fluido vesicular del cisticerco de <i>T. solium</i> .	M. Parkhouse L.J.S. Harrison Reino Unido (29)
Poac E	Policlonal (cerdo) contra extracto crudo del cisticerco de <i>T. solium</i>	A. Flisser Mexico
Poac B	Policlonal (cerdo) contra antígeno B del cisticerco de <i>T. solium</i>	A. Flisser Mexico

Cuadro 2

Valores de absorbancia promedio y porcentaje de positividad para cada grupo de cerdos y para cada sistema de anticuerpos probados.

Grupo		Sistema de anticuerpo:			
		HP10 *	HP12	Poac E	Poac B
No cisticercosos (N = 30)	Media	0.03	0.03	0.03	0.03
	Punto de corte**	0.12	0.08	0.16	0.22
	Porcentaje de positivos	0	0	3	3
Cisticercosos Pretratamiento (N = 33)	Media	1.26	0.01	0.01	0.02
	Porcentaje de positivos	79	0	0	0
Cisticercosos Postratamiento (N = 33)	Media	1.29	0.02	0.02	0.03
	Porcentaje de positivos	91	0	3	3

* Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los grupos de cisticercosos pre o postratamiento y el grupo testigo cuando se utilizó el sistema de anticuerpo HP10.

** El punto de corte es la media más 3 veces la desviación estándar de los valores de absorbancia del grupo testigo, para cada sistema de anticuerpos.