

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León
Facultad de Ciencias Médicas
Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CEI)**



**Estandarización de ELISA y Western-Blot utilizando antígenos de
cysticercus de cepas locales.**

Autor:

Lic. Byron José Flores Somarriba

Tutor:

Lic. Aleyda Téllez. MSc. PhD
Profesor Titular
Dpto. Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN-León

Asesor:

Lic. Filimon Bucardo MSc. PhD
Profesor Titular
Dpto. Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN-León

León agosto del 2010

AGRADECIMIENTO.

A:

La cooperación Sueca que financio mis estudios de maestría

Mi tutora, Dra. Aleyda Téllez, por las revisiones continuas y el seguimiento de este trabajo.

Dr. Filemón Bucardo, Asesor de este trabajo, por sus sugerencias.

Lic. Reymundo Velásquez, colega del laboratorio de serología y parasitología del departamento de microbiología de la UNAN-León,

Karla González, Oscar Arbisu, María Soledad Calderón y Patricia Blandón, compañeros de estudio, por sus consejos y haber hecho de mis obligaciones un placer.

MSc. Orlando Mayorga. Director de Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, por haber creído en mis capacidades.

Dra. Mercedes Cáceres. Vice-Decana de la Facultad de ciencias Médicas.

Dr. Alberto Montoya responsable de el laboratorio de parasitología de Centro Nacional de Diagnostico y Referencia.

Lic. Nicolás Paiz por su colaboración en el desarrollo del ELISA,

La Dra. Cristiane Duttman, por darme la oportunidad de emplear los conocimientos adquiridos en mi maestría.

Sra. Cándida Hernández

Sra. Antonia Pérez.

RESUMEN

La neurocisticercosis constituye un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, principalmente en áreas rurales donde la crianza de cerdos es artesanal y las condiciones higiénicas sanitarias son deficientes. Se realizó un estudio de ensayo de laboratorio con el fin de desarrollar un ELISA y un Western-blot para el diagnóstico de la cisticercosis, utilizando antígenos crudos de cisticercos extraídos del músculo esquelético de cerdos; se emplearon 7 sueros controles positivos y 16 controles negativos. Con la técnica ELISA se obtuvo una sensibilidad del 100% IC_{95%} (92.86-100) y una especificidad de 93.75% IC_{95%} (78.16-100) mientras que con el Western-blot se obtuvo una sensibilidad 83.33% IC_{95%} (45.18 -100) y una especificidad del 100% IC_{95%} (96.88 -100). Estos resultados proveen una herramienta importante en el diagnóstico de la neurocisticercosis en Nicaragua.

ACRONIMOS.

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático.

IC: Intervalo de Confianza.

NC: Neurocisticercosis.

SNC: Sistema Nervioso Central.

HEODRA: Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello.

OR: Razón de Producto Cruzado.

RM: Resonancia Magnética.

LCR: Líquido Céfalo Raquídeo.

KDa: Kilodaltons.

AC: Antes de Cristo.

CDC: Control Diseases Center.

Th: Linfocitos T helper.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

TAC: Tomografía Axial Computarizada.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión.

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida con Dodesil Sulfato de Sodio.

Ag: Antígeno.

GP: Glicoproteínas.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

ADN: Acido Desoxirribonucleico.

ADNc: Acido Desoxirribonucleico Complementario.

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa.

PCR-RFLP: Reacción en Cadena de Polimerasa Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción.

PBS: Buffer Fosfato.

BSA: Albumina Bovina.

TMB: Tetrametilbenzidina.

DO: Densidad Óptica.

Índice.

Contenido	Nº de página
Introducción	1
Justificación	3
Planteamiento del Problema	4
Objetivos	5
Marco Teórico	6
Material y Método	17
Resultados	23
Discusión	25
Conclusión	28
Recomendación	29
Referencias	30
Anexos	34

1.-INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NC) es la parasitosis más común asociada al Sistema Nervioso Central (SNC). ⁽¹⁾ Esta enfermedad es causada por el *Cisticercus cellulosae* estado larvado de la *Taenia solium*, un metacéstodo que infecta al hombre y al cerdo, siendo el humano el huésped definitivo. ^(2, 3, 4,5)

La neurocisticercosis constituye un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, principalmente en áreas rurales donde la crianza de cerdos es artesanal y las condiciones higiénicas sanitarias son deficientes ⁽⁴⁾. Hay 50 millones de personas infectadas con cisticerco, 400 mil viven con síntomas de la enfermedad y 50 mil mueren cada año. ^(6, 7,8)

En Nicaragua los primeros casos de neurocisticercosis se reportaron en 1963 diagnosticados mediante clínica y radiología. En el período de 1975-1985 en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello (HEODRA) se reportaron 13 casos de cisticercosis de los cuales 12 fueron cisticercosis subcutáneas y 1 cerebral mediante análisis radiológico. En 1992 se encontró que de 751 pacientes investigados, 52 fueron diagnosticados con neurocisticercosis por medio de tomografía axial computarizada. Estos hallazgos revelan un aumento en la efectividad de los métodos diagnósticos.

En 1998 Herdocia y col ⁽⁸⁾ encontró 2.9% de positividad en pacientes no epilépticos y 7.2% en pacientes epilépticos en el municipio León (OR=2.63) utilizando la técnica de ELISA comercial con sensibilidad 87% y especificidad 96%. Vanegas y col ⁽¹⁰⁾ en este mismo año encontró una positividad de 5% utilizando la misma técnica en el Municipio de Telica. En el 2004 Bucardo y col, ⁽⁷⁾ obtuvo un 8% de positividad en estos pacientes epilépticos utilizando la misma técnica, no obstante se reportó un 14% de positividad cuando se empleó Western - blot, siendo ésta una técnica con sensibilidad y especificidad de 100% respectivamente. ^(7,8,10)

En la actualidad el diagnostico de la neurocisticercosis está basado en imagenología como la tomografía axial computariza (TAC) y la resonancia magnética (RM), sin embargo estas no son accesibles para la mayoría de la población afectada por esta parasitosis lo que hace necesario el empleo de pruebas rápidas y de bajo costo sobresaliendo el Western-blot y el

ensayo inmunoenzimático (ELISA) con sensibilidad y especificidad variable según la pureza del antígeno utilizado.

Simac y col. ⁽¹¹⁾ en 1995 en la India desarrollo un ELISA utilizando antígenos crudo de cisticerco y pacientes diagnosticados con neurocisticercosis con una sensibilidad de 90% en suero y un 94% en LCR.

Lisiane y col ⁽¹²⁾ en 1999 en Brasil, evaluaron la capacidad del antígeno de 26 KDa de la larva de *Taenia solium* para el diagnostico de cisticercosis por medio de un ELISA con una especificidad de 100%. Ludici Neto F. y col ⁽¹³⁾ obtuvo 100% de sensibilidad y especificad utilizando un antígeno de 100 KDa.

Jharna Mandal y col ⁽¹⁴⁾ en el 2008 consiguió una sensibilidad del 95% y especificidad de 100% utilizando la fracción antigénica de 20-24 KDa mediante un ELISA.

Ednia C. Bueno y col ⁽¹⁵⁾ estandarizaron un ELISA con dos tipos de antígenos, uno sintético derivado de lectin-lectina (sTS18var1) con una sensibilidad de 90.4% en liquido cefalorraquídeo (LCR) y 90.2% en suero y una especificidad de 90.3% en LCR y 98% en suero, el otro fue un antígeno recombinante el (rGP50), con una sensibilidad de 94.7% en LCR y 100% en suero y una especificidad de 94% en LCR y 100% en suero.

2.-JUSTIFICACIÓN:

En la última década se han desarrollado nuevos criterios efectivos para el diagnóstico de la neurocisticercosis (tomografía, resonancia magnética), sin embargo estos métodos de diagnósticos son costosos, aproximadamente \$150-250 resultando inaccesibles para la población de países en desarrollo como el nuestro. Principalmente cuando se toma en cuenta que los más afectados por esta parasitosis son las personas con ingresos económicos bajos, por lo que el diagnóstico serológico que comprende técnicas como ELISA, Western Blot (\$10-20), representa una buena alternativa si se combina con los datos clínicos y epidemiológicos. (3,10).

Considerando que en Nicaragua actualmente el diagnóstico de laboratorio está basado en kits comerciales estandarizados en países con epidemiología y cepas diferentes a las nuestra, así como los altos costos de éstos, en este estudio nos hemos propuesto desarrollar un ELISA y un Western-blot para la determinación de anticuerpos anti-cisticercos, utilizando antígenos extraídos de cepas locales.

3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los parámetros óptimos para la estandarización de un ELISA y Western-Blot utilizando antígeno crudo extraído de cisticercos de cepas locales?

4.-OBJETIVOS:

4.1- Objetivo General

Desarrollar los métodos de ELISA y Western-blot para la determinación de anticuerpos anti-cisticercos en pacientes que sufren de cisticercosis.

4.2- Objetivos Específicos

2. Estandarizar los métodos de ELISA y Western para la determinación de anticuerpos anti-cisticercosis.
1. Purificar proteínas antigénicas extraídas de cisticercos en porcinos nativos.
3. Valorar la sensibilidad y especificidad entre los métodos ELISA y Western-blot

5.- MARCO TEÓRICO

5.1-Historia de la cisticercosis

La cisticercosis en la antigüedad representó posiblemente una de las grandes plagas. En el siglo IV A.C., Aristóteles en su tratado "Historia de los Animales" describe con precisión la presencia de larvas parasitarias en la musculatura y la lengua del cerdo. En la Biblia también se hace referencia a medidas alimentarias que pueden ser tomadas como norma de prevención para diferentes tipos de zoonosis entre ellas la cisticercosis: "de entre los animales, todo el que tiene pezuña hendida y que rumia, éste comeréis. Pero de los que rumian o que tienen pezuña, no comeréis estos: el camello, porque rumia pero no tiene pezuña hendida, lo tendréis por inmundo. También el conejo, porque rumia pero no tiene pezuña, lo tendréis por inmundo. Asimismo la liebre, porque rumia pero no tiene pezuña, la tendréis como inmunda. También el cerdo, porque tiene pezuñas, y es de pezuña hendida, pero no rumia, lo tendréis por "inmundo" (Levítico 11.3-7). De 1550 a 1558 Paronoli y Rumier mencionaron la infestación al sistema nervioso central y la duramadre por quistes parasitarios. En 1650 Paracelso sospechó que la epilepsia de un sacerdote enfermo derivaba de la presencia de quistes cerebrales. En 1829 se realiza la primera descripción de la infestación de cisticerco a la cámara anterior del ojo. ⁽¹⁶⁾, Van Beneden, en 1853 en Bélgica, demostró que los cerdos que ingerían huevos procedentes de proglótides de *T. solium* eliminados en heces humanas desarrollaban lesiones quísticas musculares o cerebrales típicas de la cisticercosis. El siguiente paso fue demostrar que el consumo de carne de cerdo infectado produce *Taenia* intestinal. En 1855, Küchenmeister, en Alemania, solicitó que se le permitiera dar la última cena a un condenado a muerte. La cena consistió en una morcilla en la cual había introducido proglótides y huevos de *cisticerco*, y una sopa de fideos que dice textualmente que no estaba muy caliente. Tres o cuatro días después el reo fue ejecutado y se realizó la autopsia, encontrándose que en el duodeno ya había una *Taenia* que estaba muy bien agarrada a la mucosa, con lo cual quedó demostrado que el consumo de carne de cerdo infectada produce la teniasis humana.⁽¹⁷⁾

En 1901 en el Ecuador las primeras descripciones las realizó el Dr. Valenzuela quien reportó

el primer caso de NC en Guayaquil. Entre 1909 y 1911 Winberg y Moses mediante la fijación del complemento en el suero iniciaron el diagnóstico serológico. En 1973 como consecuencia del avance tecnológico surgió la tomografía computarizada que constituye el pilar fundamental en el diagnóstico y tratamiento de la cisticercosis. En la década de 1980 se dio mucho énfasis al diagnóstico inmunológico de la NC existieron una gran cantidad de publicaciones destacándose principalmente los estudios sobre el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y western blot. En 1993 la Organización Mundial de la Salud, la Organización Panamericana de la Salud y entidades afines financiaron la realización de programas de prevención sobre el control del complejo Teniasis/Cisticercosis y como resultado de esto se publicaron diversos tipos de manuales, guías y normas sobre el control de esta zoonosis. ⁽¹⁶⁾

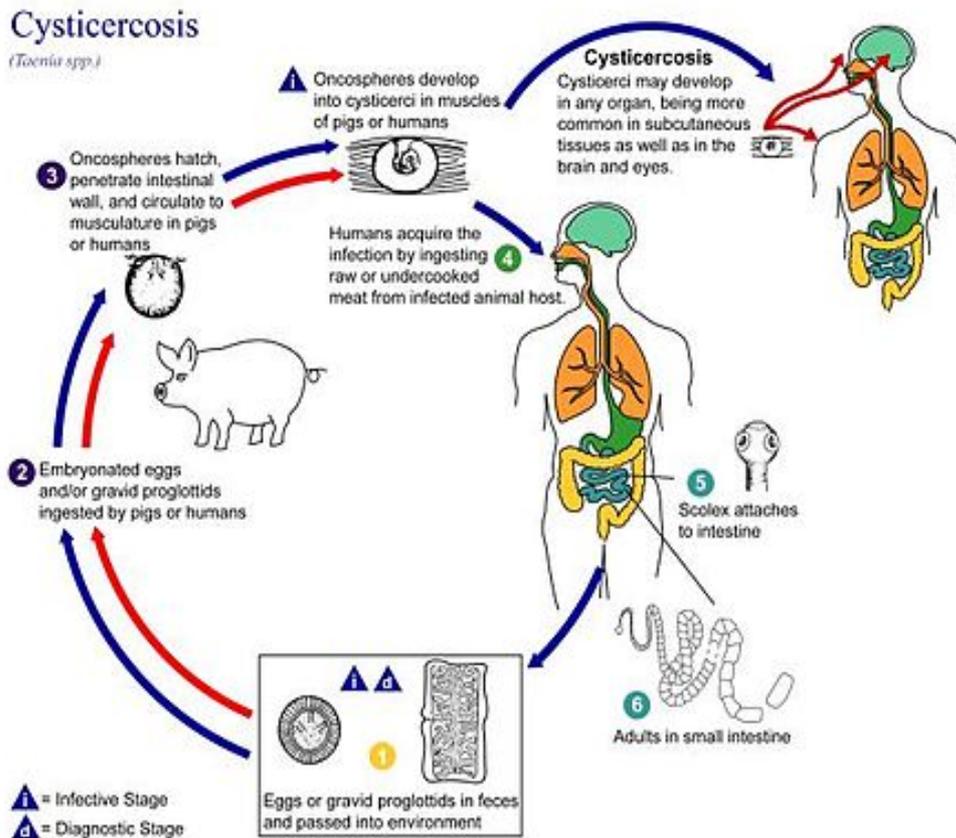
5.2- El parásito

La *Taenia solium* pertenece a la clase *céstoda*, del phylum *planthelminto* que se caracterizan por ser gusanos planos y largos (1.5-8 metros) que pueden llegar a vivir hasta 25 años en el intestino delgado (yeyuno) del humano, cuenta con una escólex que presenta cuatro ventosas y a diferencia de la *Taenia saginata* posee un rostelo provisto de una doble corona de ganchos que utilizan para fijarse a la mucosa intestinal a partir de donde se desarrolla el estróbilo (cuerpo) constituido por cientos de segmentos llamados proglótides los que poseen órganos reproductivos masculino y femenino, por lo cual son considerados como unidades reproductivas independientes; en la porción distal del cuerpo se encuentran las proglótides grávidos con cientos de huevos en diferentes estados de maduración, los que tienen forma ligeramente ovalada de color café y miden de 30-40 micras con una doble membrana que los semeja a una rueda, morfológicamente son indistinguibles de los huevos de *Taenia saginata*.^(8,19)

El *cisticerco* en su forma quística o vesicular contiene líquido, es esférico, semejante a un grano de arroz (5 a 10 mm de diámetro) de paredes translúcidas que dejan ver por transparencia un punto denso y blanquecino que corresponde al escólex invaginado. Frecuentemente, está rodeado por una fina capa colágena que lo separa del tejido circundante; presenta microvellosidades y una abertura por la cual el escólex se evagina. ^(8, 18, 19)

5.3- Ciclo Biológico del Parásito

Fuente CDC



El hombre desarrolla teniasis intestinal por ingesta de *cisticercos* vivos inadecuadamente cocidos en la carne del hospedero intermediario natural (el cerdo). Aproximadamente cuatro meses después de la infección, la *Taenia* adulta libera diariamente con las heces del portador alrededor de 300000 huevos con capacidad de infectar a seres humanos y a cerdos causando cisticercosis. Los *cisticercos* (meta cestodos) se desarrollan en el músculo y el cerebro (Neurocisticercosis).⁽¹⁸⁾

En las personas la infección ocurre por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con excretas humanas que contienen huevos, lo que a su vez es facilitado por la convivencia con portadores del parásito.

La Teniasis es una infección producida por *Taenia solium* y *Taenia saginata* que requieren de huéspedes intermediarios como los cerdos y las reses respectivamente. Es importante recalcar que aunque el hombre es el huésped definitivo también puede ser un huésped intermediario y si esto ocurre en la infección por *Taenia solium* entonces el paciente desarrollara la cisticercosis. El mecanismo más común para adquirir la cisticercosis es la heteroinfección de huevos que proceden de otro individuo con el parásito, también es posible una auto infección externa cuando la persona se contamina con las manos u alimentos con los huevos que él mismo ha eliminado en la materia fecal, otra posibilidad es la auto infección interna cuando hay una regurgitación de los huevos desde el yeyuno hasta el estómago. En cualquiera de las formas anteriores el embrión exacanto que se encuentra en los huevos es liberado en el intestino delgado penetrando la pared para alcanzar la circulación, desde aquí pueden llegar a los diferentes órganos (incluyendo el Sistema Nervioso Central) donde crecen hasta formar los cisticercos.⁽¹⁹⁾

5.4- Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas están determinadas por el número, tamaño, localización y forma quística o racemosa del parásito así como de la respuesta inmune del huésped, lo que plantea un inmenso número de posibilidades de combinación, dando una amplia gama del espectro sintomatológico, que van desde asintomático hasta cuadros de muerte súbita por bloqueo del sistema ventricular.^(16, 17, 18,19)

5.4.1- Cisticercosis Quística:

Su cuadro clínico puede estar relacionado con su ubicación en la corteza cerebral con crisis epiléptica, hipertensión intracraneal, cuadro confuso alucinatorio, cuando los quistes se encuentran en el parénquima cerebral o en los ventrículos pueden producir la llamada hidrocefalia interna con síntomas intermitentes.⁽²¹⁾

5.4.2- Cisticercosis Racemoso:

Es un *cisticerco* diferente morfológicamente al quístico por tener similitud con un racimo de

uvas, actualmente se consideran el mismo parásito que al ubicarse en las cisternas o sistema ventricular se afecta su homeostasis por algún tipo desconocido de respuesta inmunológica, la hidrocefalia es crónica, hay demencia y dificultad para caminar. ⁽²¹⁾

5.5- Respuesta inmune en la neurocisticercosis:

En infecciones crónicas por *Helminthos* como en la cisticercosis causada por la forma larvada del *Taenia solium* los parásitos pueden vivir por años gracias a una profunda modulación del sistema inmune del huésped, los síntomas están relacionados con la inflamación granulomatosa que aparece como resultado de la muerte de la forma quística del parásito. Aunque la larva invasiva puede ser destruida por suero inmune en presencia del complemento, la inmunidad frente al quiste depende de la respuesta celular. Las células T helper desarrollan un papel importante en la regulación de la inmunidad y la respuesta inflamatoria a través de su habilidad para secretar diferentes citoquinas, en la cisticercosis hay un cambio en la protección temprana de la inmunidad de tipo Th1 (promueve la respuesta inmune celular) a una respuesta tardía de tipo Th2 (estimula la respuesta inmune humoral), esto podría ser responsable de la reproducción del parásito, la residencia a largo plazo y la intensidad de la parasitosis sin embargo es importante resaltar que la producción de anticuerpo es útil para el diagnóstico, no obstante los niveles pueden descender como consecuencia de la calcificación de los quistes.

5.6- Diagnóstico:

El diagnóstico de la cisticercosis se basa en hallazgos clínicos, epidemiológicos, pruebas serológicas y estudio de imágenes radiológicas.

5.6.1- Microscopía

Para identificar a los portadores del parásito adulto *Taenia solium*, se realiza un diagnóstico convencional por macroscopía en la búsqueda de proglotides y el estudio microscópico que requiere un examen directo o por concentración de materia fecal (Método de Ritchie), sin

embargo la técnica es de escasa sensibilidad; el test de Graham es muy útil para la identificación de *T. saginata*, pero no para *T. solium*. Es importante resaltar que por el estudio microscópico de los huevos es imposible distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*, esto se logra observando los proglotides o el escolex de los parásitos. ⁽²²⁾

5.6.2- Imagenología:

Las técnicas de neuroimágenes, tales como Tomografía Axial Computarizada (TAC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), son útiles para el diagnóstico, porque proveen evidencia objetiva del número y topografía de las lesiones, su estado de evolución y el grado de reacción inflamatoria del hospedador contra el parásito, pero la infección puede pasar desapercibida cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes. Es imprescindible un diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas y con neoplasias del SNC. Por otro lado, estas técnicas aunque son de amplio uso en las zonas urbanas, son muy costosas y de difícil acceso en la mayoría de las áreas donde la cisticercosis es endémica. ⁽²⁸⁾

5.6.3- Serología:

Las principales pruebas serológicas en el diagnóstico de la cisticercosis, son los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) que detectan anticuerpos en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo o coproantígenos en heces que constituyen una ayuda importante para los profesionales de la salud. ^(18, 20)

5.6.3.1- Ensayo inmunoenzimático (ELISA):

Se basa en la utilización de antígenos purificados o semipurificados de la membrana o fluido vesicular del *cisticerco*, los cuales son fijados en un soporte sólido, éstos son puestos en contacto con el suero o líquido cefalorraquídeo en busca de anticuerpos anticisticerco, de estar presentes dichos anticuerpos se fijaran al antígeno y el complejo formado es detectado al aplicarle un conjugado que contiene anti-humano unido a una enzima la cual catalizará su

sustrato dando una reacción calorimétrica directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anticisticercos en la muestra.^(7, 8, 10)

Esta prueba detecta del 80 al 90 % de los casos seropositivos, sin embargo como en todas las pruebas serológicas esta disminuye su sensibilidad en pacientes inmunosuprimidos, mientras que la especificidad está determinada por el grado de purificación del antígeno utilizado, de este modo se pueden disminuir las reacciones cruzadas con otros parásitos principalmente con los de la clase *cestoda* ^(4, 8) Una manera de semipurificar el antígeno es utilizando cromatografía de afinidad o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). 7 diversos estudios han demostrado la utilidad de antígenos extraídos de *Taenia cracciceps* en diagnóstico de la cisticercosis ^(23,24) También Se han desarrollado varios ensayos para la detección de antígenos circulantes tanto en suero como en LCR pero los mejores son los basados en el uso de anticuerpos monoclonales. En 1989, Harrison y col., diseñaron un sistema de inmunodiagnóstico por captura de antígeno utilizando un anticuerpo monoclonal (HP10), que reconoce un epítipo glucídico repetido, presente en proteínas secretadas por los cisticercos de *T. saginata* y otros *ténidos*. La prueba ha sido utilizada tanto en suero como en LCR con buenos resultados con 85% de sensibilidad, sin embargo esta desciende hasta 65% cuando solo hay un quiste. ⁽²⁸⁾ Sin embargo es importante resaltar que un resultado positivo no indica un acisticercosis actual puesto que lo que se buscan son anticuerpos.

5.6.3.2- ELISA para la búsqueda de coproantígenos:

Se han desarrollado técnicas de detección de coproantígenos utilizando para su captura anticuerpos policlonales de conejos inmunizados con extractos crudos de los parásitos adulto. Esta técnica presenta 100% de sensibilidad y 94% de especificidad ya que permite detectar a los portadores de *Taenia sp*, pero no consigue distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Cuando la determinación se realiza en tira reactiva (“dipsticks”), la sensibilidad disminuye al 85%, aunque con esta variante se puede analizar un mayor número de muestras y no se necesita de equipo costoso. Este ensayo ha sido empleado en trabajos epidemiológicos y demostró ser una técnica muy sensible en la determinación de la prevalencia de teniasis, además de su gran utilidad en la evaluación de la eficacia de tratamiento en masa de poblaciones de las áreas endémicas. Otros grupos han desarrollado métodos de detección de coproantígenos

similares donde los sueros policlonales de conejos están dirigidos contra antígenos de excreción/secreción o antígenos de superficie de *T. saginata*, pero presentan el mismo inconveniente, de no permitir un diagnóstico especie-específico. ^(27, 28)

5.6.3.3- Western blot:

Es considerada una prueba con gran especificidad y sensibilidad (cercana al 100%) ya que esta técnica utiliza antígenos glicoprotéicos semipurificados o purificados de cisticercos que son previamente separados por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) y luego transferido a membranas de nitrocelulosa, de manera que pueden detectarse anticuerpos contra diferentes antígenos del parásito (aproximadamente 31 antígenos diferentes). En las últimas décadas se han realizado esfuerzos para caracterizar antígenos que puedan mejorar la especificidad de los ensayos y utilizar estos antígenos purificados en el inmunodiagnóstico de la enfermedad. ⁽²⁸⁾

Uno de los antígenos mejor caracterizados del cisticerco de *T. solium* es el antígeno B (AgB) el cual fue identificado como un arco de precipitación en inmunolectroforesis al confrontar un extracto de cisticercos con sueros de pacientes con neurocisticercosis y fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos de los sueros de pacientes con la enfermedad. Está demostrado que AgB corresponde a paramiosina, una proteína de músculo de la *Taenia*. Las glicoproteínas han sido señaladas como antígenos específicos en cisticercosis, al respecto Tsang en 1989 logro' purificar por cromatografía de afinidad con lectina de lenteja, siete glicoproteínas (GP13, GP14, GP18, GP21, GP24, GP39-42, GP50) de *metacestodos* de *T. solium*, que exhibían un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad en el diagnóstico de cisticercosis, empleándolas en la técnica de western blot. Dicho ensayo fue reconocido por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como el método inmunológico de elección para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis. . ^(2, 7, 24, 25, 28)

5.6.4- Diagnostico Molecular:

Por otra parte, se han probado técnicas de diagnóstico molecular de teniasis, con secuencias de ADN complementario (ADNc) de *T. solium*, e hibridación para la detección de huevos en

heces; además se estableció el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico de especies de *T. saginata* y *T. solium*, para identificar posibles variaciones genéticas. ⁽²¹⁾

5.6.4.1- Sondas de hibridación:

Para el diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata* se han utilizado técnicas como sondas de ADN. En 1990, Harrison y col, clonaron 2 sondas de ADN, HDP1 y HDP2, en una genoteca genómica de *T. saginata*, que permitieron la identificación diferencial por hibridación de los dos grandes *ténidos* del hombre. Igualmente, en 1995, Chapman y col, clonaron de genotecas genómicas de *T. solium* y *T. saginata* dos sondas, pTsol-9 y pTsag-16, específicas de *T. solium* y *T. saginata* respectivamente y que logran distinguir los dos *ténidos*. ⁽²⁸⁾

5.6.4.2- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La primera PCR en Teniasis fue desarrollada por Gottstein en 1991 y lograba la identificación de *T. saginata*. A partir de la secuencia de la sonda HDP2 se ha diseñado una “múltiplex PCR” que posibilita un diagnóstico diferencial de *T. solium* y *T. saginata*. Esta PCR ha sido utilizada para la identificación de aislados de los *ténidos* procedentes de distintas zonas geográficas. Utilizando la PCR basada en la amplificación de la secuencia HDP2 en Brasil Nunes y col en 2003 se logró la diferenciación de *T. solium* y *T. saginata*. Más recientemente (2005) este mismo grupo de investigadores ha desarrollado una PCR-RFLP (“PCR-restriction fragment length polymorphism”, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) que amplifica la secuencia HDP2, seguido por digestión con la enzima DraI, que permite diferenciar *T. solium* de *T. saginata*.

Todos estos trabajos demuestran que las técnicas de biología molecular, en especial la PCR son un gran avance en el diagnóstico especie-específico de teniasis. ^(25, 27, 28)

5.6.4.3- Antígenos recombinantes:

Aunque se han realizado múltiples estudios sobre antígenos específicos para el diagnóstico

de la enfermedad, la purificación de éstos requiere gran cantidad de material parasitario, además de equipos sofisticados y técnicas laboriosas, por lo que se ha recurrido a la tecnología del ADN recombinante para la clonación de las moléculas de interés diagnóstico. Así, la clonación y expresión de la paramiosina, y fragmentos truncados de ésta, ha permitido estudiar el valor diagnóstico de la misma y hacia cual región de la proteína se dirige la respuesta inmune del hospedador. Greene y col en 2000 clonaron, dos genes de *T. solium* que expresan las glicoproteínas de 14 kDa (TS14) y 18 kDa (TS18), descritas en 1989 por Tsang y col. Al hacer la evaluación serológica de dichos antígenos, observaron que eran reconocidos por sueros de los pacientes con cisticercosis y no por los de los pacientes con parasitosis relacionadas). En el 2004 se clonó el gen correspondiente a la glicoproteína de 50 kDa también descrita por Tsang en 1989. La proteína expresada mostró eficacia en el diagnóstico de cisticercosis. ^(27, 28)

5.6.4.4- Péptidos sintéticos

La utilización de péptidos sintéticos derivados de antígenos previamente caracterizados evitaría la necesidad de purificación de los antígenos recombinantes y podría asegurar la reproducibilidad de los ensayos. Por ello, últimamente se han realizado diversos trabajos en este sentido. Los péptidos más utilizados son: KETc1, KETc12, KETc410 y KETc413 diseñados a partir de las secuencias de ADNc de los clones KETc1, KETc4 y KETc12. En un estudio sobre glicoproteínas de *metacestodos* de *T. solium* se prepararon péptidos sintéticos con la secuencia aminoacídica completa de las glicoproteínas TS14 (sTS14) y TS18 (sTS18) y se evaluaron en el diagnóstico de cisticercosis, mediante FASTELISA, siendo sTS14 reconocido por el 53% de los sueros de pacientes con cisticercosis, mientras que la sensibilidad de sTS18 fue mucho menor; la especificidad de ambos péptidos fue del 100%. Paralelamente, los autores realizaron la mezcla de sTS14 y sTS18 pero no mejoraron los resultados obtenidos. ⁽²⁸⁾

5.7- Epidemiología:

La cisticercosis es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central

(SNC), en países endémicos, sobre todo América latina, África y Asia. Se considera la primera causa de epilepsia por delante de tumores cerebrales, anomalías vasculares y traumatismos. En los países europeos como en España, no es una enfermedad endémica pero se ven casos incidentes con cada vez más frecuencia en la población inmigrante.²⁷ En América latina existe una incidencia extremadamente alta, desde México hasta Chile, según datos de autopsias, las tasas globales de cisticercosis humana oscilan entre 100-600 por cada 100,000 habitantes en Latinoamérica, pero estudios basados en pruebas inmunológicas aplicada a poblaciones en general, revelan cifras de 10 o más veces superiores. Se estima que América latina 344.000 personas tienen neurocisticercosis.⁽⁸⁾

Un estudio seroepidemiológico en México empleando hemoaglutinación reportó un 3% de positividad en 7000 muestra de la población general.⁽¹⁸⁾

Herdocia y col reportó en León Nicaragua una seropositividad dos veces mayor en pacientes epilépticos que en no epilépticos utilizando la técnica de ELISA.⁽⁸⁾

Vanegas y col reportó un 5% de seropositividad a neurocisticercosis por la técnica de ELISA con habitantes de la ciudad de León Nicaragua.⁽¹⁰⁾

Reyes y Ortega reportaron un 27% de seropositividad con la técnica de ELISA en una población rural del occidente de Nicaragua.⁽²⁹⁾

Bucardo y col, en el 2004 obtuvieron un 8% de positividad en pacientes epilépticos utilizando la misma técnica, no obstante se reportó un 14% de positividad cuando se empleó Western blot.⁽⁷⁾ Esto evidencia la mayor eficacia del Western-blot frente al ELISA.

6- MATERIAL Y MÉTODO

6.1- Tipo de estudio: Ensayo de laboratorio

6.2- Sueros controles

Un total de 7 muestras de sueros positivos para cisticercosis obtenidos de pobladores del Municipio de San Nicolás-Estelí con previo diagnóstico serológico (ELISA Y Western Blot) y por imagenología (TAC). Dichas muestras fueron tomadas en los años 2005-2006 para un estudio de prevalencia en esta zona, realizado por Duttman y Téllez. Para investigar reacciones cruzadas se utilizaron 16 sueros negativos, de los cuales 3 fueron suero de pacientes infectados con *Himenolepis*, 4 de pacientes infectados con *Ascaris*, 2 de pacientes infectados con *Trichuris*, confirmados por examen general de heces y 7 sueros de pacientes con anticuerpos IgG positivos para *toxoplasma* por inmunofluorecencia indirecta realizadas en el laboratorio de serología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

6.3- Purificación de antígenos.

Los quistes fueron extraídos directamente del músculo esquelético del cerdo, macerados con ayuda de ciclos de congelación y descongelación, para ser luego sonicados rompiendo la pared de parásito, el sobrenadante fue centrifugado a 14000 rpm por 30min para eliminar el exceso de lípidos, se midió la concentración de proteína por el método de Biuret,. La preparación fue alicuotada y guardadas a -20°C hasta su uso. **(Ver anexos N0 1).**

6.4- Estandarización del Ensayo Inmunoenzimático indirecto (ELISA) con glicoproteínas del cisticerco

Se utilizaron placas de poliestireno de 12 x 8 pozos (MAXISORP; NUNC, Alemania).

6.4.1- Estandarización de la concentración de antígeno en la placa

En cada pozo se colocaron diluciones seriadas de antígenos glicoproteicos del cisticerco en buffer carbonato a partir de una concentración de 12 mg/ml y se incubaron por 18h (toda la noche) a 4°C, lavado 5 veces con PBS-Tween20 al 0.3%, bloqueados con BSA al 0.05% y leche descremada al 5% (Skim Milk Powder. Meck) en PBS-Tween 20 al 0.3%. Se incubaron con los sueros en diluciones 1:100 (fijada momentáneamente) en PBS- Tween20 al 0.3%, durante 30 min a 37°C esto con el fin de establecer la concentración de antígenos donde se observa la mayor absorbancia y la conservación de la linealidad. Se lavo 5 veces con PBS-Tween20 al 0.3%. El conjugado utilizado fue anti-IgG humana-peroxidada (SIGMA) en dilución de 1:1000 incubados por 30 min a 37°C, lavado 5 veces con PBS- Tween20 al 0.3%. Se adiciono 100 µl de sustrato 3,3,5,5-Tetramethylbenzidine (TMB-SIGMA), incubado 40 min a temperatura ambiente y se adiciono ácido sulfúrico (2.5M) para interrumpir la reacción enzimática.

6.4.2- Estandarización de las diluciones de suero

Cuando se estableció la concentración óptima de antígenos se procedió a practicar los ensayos con diferentes diluciones de los sueros de pacientes positivos con el fin de determinar la dilución a la cual se registra una absorbancia más alta y que a la vez proporcione una buena linealidad. Los procedimientos son iguales a la de estandarización de la concentración antigénica, con la diferencia que en este paso lo que varia son las diluciones de los sueros.

6.4.3-Estandarización de las diluciones de conjugado anti-IgG humano peróxidos (SIGMA)

Después de tener las concentraciones optimas de antígeno y la dilución adecuada de las muestras, se procedió de forma similar para establecer la concentración apropiada de conjugado.

6.4.4-Determinación del cut-off para el ELISA indirecto

El cut-off consiste en el promedio de las lecturas de DO obtenidas a 450 nm de 16 sueros controles negativos más tres desviaciones estándar.

6.5- Preparación de geles para la electroforesis

6.5.1- Gel Separador: Se prepararon los geles a una concentración con 12% de Acrilamida – Bis-acrilamida en una cámara de BIO-RAD Modelo mini-protean (**ver anexo N0 2**).

6.5.2- Gel concentrador: Se prepararon geles al 5% de Acrilamida – Bisacrilamida (**ver anexo N0 2**).

6.6- Estandarización del ensayo de Inmunolectrotransferencia (Western- blot) con glicoproteínas del cisticerco.

6.6.1- Electroforesis

Los geles se montaron en la cámara BIO-RAD (Ver anexo N05) con buffer de electroforesis, se coloca el marcador de peso molecular en carril número 1 y las proteínas del cisticerco con buffer de muestra a diferentes concentraciones en carriles siguientes a partir del antígeno concentrado (12mg/ml), se corrió a 160 Vol. Hasta que el frente de corrida saliera por completo de el gel (**Ver anexo N03**).

6.6.2- Electrotransferencia:

Empleando de acuerdo con las instrucciones del fabricante el equipo Trans-Blot RSD Semi-Dry Electroforetic Transferí Cell BIO-RAD (Ver anexo N06) en donde las glicoproteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0.2µm) de grueso cortadas 8x7cm.

6.6.3- Estandarización la concentración de Antígenos en las tiras

Posterior a la transferencia las membranas con el antígeno a diferentes concentraciones se cortaron en tiras de 3mm de ancho para ser sometidas al ensayo inmunoenzimático con sueros controles determinando a que concentración de antígenos hay una mejor reacción. En este momento el ensayo se practicara con una concentración fija de muestra y de conjugado. **(Ver anexo N04).**

6.6.4- Estandarización de las diluciones de suero

Con una concentración óptima de antígenos establecidos se practicaron los ensayos con diferentes diluciones de los sueros de pacientes positivos con el fin de determinar la dilución a la cual se registra una lectura más clara. Los procedimientos son iguales a la de estandarización de la concentración antigénica, con la diferencia que aquí lo que varia son las diluciones de los sueros.

6.6.5- Estandarización de las diluciones de conjugado anti-IgG humano peroxidasa (SIGMA)

Con una concentración óptimas de Antígeno y la dilución adecuada de las muestras, se libera la dilución del conjugado en busca de la concentración más adecuada de este, con un procedimiento similar a los anteriores.

6.6.6- Estimación de los pesos moleculares de las glicoproteínas reconocidas por anticuerpos de pacientes positivos

Se miden las movilidades electroforéticas de las glicoproteínas en mm para calcularlos **Rf** de cada banda.

$$\mathbf{Rf = B/A.}$$

A: Distancia de la parte superior del gel ala frente de corrido.

B: Distancia de la parte superior de gel a la banda.

Sabiendo que el Rf es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, realizamos una recta patrón con las proteínas del marcador peso molecular conocido (SIGMA, 8 proteínas de 7000 a 240000 KDa) y se interpolan a esta los Rf de las glicoproteínas reconocidas por los sueros positivos. Se considerará positivo los sueros que reaccionen con al menos una de las siguientes bandas: 9, 14, 17, 24, 26, 38-42, 50 KDa según lo establecido por T.Sang y Col. ⁽³¹⁾

6.7-Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático EPIDAT versión 3.2, para calcular las proporciones con un nivel de confianza del 95% haciendo uso de métodos exactos.

6.7.1- Determinación de la sensibilidad para Western-Blot y ELISA

Se procesarán las muestras tanto con ELISA como por Western-Blot de controles positivos para cisticercosis previamente confirmados por serología e imagenología.

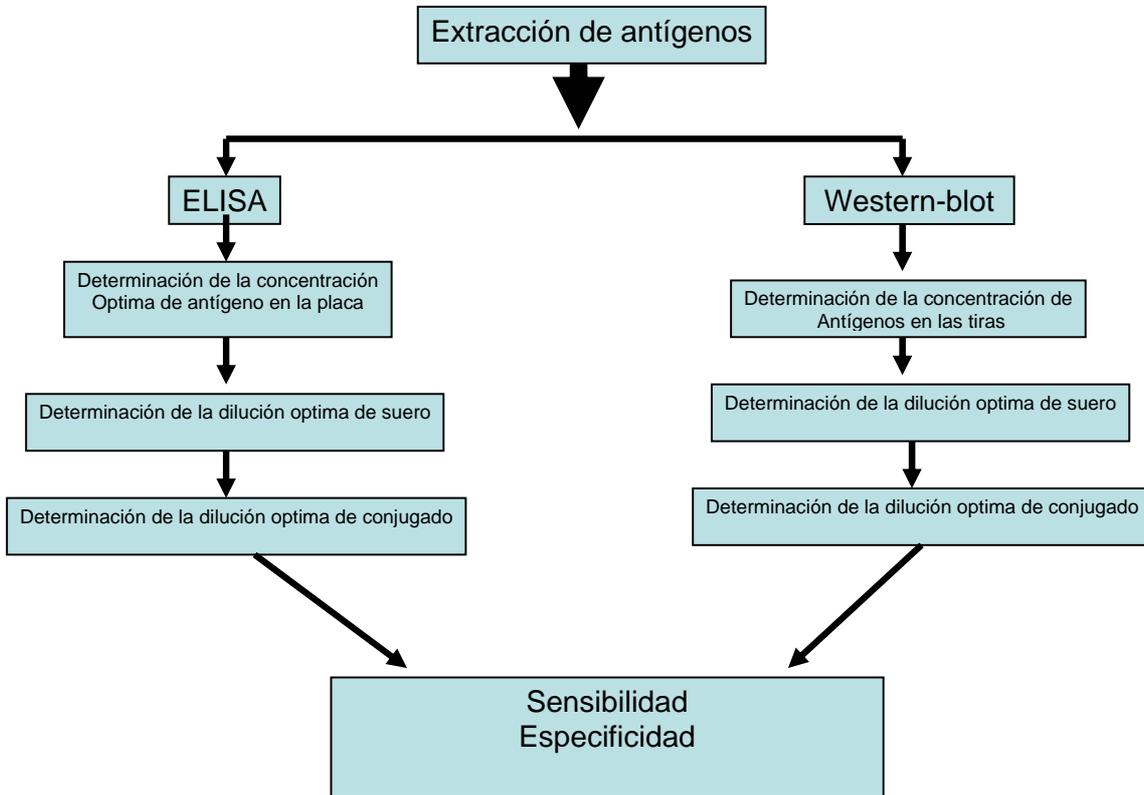
Sensibilidad = $\frac{\text{verd pos}}{\text{verd pos} + \text{falsos negativos}} \times 100$

6.7.2- Determinación de la especificidad para Western-Blot y ELISA

Se procesarán las muestras tanto con ELISA como por Western-Blot de controles negativos para cisticercosis y positivos para otras parasitosis.

Especificidad = $\frac{\text{verdaderos neg}}{\text{verdaderos neg} + \text{falsos positivos}} \times 100$

Flujograma de Estandarización de los ensayos inmunocromatograficos



7.- RESULTADOS

Concentraciones, tiempos y temperaturas optimas en la estandarización del ELISA.

La concentración optima de antígeno para sensibilizar las placas fue de 120µg/ml incubados por 18hrs en refrigeración, las muestras deben ser utilizadas en una dilución de 1/400 por 30min a 37°C, mientras que el conjugado a una dilución de 1/20000 por 30min a 37°C y el sustrato debe ser incubado en oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. **(Tabla 1)**

Análisis de cada componente del ELISA

De los componentes del ELISA el que presento menor absorbancia cuando fue removido del ensayo fue el sustrato con 0.0063 de absorbancia. **(Grafico 1)**

Determinación de la forma de bloqueo.

La forma de bloqueo de las placas sensibilizadas que presentó la menor media de las absorbancia fue con BSA al 0.05% a temperatura ambiente por toda la noche y la que presento la media de absorbancia mas alta fue el bloque con leche al 5% por 1 hr a 37°C. **(Grafico 2)**

Determinación de cut-off.

El Cut-off fue de 0.69 de absorbancia. La media de la absorbancia de los pacientes positivos fue 7 veces mayor que la media de las absorbancia de los pacientes negativos. **(Tabla 2)**

Tiempo óptimo de reacción Enzima- sustrato.

El tiempo de incubación con el sustrato donde se observo una mayor absorbancia fue a los 25 minutos. **(Grafico 3)**

Sensibilidad y especificidad del ELISA.

La sensibilidad del ELISA fue de 100% IC 95% (92.86-100%) y una Especificidad de 93.73% IC 95% (78.16-100%) utilizando un cut-off de 0.69 de absorbancia. **(Tabla 3)**

Concentraciones, tiempos y temperaturas óptimas en la estandarización del ELISA.

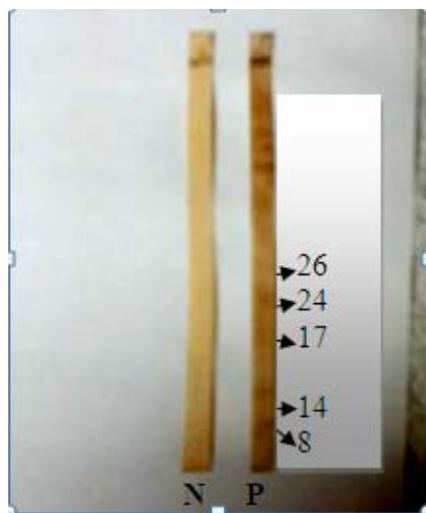
La concentración de antígenos fue de 3mg/ml (dilución $\frac{1}{4}$ a partir de una concentración de 12mg/ml) depositándose 300 μ l en cada gel, la electroforesis fue corrida por 90 minutos a 160volt, mientras que la transferencia se realizó por 15 minutos a 25 volt. Las muestras de suero deben utilizarse en una dilución de 1/200 para ser incubadas por 60min a temperatura ambiente y la dilución del conjugado de ser 1/10000 por el mismo tiempo y a la misma temperatura, mientras que el conjugado de ser incubado por 10min a temperatura ambiente.

(Tabla 4)

Sensibilidad y especificidad del Western-blot:

La sensibilidad de western-blot fue de 83.33 IC 95% (45.18-100%) mientras que la especificidad fue de 100% IC 95% (96.88-100%). **(Tabla 5)**

Las proteínas de *cisticercos* tomadas en cuenta para evaluar la positividad de los pacientes fueron las de 8,14, 17, 24, 26KDa .



Comparación de la sensibilidad y especificidad entre el ELISA y Western-blot.

No se encontró diferencia significativa en la sensibilidades y especificidad entre el ELISA y el Western-Blot.**(Tabla 6).**

8. -DISCUSIÓN:

Concentraciones, tiempos y temperaturas óptimas en la estandarización del ELISA.

Estos resultados difieren de los encontrados por Minozzo J.C y Col. ⁽³⁰⁾ en el 2008 quienes utilizaron un ELISA con concentraciones de Ags de 3.5 µg/ml, diluciones de suero de 1/12 y conjugados diluidos 1/1000, También difieren de el ELISA estandarizado por Jharna Mandal Col. ⁽¹⁴⁾ quien utilizo solo 4 pg de Ags por pozo con una dilución de suero de 1/400 y conjugado de 1/1000; la causa posible de esta diferencia en la concentración de antígeno se deba a que en este ELISA se emplearon Ags crudos mientras que Jharna Mandal Col. Utilizaron Ags puros.

Determinación de las concentraciones de Ags, muestra, conjugado, sustrato

Al remover el sustrato se obtuvo una menor Absorbancia sin embargo el que tiene mayor importancia es el uso de él conjugado lo que significa que el empleo de las diluciones de conjugados juega un papel importante en la introducción del ruido de fondo, por esto es que se procedió a probar con diluciones de conjugados más altas. La absorbancia de 0.3103 cuando el ensayo se realizo sin antígeno es proporcionada por la adherencia de los anticuerpos de los sueros y del conjugado directamente sobre la placa mientras que la absorbancia de 0.4550 registrada cuando se realizo el ensayo sin muestra es proporcionada por la unión de conjugado de forma directa sobre el antígeno y la placa.

Bloqueo.

La manera más efectiva de bloqueo fue utilizando BSA incubado por toda la noche a temperatura ambiente, demostrando menor absorbancia al realizar el ensayo con pacientes negativos, esto evito que los anticuerpos de las muestras y el conjugado se adhirieran directamente sobre la placa, lo anterior coincide con que el uso de BSA es la forma más efectiva de bloqueo.

Determinación de cut-off.

El cut-off encontrado difiere del utilizado por Minnoso J.C, et.al ⁽³⁰⁾ en Brasil con un valor de 0.096, es de esperarse ya que para cada región debe calcularse un cut-off por la diferencia

en los títulos de anticuerpos como consecuencia de la endemicidad de la enfermedad.

La media de las absorbancias de los pacientes positivos fue 7 veces mayor a la de los pacientes negativos, lo que establece una buena capacidad de diferenciación entre pacientes negativos y positivos por este ELISA.

Sensibilidad y especificidad del ELISA.

La sensibilidad de nuestro ELISA (100%) es similar a la obtenida por Ludici Neto F. y col ⁽¹³⁾ utilizando un antígeno de 100 KDa. En una estandarización de ELISA realizado por Ednia .C. Bueno y col ⁽¹⁵⁾ obtuvieron una sensibilidad del 100% en suero empleando un antígeno recombinante el (rGP50). Sin embargo difiere de la sensibilidad obtenida por Simac y col. ⁽¹¹⁾ (90%) en 1995 con un ELISA de antígenos crudo de cisticerco.

La especificidad obtenida (93.75%) es alta, tomando en cuenta que se utilizo antígenos crudos de el cisticerco completo el cual comparte proteínas con otros parásitos. Esta especificidad es similar a la obtenida por Ednia .C. Bueno y col ⁽¹⁵⁾ con el antígeno recombinante el (rGP50), pero difiere de la especificidad obtenida por Lisiane y col ⁽¹²⁾ con un antígeno de 26 KDa de la larva de *Taenia solium* Jharna Mandal y col ⁽¹⁴⁾ consiguieron una especificidad (100%) más alta a la obtenida por nuestro ELISA utilizando la fracción antigénica de 20-24 KDa.

Sensibilidad y especificidad del Wester-blot:

La sensibilidad del western-blot fue menor a la obtenida por T.Sang y col. ⁽³¹⁾ (98%) en 1989 los que utilizaron antígenos purificados por cromatografía con lecti-lectina; Minozzo J.C y col. ⁽³⁰⁾ Consiguieron una sensibilidad mayor a la nuestra (90%) al utilizar antígenos crudos de *Cysticercus longicollis*.

La especificidad (100%) de nuestro Western-blot fue similar a la conseguida por T.Sang y Col. La alta especificidad del Western-blot es debido al proceso de separación de las proteínas del cisticerco.

Comparación de la sensibilidad y especificidad entre el ELISA y Western-blot.

En la comparación de la sensibilidad entre las dos técnicas no se observa una diferencia significativa al comparar los intervalos de confianza sin embargo debe tomarse en cuenta que el número de controles positivos fue muy bajo y que una diferencia de la sensibilidad de 17% entre ambas técnicas es alta.

Al comparar la especificidad no se encontró diferencia significativa de acuerdo a los intervalos de confianza pero se puede apreciar una mejor especificidad al utilizar el western-blot.

9. -CONCLUSIONES:

1. La sensibilidad obtenida por ELISA fue alta mientras que la especificidad fue aceptable tomando en cuenta el antígeno utilizado.
2. El Western-Blot proporciona una mejor especificidad que el ELISA, sin embargo mostró una sensibilidad menor.
3. Al comparar la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas no se diferencia estadística.
4. El cut-off utilizado en el ELISA fue de 0.69.
5. La absorbancia en los positivos fue 7 veces mayor que la de los negativos.
6. El principal componente que influyen el ruido de fondo fue la concentración del conjugado.
7. En el western-blot la reactividad a al menos una de las bandas de 8, 14, 17, 21, 24, 26 KDa fueron considerado positivo.

10. -RECOMENDACIONES

1. Utilizar antígenos purificados para la estandarización de ensayos inmunológicos.
2. En la determinación de la sensibilidad y especificidad es necesario utilizar un mayor número de controles con el fin de aumentar la significancia estadística.
3. Evaluar la capacidad de estas técnicas para discriminar entre una neurocisticercosis y una teniasis, así como diferenciar entre una neurocisticercosis activa o inactiva.

11. -REFERENCIAS:

1. .- Del Brutto O H. Neurocysticercosis, *Seminars in Neurology* 25: 243-251, 2005.
2. .- Maria M.I Ishida, Regina Elena S, Peralta, José M. Peralta, Adelaide. J. Vas, Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot , *Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo* dec 2006.
3. .-Subbash Chandra purija, Priyadarshi Soumyaranja Sahui , Haiharkrihnaicar Dhanya. Detection of cysticercus antigens and antibodies in cerebrospinal fluid of patients with chronic meningitis. *Revista do instituto de medicina tropical de Sao Paulo* oct 2007.
4. .- Cristiane S. Casanova, Maria José S.P. Ribeiro, Reizer. R. Gonçalves , Luis Cláudio Faria , José Mauro Peralta , Márcia Puccioni-Sohler. Influence of the cerebrospinal fluid laboratory parameters in the ELISA test for Neurocysticercosis using a total antigen, *arq Neuro-psiquiatr*, vol.64.n01 Sao Paulo mar 2006.
5. .- Rakhi Biawas, S.C, Parijas, S.K. Narayan, Dot ELISA for the diagnosis of Neurosistycercosis. *Rev, inst, med, trop. Vol.46 no 5 Sao Paulo Oct 2004.*
6. .- Andrew .G. Lescano. Héctor H. Garcia. Roberth. H. Gilman, M. Cladia Guezala. Swine Cysticercosis Hotspots surrounding Taenia solium tape worm carriers, *trop, méd, and hyg.*
7. - F. Bucardo, A. Meza, Lucas, F. Espinoza, R, C, Garcia – Jerônimo R. Garcia – Rodea , D. Correa. The seroprevalence of taenia solium Cysticercosis Among epileptic patients in León Nicaragua , as evaluated by ELISA an western blotting , *annals of tropical medicine and parasitology* , vol 99 No 1 pp 41-45 January 2005.
8. - Herdocia. Ma. Cecilia, Sánchez Sheila Patricia. Seropositividad al ELISA para cisticercosis en población epiléptica y no epiléptica del municipio de León, Trabajo Monográfico. Departamento de Morfología, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León 1998.
9. - Larralde, Carlos. Seroepidemiologia de la Cisticercosis en México. *Salud Pública de Mexico*34(2) 197-209, 1992,.
- 10.- Vanega Gustavo, perfil epidemiológico de la Teniasis y Cisticercosis Humana y Porcina en León Nicaragua. , Trabajo Monográfico, Departamento de Morfología. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua Junio 1998..

- 11.- C.Simac. P.Michel. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis, Department of Parasitology, Regional Hospital of Sain-Pierre, La Reunion, Parasitol Res 81:132-136 1995.
- 12.- Lisiane. V.Ev. Antonio A.M. Immunological evaluation of a 26KDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. Department of Microbiology, Federal University of Minas Geris, Belo Horizonte, Brasil. Parasitol. Res 85: 98-102. (1999).
- 13.- Francesco Iudici Neto, Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semipurified scolex antigen from *Taenia solium* cysticerci. Department of Microbiology, Federal University of Minas Geris, Belo Horizonte, Brasil. Parasitol. Revista de sociedad brasileira de medicina tropical. 40(2): 163-169, mars- abr, 2007.
- 14.-Jharna Mandal. Evaluation of lower molecular mass (20-24 KDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. Parasitology , Postgraduate Institute of Medical Education and Research. India. Parasitol Res 102: 1097- 1101. (2008).
- 15.- Edneia. C. Bueno. Applications of synthetic 8-KD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Faculty of Pharmacy, University of the Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 72(3), 2005.
- 16.– Lasso Jorge. Contribución a la historia de la cisticercosis cerebral Dpto. de Neurología. Escuela de medicina- pontificia Universidad Católica de Chile, Vol. XXI ,1994.
- 17.- Gustavo .C. Román. Neurocisticercosis una perspectiva de salud pública. Revista Neurologica. Centro de Ciencias Medicas, Universidad de Texas, Estados Unidos Vol.36 pag 71, Año 2003
- 18.- CM. Sarti Elsa. La Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium* Salud Pública Mex, Vol.39 .n 3 Cuernavaca may/jun 1997.
- 19.- Botero David. Restrepo Marcos. Parasitosis humanas. Cuarta edición. Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín Colombia. Cap 14. Pág. 356-367, 2003.
- 20.- HH. García. AE González. RH Gilman. Diagnostico, Tratamiento de la

Cisticercosis por *Taenia solium*. *Curr OP Infect Dis* 16:411-419, 2003.

- 21.- García, Héctor. González, Armando. Martínez, Samuel. Gilma, Robert. Teniasis/cisticercosis por *taenia solium*, un serio problema de salud publica en el Perú. Oficina general de epidemiología. Lima, Perú 2001.
- 22.- Grewal J, S. Kaur S. GBhatti G. Sawhne I, M. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 86: 500-503 (2000)..
- 23.- Biondi GF, Mucciolo RG, Nunes CM, Richtzenhain LJ, Inmunodiagnosis of swine cisticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. Faculty of verinary medicine, departament of veterinary higiene and public health, Sao Paulo State University, 64 (261-266).Brazil from 1996.
- 24.- Regina H.S. Peralta, Adelaide J. Vaz ,Alessandra Pardini , Heloísa W. Macedo. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cystercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Facultad de Medicina departamento de patologia. Universidad federal Fluminense. *Acta Tropica* 83 (159-168). Brazil 21 March 2002.
- 25.- N Rossi, I Rivas, M Hernandez. Inmunodiagnostico de la neurocisticercosis : estúdios comparativo de extractos antigenicos de *cysticercus cellulosa* y *cisticercus crassiceps*. Instituto de inmunologia clinica, Universidad de los Andes, Mérida, *MedTrop* V52 n 3.CO. Venezuela, sep-dic 2000.

- 26.- Álvarez-Rodríguez E., Torres-Gárate R., Gutiérrez Larráinzar A., Cabello J., Espinos Pérez D. Neurocisticercosis: recomendaciones de tratamiento a propósito de tres casos. *An. Med. Interna* 21(8): 24-28 (Madrid). 2004 ;

- 27.- Escalante A, Hermes. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, vol.18, no.3-4, p.57-62. jul./dic. 2001.

- 28.- Ferrer, Elizabeth. Teniasis/Cisticercosis: Avances en diagnóstico inmunológico y molecular. *Bol Mal Salud Amb*, vol.46, no.1, p.113jul. 2006.

- 29.- Reyes Salgado Lester, Ortega Morales Maria. Estudio epidemiológico de la cisticercosis y conocimientos de la enfermedad, en la población del Jícaro, Telica,

trabajo monográfico. Facultad de ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León 2002.

30. João Carlos Minozzo, Crude Antigen from *Taenia crassiceps* Cysticercus Used aHeterologous Antigen in ELISA and in EITB for Neurocysticercosis Diagnosis of Patients from Paraná-Brazil
31. Tsang, V. C. W., Brand, J. A., Boyer, A. E. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis, 159, 50-59 (1989).

Anexos

Tabla .1.

Concentraciones, tiempos y temperaturas optimas en la estandarización del ELISA.

Fase del ELISA	Concentración	Tiempo	Temperatura
Antígeno (coating)	120µg/ml	18hrs	4-8 °c
muestra	1/400	30min	37°c
conjugado	1/20000	30min	37°c
sustrato	1/1	25min	25-30°c

Gráfico 1.

Analisis de cada componente del ELISA

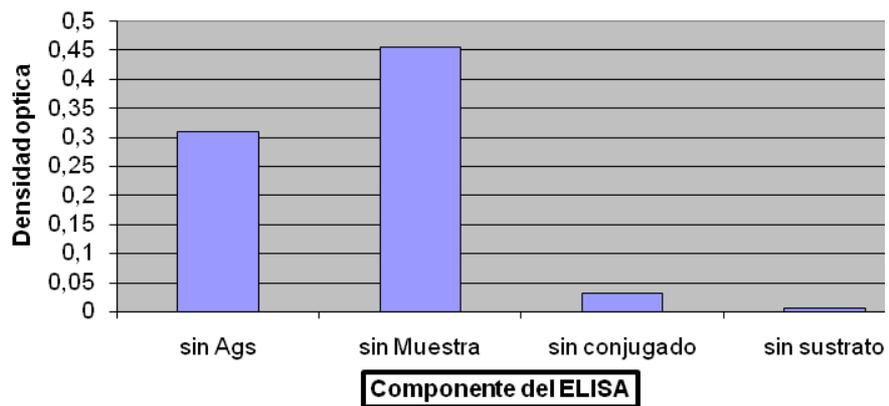


Grafico 2.

Determinacion de las formas de bloqueo de las placas de ELISA

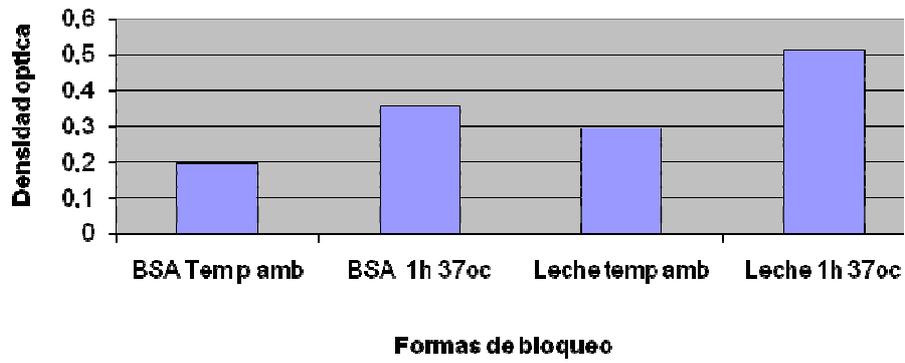


Tabla.2.

Cut-off	Relación positivo/Negativo	
	6.95	
Estadístico	ABS de los positivos	ABS de los negativos
Media	1.6003	0.2304
Desviación estándar	0.49508	0.14322

Grafico .3.

Tiempo óptimo de reaccion enzima-sustrato

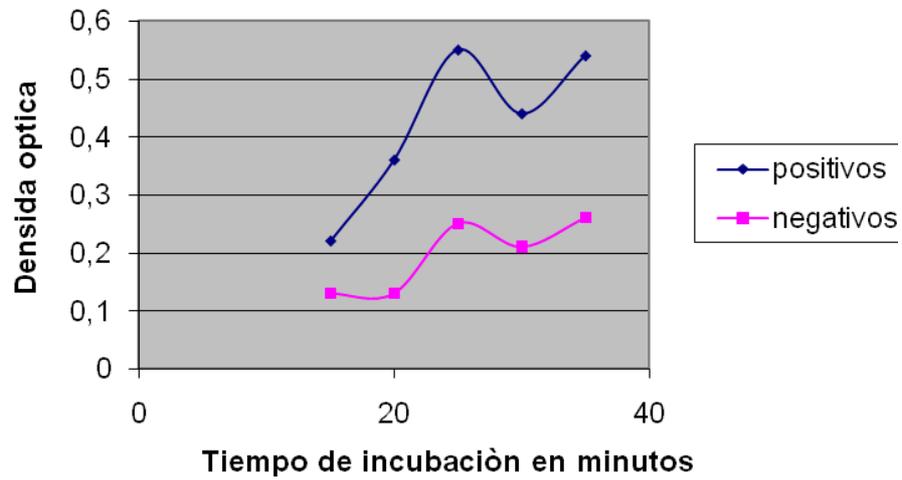


Tabla .3.

Sensibilidad y especificidad del ELISA.

Resultados del ELISA Con un Cut-off =0.69		
Estadístico	Valor	IC (95%)
Sensibilidad	100%	(92.86-100%)
Especificidad	93.75%	(78.16-100%)

Tabla.4.**Concentraciones, tiempos y temperaturas optimas en la estandarización del ELISA.**

Fase de el western		Concentración	Tiempo	Temperatura o voltaje
Antígeno	Electroforesis	3mg/ml en 7 cm	90min	160 volt
	Transferencia	-	15min	25 volt
muestra		1/200	60min	25-30oc
conjugado		1/10000	60min	25-30oc
sustrato		1/1	10min	25-30oc

Tabla.5.

Sensibilidad y especificidad del Western-blot		
Estadístico	Valor	IC (95%)
Sensibilidad	83.33%	45.18 -100%
especificidad	100 %	96.88 -100%

Tabla.6.**Comparación de la sensibilidad y especificidad entre el ELISA y Western-blot.**

	Sensibilidad	IC (95%)	Especificidad	IC (95%)
ELISA	100%	(92.86-100%)	93.75%	(78.16-100%)
Wester- blot	83.33%	(45.18 -100%)	100 %	(96.88-100%)

Anexo 1

Protocolo establecido por T.Sang y Col ⁽³¹⁾. Para la extracción de antígenos del cisticerco

- Los quistes serán aislados directamente del músculo esquelético de cerdos infectados recién sacrificados en el rastro municipal de la ciudad de León en el periodo de septiembre del 2008 a febrero del 2009,
- Se extrae el líquido vesicular, el resto de las vesículas se coloca en PBS (ph. 7.2) eliminando los detritus y restos de tejidos procedentes del cerdo y no del cisticerco.
- Lavar cuidadosamente con una gasa, para eliminar el exceso de PBS, pesar y congelan a -70°C hasta su uso.
- Cuando se tenga recolectado suficientes quistes se sacan para mezclados con inhibidores enzimáticos (4mg de sal sodica de p-hidroximercuribenzoato al 0.04 % + 10ml de NaOH 2N).
- Macerar con ayuda de un mortero y con ciclos de congelación/ descongelación hasta obtener una apariencia pastosa.
- Hacer una dilución 1/5 en solución amortiguadora de sacarosa (42.8g de sacarosa+ 5.95g de Hepes+ 292mg de EDTA+ 500ml de H₂O).
- Sonicar a 7 Hz por un minuto dejando reposar por 5 minutos y luego Sonicando nuevamente, este paso se repetirá de 3-5 veces.
- Centrifugar a 2000 rpm por 20 min. a 4°C, obteniéndose el sobrenadante 1. Al sedimento se le realizara el mismo procedimiento desde la maceración y se obtiene el sobrenadante 2,
- Ambos sobrenadante son mezclados y ultracentrifugados a 50000rpm por 2 hrs. a 4°C.
- Extraerá la capa superficial de lípidos, la parte intermedia que contiene la mezcla de proteínas del cisticerco se guarda y el sedimento se descartará.
- La mezcla de proteínas se dializa contra tris NaCl por lo menos tres cambios de esta solución a 4°C.
- Determinara la concentración de proteínas por un método colorimétrico (Biuret)
- Alicuotar y guardar a -20°

Anexo 2
Gel separador

soluciones para preparar 10ml	gel al 12%(ml)
agua desionizada	3.3
acrilamida-bisacrilamida al 30%	4.0
Tris Base 2M ph. 8.8	2,5
SDS al10%	0.10
APS al 10%	0.05
TEMED	0.004

Gel concentrador

soluciones para preparar 10ml	gel al 5%(ml)
agua desionizada	6.8
acrilamida-bisacrilamida al 30%	1.7
Tris Base 2M ph. 8.8	1.5
SDS al10%	0.1
APS al 10%	0.1
TEMED	0.01

Anexo 3

Procedimientos de la electrofóresis

- Montar los geles en la cámara para electroforesis (BIO-RAD) y se procede a agregar buffer de electroforesis **1X** (para 5X= 15 g de Tris base+72 g de glicina+5 g de SDS+1L de agua bidestilada) en la parte interna y externa que se crea entre el electrodo y la cámara.
- Preparar las muestras en diferentes diluciones con Buffer de muestra (387mg de EDTA+5ml de glicerol+ 5ml de SDS + 1.25ml de Tris base 0.5M y ph 6.8 + unos granitos de azul de bromofenol y aforar con agua bidestilada a 50ml) las que serán rotuladas y tapadas adecuadamente para luego ser puestas a hervir en baño maría por 2 minutos con 20ul de buffer de muestra con beta mercaptoetanol (SIGMA),
- Colocar las glicoproteínas y el marcador de peso molecular en los carriles identificados con las concentraciones de glicoproteínas correspondientes, (WM, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512) y terminar de llenar la cámara electroforética con el buffer de corrido.
- Realizar el corrido electroforético a 200 Vlt, la corrida termina cuando el frente este a 0.5 cm. de extremo distal.

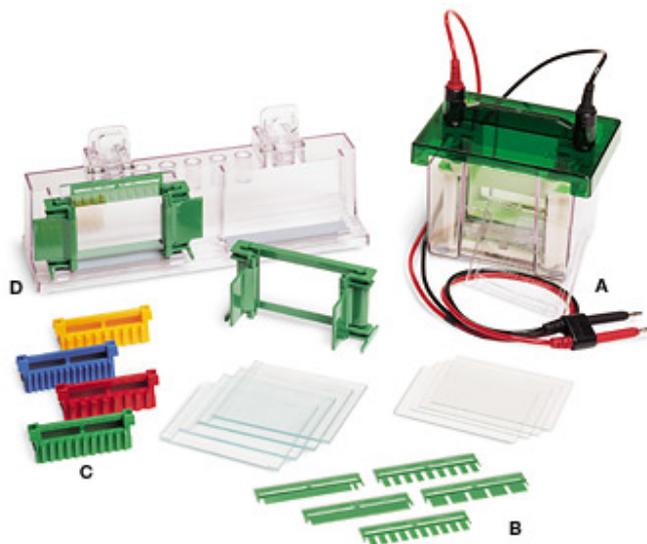
Anexo 4

Determinación de la concentración óptima de antígeno en las tiras

- Las membranas de nitrocelulosa serán cortadas en tiras de 3mm de ancho, cada una identificadas con la concentraciones glicoproteínas correspondiente, se trabajará con tres tiras para cada concentración de antígeno con el fin de determinar a que concentración hay mejor reacción de sueros positivos previamente diagnosticados por serología e imaginología.
- Bloquear las tiras con 490ul con PBS Tween 20 al 0.3% y leche descremada al 5% toda la noche en temperatura de 4-8 °c.
- Agregar 10ul de sueros controles de pacientes positivos de manera que la dilución de la muestra quede 1/50 (en este caso se deja fijo la concentración de suero para determinar primero la concentración adecuada de antígeno)
- Incubará por 1hr temperatura ambiente en agitación constante.
- Lavar tres veces con PBS Tween 20 al 0.3% por 5 min. en cada lavado con agitación constante.
- Agregaran 500ul de conjugado anti-IgG humano (SIGMA) a una dilución de 1/250 en PBS Tween 20 al 0.3% y se incubará 1hr a temperatura ambiente, (en este caso se deja fijo la concentración de conjugado para determinar primero la concentración adecuada de antígeno)
- Lavar tres veces con PBS Tween 20 al 0.3% por 5 min. en cada lavado con agitación constante.
- Agregaran 500ml de sustrato diluido (30ml de 3,3 diaminobencidina (SIGMA)+ 30ml de PBS ph. 7.2 +6ml de agua). Se prepara solo lo que se va a utilizar,
- Se incuba por 10 min aproximadamente en agitación constante y cubiertos con papel aluminio.
- La reacción se detendrá lavando con agua destilada.

Anexo 5

Modelo Cámara electroforética MiniProtean



Anexo 6

^RSD Semi-Dry Electroforetic Transferí Cell BIO-RAD

